



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>



Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité "Sciences Agronomiques"

par

Clémentine Lapie

Caractérisation de la rhizodéposition du maïs (*Zea mays* L.) en réponse à la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et d'éléments traces métalliques

Soutenue publiquement le 10 septembre 2019

Membres du jury :

M^{me} **Geneviève Chiapusio**

Rapportrice

Maître de Conférences, Université de Bourgogne – Franche Comté, ChronoEnvironnement, Montbéliard

M^{me} **Joëlle Fustec**

Rapportrice

Enseignante-chercheuse, Ecole Supérieure d'Agriculture, LEVA, Angers

M^{me} **Michèle Boitel**

Examinatrice

Professeure, Université de Picardie Jules Verne, BIOPI, Amiens

M. Thierry Lebeau

Examinateur

Professeur, Université de Nantes, LPG, Nantes

M. Thibault Sterckeman

Directeur

Ingénieur de Recherche, INRA, LSE, Vandœuvre-lès-Nancy

M. Pierre Leglize

Co-directeur

Maître de Conférences, Université de Lorraine, LSE, Vandœuvre-lès-Nancy

Laboratoire Sols et Environnement
2, avenue de la forêt de Haye – BP 20163
54505 Vandoeuvre CEDEX



**LABORATOIRE SOLS
& ENVIRONNEMENT**



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, **Geneviève Chiapusio**, **Joëlle Fustec**, **Michèle Boitel** et **Thierry Lebeau** d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse ainsi que pour les échanges constructifs que nous avons eu lors ma soutenance.

Je voulais également remercier les **membres de mon comité de pilotage**, Christophe Nguyen, Jean-François Masfarand et Emile Benizri, que nous avons réuni à trois reprises, pour leurs conseils et leurs avis extérieurs.

Egalement **Pierre** et **Thibault**, mes directeurs de thèse qui m'ont suivie pendant ces quatre années. Merci de m'avoir fait confiance sur ce projet et de m'avoir toujours poussée à devenir autonome sur l'utilisation des techniques et des appareils. Merci pour votre patience et pour m'avoir aidée à surmonter les nombreux obstacles auxquels nous avons été confrontés. Merci également pour votre disponibilité et les nombreuses réunions que nous avons eues.

Merci à **Christophe** de m'avoir permis de réaliser ma thèse au laboratoire dans d'aussi bonnes conditions. Je voudrais également remercier tous les membres permanents du LSE. Merci à vous tous d'avoir rendu le laboratoire si accueillant, je pense à **Geoffroy**, **Françoise**, **Gaylord**, **Guillaume**, **Frédéric**, **Noëlle** et **Jean-Louis**. Et je tiens à remercier plus particulièrement **Emile** pour ses nombreux conseils tout au long de ma thèse et sa disponibilité. Ta connaissance des exsudats racinaires a été un vrai atout pour moi. Merci à **Stéphanie** de m'avoir entre autres aidée à me dépatouiller en chimie organique. Merci à **Sophie** pour m'avoir initiée aux bases de données et ainsi trier mes centaines de molécules. Merci à **Catherine** et **Apolline** pour votre bonne humeur et votre dynamisme. Je voudrais également remercier **Sylvia** et **Laetitia** qui nous permettent de nous focaliser sur la recherche pendant qu'elles gèrent tous les aspects administratifs.

Je voudrais accorder une attention particulière aux **techniciens** qui font un travail incroyable. Merci d'être si attentifs à la vie du laboratoire et de toujours faire en sorte que tout se passe le mieux possible ! Merci à **Jean-Claude** d'avoir broyé une grande partie de mes échantillons. Merci à **Adeline** et **Romain** pour tout ce que vous faites pour le laboratoire et spécialement en ce qui concerne la qualité. J'espère conserver toutes ces bonnes pratiques que vous nous avez inculquées et qui rendent notre travail plus juste. Merci à **Lucas** et **Alain**, nos assistants sécurité. Grâce à vous j'ai eu la chance de porter un masque à gaz et d'avoir à disposition une couverture anti-feu qui n'a, heureusement, jamais servi ! Lucas, merci aussi pour tous les dosages que tu

as réalisés sur mes échantillons ! Et Alain merci pour ton assistance 24h/24 et 7J/7. Jusqu'à la toute fin ton aide a été précieuse et ton côté pro-actif a permis d'éviter des crises majeures, surtout en fin de thèse ! **Stéphane**, merci à toi pour la fabrication des dispositifs et de façon générale merci pour ta joie de vivre et ta bonne humeur. Je ne te remercie pas en revanche pour tes qualités au tarot qui nous ont valu quelques défaites... mais on attend la revanche !

Le laboratoire serait également moins dynamique sans la présence des **stagiaires** que j'ai vu défiler pendant ces presque quatre ans. Je pense plus particulièrement à Etienne et Vincent. Et je voudrais aussi remercier mes deux stagiaires, Tatiana et Jeanne qui m'ont beaucoup aidée et qui m'ont soulagée d'une bonne quantité de travail !

Cette thèse n'aurait pas été la même sans l'expertise des autres laboratoires. Merci à **Cédric Paris**, à **Jérémy Grosjean**, à **Christophe Robin**, à **Claire Soligot** et à **Catherine Lorgeoux**. Merci à vous d'avoir été patients malgré mes nombreuses questions (parfois à la limite du harcèlement !) et merci pour votre savoir-faire et votre disponibilité. Plus globalement merci au LAE, au LIBIO, à l'UR-AFPA et au laboratoire Géoressources.

J'ai une pensée pour tous **les membres du laboratoire EDYSAN** au sein duquel j'ai réalisé mes trois stages de recherche et plus spécifiquement pour **Manuella Catterou** qui m'a formée et qui m'a donné le goût pour la recherche.

Toujours concernant les autres laboratoires, je pense à nos amis du **LIEC** avec qui nous avons pu réaliser de nombreuses soirées et week-ends, et en particulier à **Romain** et **Nicolas**.

Ces quatre années ont été riches en rencontres, que ces gens soient encore au laboratoire ou non. Je salue les anciens : **Frédéric, Robin, Marie, Yannick, Ramez, Ali, Tino, Mohammad**, et **Clément**. Merci à la team stats, **Quentin, Victor** et **Gabin**. Grâce à vous les tests paramétriques et non paramétriques n'ont plus de secrets pour moi ! **Alexis** qui nous remontait régulièrement le moral à coup de croissants aux amandes. **Gwendal** notre petit nouveau venu du nord. **Romane** et **Dulce**, nos grandes voyageuses qui a elles deux ont couvert la surface du globe. Guillaume, notre sudiste au caractère bien trempé qu'il sait adoucir à coups de banoffee pie. Merci à vous et merci à tous les autres que j'ai pu croiser pour tous les repas partagés au RU ou au laboratoire, les soirées et les week-ends passés ensemble qui m'ont permis de décompresser et de passer l'étape de la thèse plus sereinement !

Cette liste ne serait bien sûr pas complète sans mes deux moitiés, mes supernanas, mon triopikeur. **Anne**, nous sommes arrivées le même jour au laboratoire et nous en sommes parties

à une semaine d'écart. On peut dire qu'on a commencé et qu'on a fini ensemble. Merci de m'avoir accompagnée jusqu'au bout ! Tu fais partie intégrante de ma thèse et on peut même dire que tu en as acquis certains résultats. **Séverine**, je t'ai suivie dans tous tes bureaux à commencer par la TD4 en finissant par le triobureau et parfois même la nuit. Tu es mon binôme de manip, même à 2h du matin la nuit dans l'ENSAIA, entourées de bactéries malodorantes et d'alarmes incendies. Vous savez déjà tout de ma thèse, bien souvent ce qui n'a pas fonctionné et puis finalement ce qui a marché ! Vous avez toujours été là dans les hauts comme dans les bas. Vous étiez ma bouée de sauvetage, celle qui m'empêchait de me noyer au plus fort de la tempête. Pendant toute la thèse et jusqu'à la toute fin, vous avez su m'écouter et me conseiller. C'est un trinôme que je n'oublierai pas de sitôt.

Je voudrais également remercier mes amies d'enfance. Je souhaite à tout le monde d'avoir une **Mylène** et une **Fanny** à ses côtés pendant quasiment un quart de siècle, et j'espère pour encore de nombreuses années. Merci pour tous ces moments à côté de la thèse qui m'ont permis de ne pas oublier qu'il y a une vie en dehors des études. Merci à vous pour nos discussions quasi quotidiennes à parler de tout et surtout de rien. J'aimerais également remercier d'autres Picards : **Céline**, alias Libou, **Olivier** et **Nina** que j'ai eu la chance de rencontrer pendant mes études à Amiens. J'espère vous rejoindre bientôt dans notre région des Hauts de France.

Je voudrais aussi remercier ma famille : **mes parents** et **ma sœur** Valériane. Vous m'avez soutenue pendant ces quatre années, comme vous l'avez fait tout au long de mes études. Vous avez su venir à moi quand je n'avais pas le temps de rentrer à la maison et sur la fin vous avez sûrement passé autant de temps à Nancy que chez vous. Pourtant il faut le vouloir pour quitter la Picardie ne serait-ce qu'un week-end ! Merci pour la confiance que vous m'avez témoignée toutes ces années et promis cette fois c'est la dernière, j'arrête les études ! Je voudrais également remercier le reste de ma famille qui compte beaucoup pour moi et plus particulièrement mes quatre **grands-parents**.

Mes derniers mots sont pour celui qui partage ma vie depuis plus de 9 ans maintenant. **Benjamin**, je te remercie de m'avoir suivie ici pour que je puisse continuer mes études, même si sur le papier Nancy n'était pas notre ville rêvée. Tu as beaucoup de mérite de m'avoir supportée durant la thèse et tu y as aussi contribué *via* bon nombre de schémas et de dessins dans le manuscrit qui l'auront, je l'espère, rendu plus digeste. Merci pour ton amour, ton soutien et ta patience à toute épreuve. Je ne saurai t'exprimer toute ma gratitude alors je préfère te dédier ce manuscrit puisque tu en es le pilier principal.

Table des matières

Introduction Générale.....	2
Chapitre I : Etat de l'art et objectifs de la thèse	4
Etat de l'Art	5
1. Pollution des sols.....	5
2. Principaux polluants du sol.....	6
2.1. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)	6
2.1.1. Caractéristiques des HAP	6
2.1.2. Origines des HAP	7
2.1.3. Dynamique des HAP dans le sol.....	8
2.1.3.1. Volatilisation	8
2.1.3.2. Interactions avec la phase solide du sol	9
2.1.3.3. Lixiviation & lessivage	10
2.1.3.4. Dégradation	10
2.1.3.5. Bio-accumulation	11
2.2. Eléments traces métalliques (ETM)	12
2.2.1. Caractéristiques des ETM	12
2.2.2. Toxicité des ETM	12
2.2.3. Origines des ETM	13
2.2.3.1. Origines naturelles des ETM.....	13
2.2.3.2. Origines anthropiques des ETM.....	13
2.2.4. Dynamique des ETM dans le sol	14
2.2.4.1. Complexation des ETM	14
2.2.4.2. Sorption/désorption des ETM	15
2.2.4.3. Précipitation/dissolution des ETM	15
2.2.4.4. Bioaccumulation.....	15
3. Management et remédiation des sols pollués	16
3.1. Techniques biologiques et non biologiques de management des sols pollués ...	16
3.2. Végétalisation des sols contaminés	17
4. Influence des ETM et des HAP sur le fonctionnement des plantes.....	19
4.1. Influence des ETM sur le fonctionnement des plantes.....	19
4.1.1. Absorption et transfert des ETM dans la plante.....	19
4.1.2. Mécanismes de détoxification des ETM.....	20
4.1.3. Impact des ETM sur le fonctionnement de la plante	20

4.1.4.	Influence des ETM sur la morphologie de la plante	21
4.2.	Influence des HAP sur le fonctionnement des plantes	22
4.2.1.	Absorption et transfert des HAP	22
4.2.2.	Impact des HAP sur le fonctionnement de la plante.....	23
4.2.3.	Mécanismes de détoxification des HAP	23
4.2.4.	Influence des HAP sur la morphologie de la plante.....	23
5.	Rhizodéposition	24
5.1.	Caractéristiques des rhizodépôts	25
5.1.1.	Molécules diffusées	25
5.1.2.	Molécules secrétées.....	26
5.1.3.	Molécules excrétées	27
5.1.4.	Débris cellulaires	27
5.2.	Facteurs impactant la rhizodéposition	28
5.2.1.	Facteurs biotiques	29
5.2.1.1.	Facteurs biotiques externes	29
5.2.1.2.	Facteurs biotiques internes	30
5.2.2.	Facteurs abiotiques.....	31
5.3.	Impact de la rhizodéposition sur la rhizosphère.....	32
5.3.1.	Impact de la rhizodéposition sur le substrat.....	32
5.3.2.	Impact de la rhizodéposition sur les organismes	33
5.3.2.1.	Impact de la rhizodéposition sur les microorganismes rhizosphériques	33
5.3.2.2.	Impact sur les plantes avoisinantes	34
5.3.3.	Impact de la rhizodéposition sur la dynamique des éléments.....	35
6.	Dispositifs de culture et de collecte des rhizodépôts	38
6.1.	Culture et collecte des exsudats racinaires	38
6.1.1.	Description des différents dispositifs de culture et de collecte des exsudats racinaires.....	38
6.1.2.	Avantages et inconvénients des différents dispositifs de culture et collecte des exsudats racinaires.....	41
6.2.	Culture et la collecte du mucilage	42
6.2.1.	Description des différents dispositifs de culture et de collecte du mucilage	42
6.2.2.	Avantages et inconvénients des différents dispositifs de culture et collecte du mucilage.....	43
	Objectifs de la thèse	45

Chapitre II : Matériels et méthodes	48
1. Matériels	49
1.1. Le maïs, une plante modèle	49
1.2. Choix et préparation du substrat.....	49
1.3. Apport des éléments nutritifs	50
1.4. Conditions de culture	50
1.5. Expérience préliminaire et choix des concentrations	50
1.6. Dispositifs de culture.....	51
1.6.1. Dispositifs de culture stériles de récolte en continu des rhizodépôts.....	51
1.6.1.1. Constitution des dispositifs	52
1.6.1.2. Déroulement de la culture et méthode de collecte	53
1.6.2. Dispositifs de culture non-stériles de récolte en continu des rhizodépôts ..	53
1.6.2.1. Constitution des dispositifs	54
1.6.2.2. Déroulement de la culture et méthode de collecte	54
1.6.3. Culture non-stérile et récolte finale des rhizodépôts.....	54
1.6.3.1. Constitution des dispositifs	54
1.6.3.2. Déroulement de la culture et méthode de collecte	55
2. Présentation des expériences	56
2.1. Effet du Cd sur la rhizodéposition du maïs	57
2.2. Effet du phénanthrène sur la rhizodéposition du maïs	57
2.3. Evolution temporelle de la rhizodéposition du maïs soumis à l'exposition à un polluant.....	58
3. Contamination des dispositifs.....	60
3.1. Expérience n°1 : Culture de plantes contaminées au Cd.....	60
3.2. Expérience n°2 : Culture de plantes contaminées au phénanthrène.....	60
3.3. Expérience n°3 : Evolution de la rhizodéposition	61
4. Mesures réalisées sur les plantes	61
4.1. Mesure des échanges gazeux foliaires	61
4.2. Mesures morphologiques réalisées sur les plantes	62
4.3. Caractérisation du système foliaire	62
4.4. Caractérisation du système racinaire	62
4.5. Préparation des échantillons en vue des analyses	63
4.6. Analyses élémentaires	63
4.6.1. Dosage du carbone et azote total.....	63
4.6.2. Mise en solution et dosage des éléments en traces et éléments majeurs.....	64

4.7.	Dosage des pigments photosynthétiques.....	64
4.8.	Extraction et dosage des glucides et des acides aminés.....	65
4.8.1.	Extraction hydro-alcoolique des sucres et acides aminés.....	65
4.8.2.	Dosage des glucides solubles totaux.....	65
4.8.3.	Dosage des acides aminés et ammonium totaux.....	66
4.9.	Extraction et dosage des protéines.....	66
4.9.1.	Extraction des protéines.....	66
4.9.2.	Dosage des protéines.....	67
5.	Analyse des solutions de rhizodéposition.....	67
5.1.	Préparation des échantillons.....	67
5.2.	Mesure du carbone total.....	68
5.3.	Dosage des glucides.....	68
5.3.1.	Dosage des glucides totaux.....	68
5.3.2.	Dosage de mono et di-saccharides.....	69
5.4.	Dosage des acides aminés.....	70
5.4.1.	Dosage des acides aminés totaux.....	70
5.4.2.	Dosage des acides aminés individuels.....	70
5.5.	Dosage des protéines totales.....	71
5.6.	Préparation des échantillons et dosage de molécules organiques.....	71

Chapitre III : Profil métabolique des rhizodépôts de haut et bas poids moléculaire du maïs exposé à des concentrations croissantes en cadmium 74

Expérimentations préliminaires : choix des concentrations en cadmium.....	76
1. Introduction.....	76
2. Résultats.....	77
2.1. Expérience préliminaire n°1.....	77
2.2. Expérience préliminaire n°2.....	78
3. Conclusion.....	79

Profiling of main metabolites in root exudates and mucilage collected from maize submitted to cadmium stress 81

1. Introduction.....	81
2. Materials and methods.....	83
2.1. Plant cultivation.....	83
2.2. Photosynthesis and respiration measurement.....	84
2.3. Collection of rhizodeposits.....	84

2.4.	Plant morphological measurements	85
2.5.	Plant biochemical measurements	85
2.6.	Analyses of rhizodeposits.....	86
2.7.	Data processing	88
3.	Results and discussion	89
3.1.	Impact of Cd on maize growth, morphology and biochemistry.....	89
3.2.	Impact of Cd exposure on the composition of rhizodeposit solutions	91
3.3.	Impact of Cd on the composition of diffusate solutions	92
3.4.	Impact of Cd on the composition of rhizospheric sand extracts	95
3.5.	Multivariate approach to the impact of Cd on rhizodeposition.....	98
3.6.	Significance of the collected rhizodeposits	99
3.7.	Suspected role of collected rhizodeposits on Cd dynamics	100
4.	Conclusions	101
	Données complémentaires.....	102
	Conclusion et discussion.....	108

Chapitre IV : Profil métabolique des rhizodépôts de haut et bas poids moléculaire du maïs exposé à des concentrations croissantes en phénanthrène 112

	Impact of phenanthrene on primary metabolites profiling in root exudates and mucilage of maize.....	115
1.	Introduction	115
2.	Materials and methods.....	118
2.1.	Plant cultivation.....	118
2.2.	Photosynthesis and respiration measurement.....	119
2.3.	Collection of rhizodeposits.....	119
2.4.	Plant morphological measurements	120
2.5.	Plant biochemical measurements	120
2.6.	Analyses of rhizodeposits.....	121
2.7.	Data processing	123
3.	Results and discussion	124
3.1.	Plant response to phenanthrene	124
3.2.	Influence of PHE on total carbon, carbohydrate, amino acid and protein in rhizodeposit solutions.....	126
3.3.	Influence of PHE on diffusate solution composition	128
3.4.	Influence of PHE on composition of rhizospheric sand extracts	132

3.5. Multivariate approach to the impact of PHE on rhizodeposition.....	135
4. Conclusion	137
Données complémentaires.....	139
1. Introduction	139
2. Résultats.....	139
2.1. Impact du phénanthrène sur la physiologie du maïs	139
2.2. Les limites de la rhizosphère	141
Conclusion et discussion.....	144

Chapitre V : Variation de la rhizodéposition selon le stade de développement du maïs soumis à une pollution organique ou métallique 148

Variation of rhizodeposition according to the development stage of maize submitted to organic or metallic pollution	151
1. Introduction	151
2. Materials and methods	153
2.1. Plant cultivation.....	153
2.2. Collection of rhizodeposits.....	154
2.3. Plant morphological measurements	155
2.4. Plant biochemical measurements	156
2.5. Analyses of rhizodeposits.....	157
2.6. Data processing	159
3. Results and discussion	160
3.1. Plant response to pollutants according to its development stage	160
3.2. The diffusate solution.....	161
3.2.1. Biochemical analysis of the diffusate solution	161
3.2.2. Analysis of individual mono, disaccharides, amino acids and other organic compounds in the diffusate solution	163
3.2.3. Multivariate approach of the impact of Cd and PHE exposure on the diffusate solution	167
3.3. The rhizospheric sand extract.....	170
3.3.1. Biochemical analysis	170
3.3.2. Analysis of individual amino acids, mono, disaccharides and other organic compounds in the rhizospheric sand extract.....	171
3.3.3. Multivariate approach of the impact of Cd and PHE exposure on the rhizospheric sand extract	174

3.4. Suspected role of collected rhizodeposits on organic or metallic pollutant dynamics.....	177
3.5. Influence of maize development on rhizodeposition	178
4. Conclusions	179
Conclusion et discussion.....	188
Conclusion générale	192
Références	207

Valorisations scientifiques

Publications

Lapie, L., Leglize, P., Paris, C., Buisson, T., Sterckeman, T. 2019. Profiling of main metabolites in root exudates and mucilage collected from maize submitted to cadmium stress. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(17), 17520-17534 ; <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05168-0>

Lapie, L., Sterckeman, T., Paris, C., Leglize, P. Impact of phenanthrene on primary metabolites profiling in root exudates and mucilage of maize, soumis dans ESPR

Lapie, L., Leglize, P., Paris, C., Sterckeman, T. Variation of rhizodeposition according to the development stage of maize submitted to organic or metallic pollution, en préparation

Poster

Lapie, L., Leglize, P., Paris, C., Sterckeman, T. 2017. Caractérisation de la rhizodéposition de *Zea mays* en réponse à la présence de cadmium. Séminaire de l'école doctorale RP2E, Nancy, France

Communication orale

Lapie, L., Leglize, P., Buisson, T., Paris, C., Sterckeman, T. 2018. Metabolites profiling in high and low molecular weight rhizodeposits collected from *Zea mays* submitted to cadmium stress. 15th International Phytotechnology Conference, University of Novi Sad, Serbia

Introduction Générale

Les terres émergées à la surface du globe représentent 14 milliards d'hectares mais seuls 22 %, soit 3 milliards d'hectares, sont cultivables une fois que l'on a décompté les déserts, les hautes montagnes, l'Antarctique ou encore le Groenland. A l'heure actuelle, seule la moitié de cette surface (11 %) est exploitée à des fins de production végétale (FAO, 2011; Nahon, 2008). Une grande partie de ces surfaces (33 %) est dégradée ou tend à l'être à des degrés divers et 18 % de ces surfaces dégradées sont même devenues stériles (FAO, 2011). Les raisons de la dégradation de ces sols sont multiples. L'érosion est un phénomène majeur qui a rendu un tiers des terres arables improductives. Aux Etats-Unis, la profondeur moyenne des sols dans le pays, correspondant à la couche de terre arable, était de 23 cm il y a deux siècles alors qu'elle est désormais de 15 cm entraînant l'abandon de l'agriculture sur les sols les moins profonds (Pimentel *et al.*, 1995). A cela s'ajoute la salinisation continentale des sols provoquée par l'agriculture intensive demandeuse de grandes quantités d'eau (Brady & Weil, 2002). La pollution des sols est identifiée comme la 3^{ème} plus grande menace pour le fonctionnement des sols (FAO & ITPS, 2015). Elle concernerait plus de 22 millions d'hectares dans le monde (Oldeman, 1991). Les causes de cette pollution sont aussi diverses que l'industrialisation, les guerres, les activités minières, l'urbanisation ou encore l'intensification de l'agriculture. La présence de polluants dans les sols cultivables menace la santé humaine et la production alimentaire (Rodríguez-Eugenio *et al.*, 2018).

Ces dégradations participent à l'altération des services écosystémiques fournis par les sols agricoles. Ils mettent en péril notre sécurité alimentaire en rendant les cultures impropres à la consommation, en diminuant les rendements et, au-dessus de certains seuils, en éliminant complètement la production agricole (FAO & ITPS, 2015). Ces conséquences sont d'autant plus critiques, qu'il est estimé à 9 milliards de personnes la population sur terre en 2050 (Godfray *et al.*, 2010). Ainsi, si aujourd'hui 0,27 hectare de terre cultivable est disponible par personne, dans 40 ans, cette surface sera divisée par deux (Pimentel *et al.*, 1995).

En présence de polluants, les plantes mettent en œuvre des mécanismes de défense leur permettant de résister ou de tolérer ces stress abiotiques jusqu'à un certain point. Ces mécanismes sont de mieux en mieux décrits mais il subsiste de nombreuses zones d'ombre. C'est le cas notamment de la rhizodéposition : l'émission de molécules par les racines dans une

zone proche de celles-ci pourrait influencer sur la dynamique des polluants, qu'ils soient organiques ou métalliques, et ainsi participer à leur tolérance par la plante.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer et d'expliquer l'impact des polluants sur la qualité et la quantité de la rhizodéposition et d'identifier ses conséquences en retour sur la dynamique des polluants. En effet, la rhizodéposition est la première barrière physico-chimique entre les racines et le sol et pourrait permettre une meilleure tolérance de la plante à ces stress. Pour représenter les polluants organiques et métalliques nous avons choisi deux polluants modèles, le phénanthrène (PHE), un hydrocarbure aromatique polycyclique et le cadmium (Cd), un élément trace métallique. La plante modèle choisie pour étudier ses rhizodépôts est le maïs, de son nom scientifique *Zea mays* L.

L'état des connaissances nous ayant permis d'aborder cette problématique est exposé lors du I^{er} chapitre qui décrit dans un premier temps l'état de la pollution des sols permettant ainsi d'apporter des éléments de compréhension sur l'importance de l'étude et le choix des contaminants modèles. Ensuite, l'influence des polluants sur les plantes et les mécanismes de tolérances mis en place sont résumés. Enfin, nous focaliserons notre étude sur l'état des connaissances concernant les rhizodépôts, les facteurs pouvant affecter leur composition qualitative et quantitative et l'impact de ces molécules sur la rhizosphère et les éléments qui la composent. Par la suite, le chapitre II permet de décrire les dispositifs ayant permis de cultiver les plants de maïs en présence de PHE et de Cd et de collecter deux types de rhizodépôts. Les analyses ayant permis de caractériser l'état physiologique de la plante et l'intensité du stress abiotique sont décrites ainsi que les mesures réalisées sur les rhizodépôts pour en connaître la composition. Le chapitre III présente quant à lui une expérience ayant permis d'exposer le maïs à des concentrations croissantes en Cd et de mesurer l'effet de ce dernier sur la plante et sur la composition des rhizodépôts. La nature de ces molécules et leurs effets sur la dynamique du Cd y sont discutés. Le chapitre IV rend compte d'une expérience similaire consistant à exposer le maïs à des concentrations croissantes en PHE avec pour but de mesurer l'impact du polluant sur le fonctionnement de la plante et de ses rhizodépôts. L'expérience présentée au chapitre V permet de prendre en compte le stade phénologique de la plante pour mieux comprendre le fonctionnement et la mise en place de la rhizodéposition sous l'influence de deux polluants modèles que sont le Cd et le PHE. Enfin, la dernière partie nous permettra de synthétiser les principales caractéristiques de la rhizodéposition en réponse à la présence de polluants organiques ou métalliques.

Chapitre I

État de l'art et objectifs de la thèse

Etat de l’Art

1. Pollution des sols

La pollution d’un sol est définie lorsqu’une substance ou un produit chimique est apporté alors qu’il n’était pas présent initialement ou que celle-ci est présente en quantité plus élevée que celle naturellement retrouvée dans les sols, provoquant des effets indésirables sur des organismes non ciblés. En France, 4142 sites et sols pollués ont été recensés et plus de 2,5 millions en Europe, dont 14 % hautement pollués (Basol, 2013, p. 201; EEA, 2014).

Cette situation ne va pas en s’améliorant. En effet, à une échelle mondiale, 33% des terres sont moyennement à fortement dégradées ou tendent à l’être, 36% sont stables et seuls 10% des terres sont en cours de bonification (Figure 1). La source de cette pollution peut être diffuse ou ponctuelle.

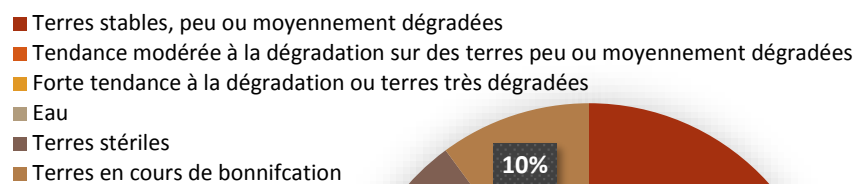


Figure 1 : Situation et tendances de la dégradation des terres dans le monde. Adapté de FAO (2011)

Dans le premier cas, la pollution diffuse s’étend sur de vastes zones, s’accumule dans le sol mais ne provient pas d’une source unique ou facilement identifiable du fait de mécanismes de dilution ou de transformation des contaminants avant leur transfert sur le site. Ces sources peuvent résulter, directement, d’apport de produits phytosanitaires ou de boues sur les terres agricoles ou encore de la mauvaise gestion des déchets. De façon indirecte, ces pollutions peuvent être apportées par ruissellement, transport atmosphérique ou encore suite à l’érosion des sols (FAO & ITPS, 2015). Dans le second cas, la cause de la pollution provient d’un événement ou d’une série d’événements facilement identifiables résultant principalement d’activités anthropiques telles que le traitement inadéquat des déchets ou la présence d’activités industrielles agricoles et commerciales (EEA, 2014; Rodríguez-Eugenio *et al.*, 2018).

Sur la majorité de ces sites, des pollutions par des composés chimiques de natures variées sont retrouvés (Figure 2). Arrivent en tête les pollutions par des éléments traces métalliques (ETM) à hauteur de 35%, suivies par les huiles minérales (24%), les hydrocarbures (21%) dont 11% d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), ou par d'autres composés tels que les hydrocarbures polychlorés, les phénols ou les cyanures (EEA, 2014).

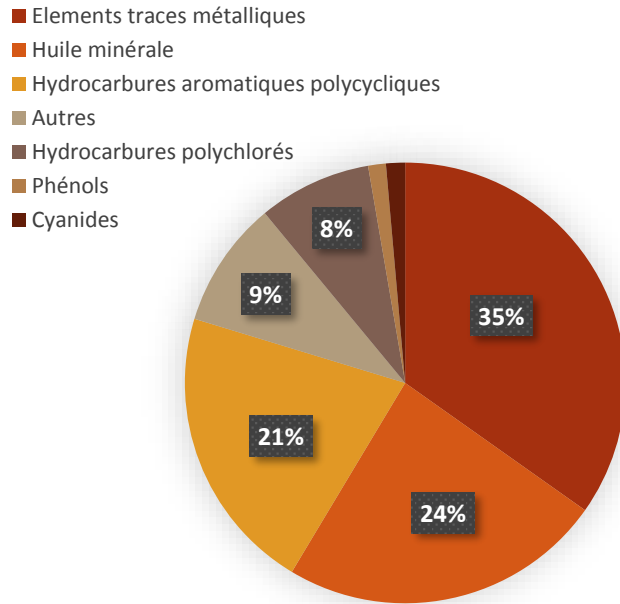


Figure 2 : Principaux contaminants retrouvés dans les sols en Europe, adapté de EEA (2014).

Les éléments traces métalliques et les polluants organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont ainsi fortement représentés sur les sites pollués. Les uns et les autres ont également une dynamique et des propriétés chimiques très différentes. C'est pourquoi nous avons choisi un polluant modèle pour chacune de ces deux familles de molécules pour étudier leur impact sur la rhizodéposition.

2. Principaux polluants du sol

2.1. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

2.1.1. Caractéristiques des HAP

Les HAP sont des molécules organiques composées uniquement de carbone et d'hydrogène qui possèdent au moins deux noyaux benzéniques (Menzie *et al.*, 1992). Il en existe plusieurs centaines mais l'US-EPA (United States Environmental Protection Agency) en a sélectionné 16 particulièrement préoccupants pour leur caractère polluant, leur toxicité et leur récurrence sur des sites contaminés. Parmi ces 16 HAP prioritaires, six sont considérés comme des substances cancérigènes ou potentiellement cancérigènes (Figure 3) pour les Hommes (Lang *et al.*, 2014).

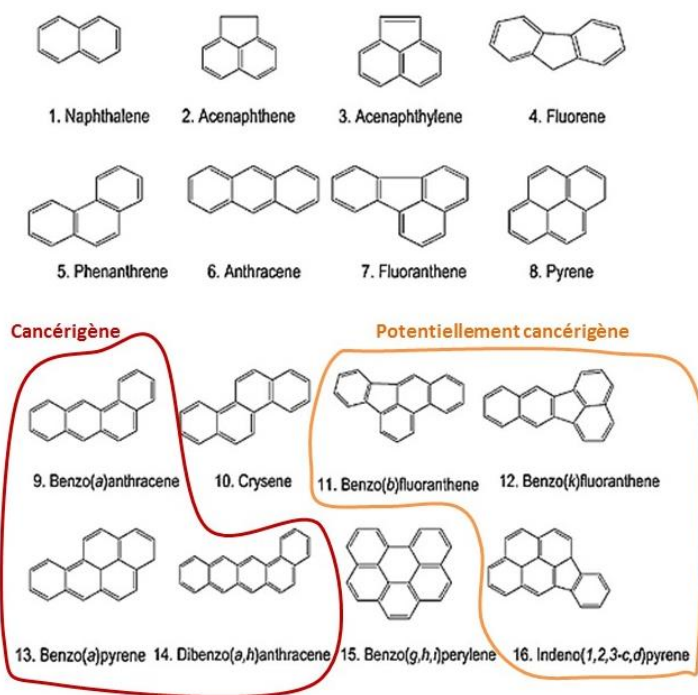


Figure 3 : Formules topologiques et noms des 16 HAP mis en avant par l'US-EPA (d'après Bruzzone *et al.*, 2010).

2.1.2. Origines des HAP

On distingue trois types de HAP, d'origines différentes :

- **Pyrolytique** : Ces HAP sont issus de la combustion partielle de matières organiques. La matière organique peut être d'origine (i) naturelle suite par exemple à des feux de forêt ou des éruptions volcaniques ou (ii) anthropique notamment issue de la combustion d'énergie fossile, de la matière organique ou de déchets (Mandalakis *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2014).
- **Pétrogénique** : Les HAP d'origine pétrogénique proviennent du pétrole brut et de ses produits dérivés suite à leur distillation. C'est le cas de l'essence, du fuel ou du bitume, (Wang *et al.*, 2014).
- **Diagénétique** : Les HAP d'origine diagénétique résultent de la transformation des sédiments en roche sédimentaire. Ils sont formés *in situ* dans les sédiments lors de la maturation thermique des matières organiques (Silliman *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2014).

Cependant, les origines pétrogéniques et diagénétiques sont négligeables. Du fait des émissions domestiques et industrielles, les HAP d'origine pyrolytique anthropique sont la source principale de HAP dans l'environnement (Citepa & Secten, 2017; Menzie *et al.*, 1992).

2.1.3. Dynamique des HAP dans le sol

Lors de l’introduction de molécules de HAP dans un sol, celles-ci peuvent interagir avec les différents constituants du sol et peuvent être volatilisées, réagir avec la phase solide du sol, être lixiviées ou lessivées par les précipitations, être dégradées ou encore bio-accumulées par un organisme vivant (Semple *et al.*, 2003). Ces différentes réactions sont dépendantes de la nature physico-chimique du composé : conformation, nombre de cycles, masse molaire, etc (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des 16 HAP prioritaires, (Mackay *et al.*, 2006).

Molécule	Abréviation	Nombre de cycle	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité dans l’eau (mg.L ⁻¹ à 25°C)	Constante de la loi de Henry (Pa.m ³ .mol ⁻¹)	K _{ow}
Naphtalène	NAPH	2	128	31	43	3.70
Acénaphthylène	ACY	3	152	16.1	8.4	4.06
Acénaphène	ACE	3	154	3.80	12.2	3.92
Fluorène	FLU	3	166	1.90	7.9	4.18
Phénanthrène	PHE	3	178	1.10	3.2	4.57
Anthracène	ANT	3	178	0.045	4.0	4.45
Fluoranthène	FLA	4	202	0.26	1.0	5.20
Pyrène	PYR	4	202	0.132	0.9	5.23
Benzo(a)anthracène	BaA	4	228	0.011	0.6	5.66
Chrysène	CHY	4	228	0.002	0.1	5.86
Benzo(b)fluoranthène	BbF	5	252	0.0015	0.05	6.57
Benzo(k)fluoranthène	BkF	5	252	0.0008	0.02	6.84
Benzo(a)pyrène	BaP	5	252	0.0038	0.01	6.07
Dibenzo(ah)anthracène	dBahA	5	278	0.0006	1.72×10 ⁻⁴	6.70
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	IcdP	6	276	0.00005	4.8×10 ⁻³	6.73
Benzo(ghi)pérylène	BghiP	6	276	0.00026	2.9×10 ⁻²	6.60

2.1.3.1. Volatilisation

La volatilisation des HAP est dépendante des propriétés physico-chimiques de la molécule : sa taille, sa structure et sa composition. Plus la molécule possédera de cycles et moins sa volatilité sera importante. Ce paramètre est mesuré au travers de la constante de Henry qui quantifie la capacité d’une molécule à se partager entre deux phases, l’air et l’eau. La substance est dite volatile si sa constante de Henry est supérieure à 1 Pa.m³.mol⁻¹. Le benzo(a)pyrène possède une constante de Henry de 0.01, de 3.2 pour le phénanthrène et de 43 Pa.m³.mol⁻¹ pour le naphtalène

(Tableau 1). Ainsi, la première molécule n'est pas volatile tandis que la dernière est très volatile (Mackay *et al.*, 2006). La volatilisation est le plus souvent négligeable sauf pour certains HAP tels que le naphthalène (Cousins & Jones, 1998; Park *et al.*, 1990).

2.1.3.2. Interactions avec la phase solide du sol

Les molécules de HAP peuvent interagir avec les matières organiques et minérales du sol. Les principales interactions sont la sorption et la diffusion.

- La sorption

Dans la sorption on distingue

l'absorption et l'adsorption.

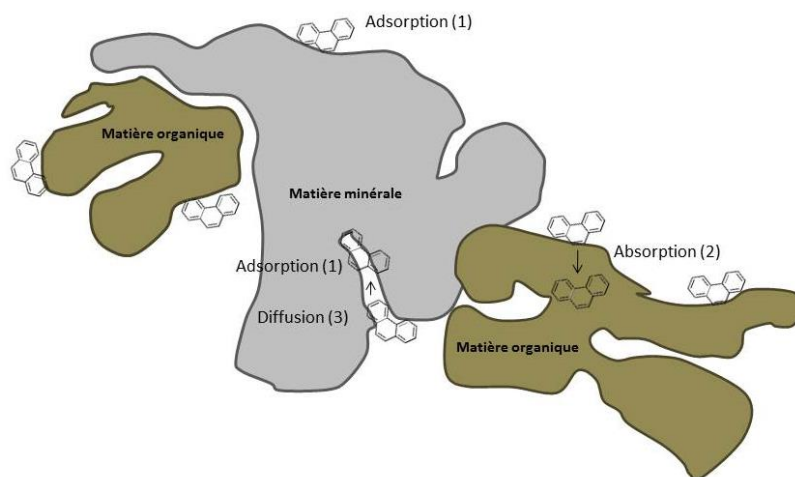


Figure 4 : Mécanismes d'interaction des contaminants organiques avec le sol (d'après Semple *et al.*, 2003).

L'adsorption (1) (Figure 4) est un phénomène de surface permettant l'établissement de liaisons faibles (liaisons hydrogènes et forces de Van der Waals) entre le HAP, et les composantes du sol et plus particulièrement avec la matière organique (Murphy *et al.*, 1990). L'adsorption est un phénomène relativement rapide, de l'ordre de quelques minutes à quelques heures (Dec & Bollag, 1997; Gevao *et al.*, 2000). Elle est réversible et le mécanisme antagoniste est appelé désorption. Plus la liaison entre le polluant et le sol est longue, et plus la réversibilité diminue : C'est le « vieillissement ». Ainsi, plus le vieillissement est important et plus la biodisponibilité et l'extractibilité du polluant diminuent (Reid *et al.*, 2000).

L'absorption (2) (Figure 4) est un phénomène de transfert d'une molécule de l'extérieur d'une phase solide, liquide ou gazeuse vers l'intérieur (Honeyman & Santschi, 1988). Ce phénomène est beaucoup plus lent que le précédent et ces molécules seront liées à la matière par des liaisons covalentes (Xing & Pignatello, 1997). Ces liaisons fortes lient les HAP de façon quasi-irréversible dans le sol et plus spécifiquement avec des constituants de l'humus comme l'acide syringique ou le guaiacol (Dec & Bollag, 1997; Gevao *et al.*, 2000). La sorption est le principal facteur qui empêche une remédiation complète des sols pollués (Bosma *et al.*, 1997).

- **La diffusion**

La diffusion (3) (Figure 4) est un autre mécanisme de transfert des HAP, assez lent et contrôlé par un gradient de concentrations. Le polluant est transféré de la zone où il est le plus concentré vers la zone où il l’est le moins. Ce mécanisme perdure jusqu’à ce qu’un équilibre soit atteint entre les deux zones. La diffusion peut intervenir sur des particules minérales, organiques ou dans les porosités séparant deux particules.

2.1.3.3. Lixiviation & lessivage

La lixiviation est un phénomène d'entraînement en profondeur à travers le sol des molécules d’HAP et ce jusqu’aux nappes phréatiques. C’est l’eau provenant des précipitations qui va permettre le transport du polluant.

Le lessivage est également un phénomène de transport des HAP mais celui-ci intervient uniquement en surface. Ainsi, les eaux de surface vont entraîner les polluants liés à des particules solides non solubles *via* un phénomène de ruissellement vers les cours d’eau.

Ces deux phénomènes dépendent essentiellement de la nature du HAP et de sa solubilité dans l’eau. Ainsi, moins la molécule possédera de cycles et plus elle sera hydrophile, et donc soluble dans l’eau. Une substance est considérée comme non-hydrosoluble si sa solubilité dans l’eau est inférieure à 1 mg L^{-1} , ce qui est le cas pour 11 des 16 HAP prioritaires (Tableau 1). Le naphthalène est insoluble dans l’eau (31 mg.L^{-1}), le phénanthrène l’est peu (1.10 mg.L^{-1}) tandis que l’indéno(1,2,3-cd)pyrène est fortement soluble ($0.00005 \text{ mg.L}^{-1}$) (Mackay *et al.*, 2006).

2.1.3.4. Dégradation

La dégradation des HAP peut se faire de manière abiotique (photodégradation et oxydation) ou biotique. Cependant, dans le sol, les processus biotiques sont majoritaires par rapport aux processus abiotiques (Ellis *et al.*, 1991; Smith, 1991).

• **La dégradation abiotique des HAP**

La dégradation abiotique des HAP est majoritairement due à des réactions spontanées d’oxydation par des molécules d’ozone ou d’oxygène singulet, une molécule d’ O_2 sous son état excité. (Biache *et al.*, 2011; Juhasz & Naidu, 2000). Ils peuvent aussi être dégradés par les rayonnements ultra-violets émis par le soleil : c’est la photodégradation. Cependant cette réaction est limitée aux molécules de surface, présentes à moins d’un millimètre sous la surface

du sol (Hebert & Miller, 1990). On peut également citer l'hydrolyse des HAP qui a lieu dans la solution du sol et consiste en l'ajout d'un groupement hydroxyle sur le polluant. Cette réaction est peu présente dû au caractère peu soluble des HAP. Enfin le dernier mécanisme de dégradation est la réduction. C'est une réaction assez rare puisqu'elle nécessite des conditions strictes d'anaérobies.

- **La biodégradation des HAP**

De nombreux organismes végétaux, animaux et microscopiques ont également la capacité de dégrader les HAP *via* leurs enzymes. Cette dégradation est dépendante des conditions environnementales de température et d'humidité et des propriétés du sol telles que le pH, le ratio C/N, la texture, la structure, l'oxygénation du sol ou encore la teneur en éléments nutritifs qui sont des caractéristiques déterminantes de l'activité enzymatique et de la croissance des microorganismes. La dégradation bactérienne se fait essentiellement en conditions aérobie par oxydation des cycles aromatiques des HAP mais peut aussi être réalisée en conditions anaérobies. En ce qui concerne les champignons, leur action sur la dégradation des HAP se fait aussi par oxydation tout comme chez les végétaux *via* notamment des peroxydases. Les végétaux peuvent faciliter la dégradation des HAP de façon indirecte en libérant des rhizodépôts facilement dégradables qui favorisent la croissance et l'activité des microorganismes qui, comme on l'a dit précédemment, possèdent plusieurs enzymes capables de dégrader les HAP (Osorio Vega, 2007a). Enfin, les associations symbiotiques entre le système racinaire des végétaux et des champignons mycorhiziens permettent d'augmenter le volume de sol rhizosphérique et ainsi étendre l'influence des racines (Hinsinger *et al.*, 2005).

2.1.3.5. Bio-accumulation

La bioaccumulation est définie comme la capacité d'un organisme à prélever et concentrer un élément ou une molécule, ici les HAP. Ces derniers sont accumulés de manière significative dans les racines des plantes (Duarte-Davidson & Jones, 1996). Le transfert des HAP et des molécules organiques en général dans les racines dépend essentiellement du caractère lipophile de la molécule et également de la teneur en lipide des membranes de la plante. Il existe une forte corrélation positive entre la concentration en HAP dans les racines et leur teneur en lipide (Gao & Zhu, 2004). Le caractère lipophile des molécules organique peut être appréhendé grâce à leur coefficient de partage n-octanol/eau, le Kow (Tableau 1). Il est mesuré en calculant le rapport des concentrations à l'équilibre de la molécule d'HAP étudiée dans deux solvants non miscibles : l'n-octanol et l'eau. Une substance est liposoluble si son Kow est supérieur à 3 et

sera fortement retenue dans les racines si son Kow est supérieur à 4 (Wild & Jones, 1992). Les 16 HAP prioritaires ont un Kow supérieur à 3 et sont donc liposolubles et 14 d'entre-eux ont un Kow supérieur à 4 (Tableau 1). On peut citer le phénanthrène dont le Kow est égal à 4.57.

2.2. Eléments traces métalliques (ETM)

2.2.1. Caractéristiques des ETM

La croûte terrestre est constituée à 99 % d'oxygène, de silice, d'aluminium, de fer, de calcium, de sodium, de potassium, de magnésium, de titane et de phosphore (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti et P). Le reste des éléments sont regroupés dans le tableau périodique des éléments sous le nom d'éléments traces (ET) puisqu'ils constituent individuellement moins de 0,1 % de la croûte terrestre. Si les éléments traces sont des métaux alors ils sont appelés éléments traces métalliques (ETM). Ils sont présents naturellement dans les sols et certains sont indispensables aux êtres vivants en faibles concentrations : ils sont alors appelés oligoéléments. Les ETM peuvent aussi être appelés métaux lourds lorsque leur masse volumique est supérieure à 5 g.cm⁻³).

2.2.2. Toxicité des ETM

Les plus connus pour leur dangerosité et leur toxicité sont le plomb (Pb), le mercure (Hg), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le nickel (Ni) et le zinc (Zn). La plupart du temps ces éléments sont retrouvés à l'état de traces, mais parfois suite à des processus naturels ou anthropiques, on les retrouve à des teneurs bien plus importantes, c'est dans ce cas qu'on parle de contamination. Les ETM sont des contaminants très persistants car ils ne se dégradent pas dans l'environnement en opposition aux polluants organiques et ont tendance à se lier aux matrices dans lesquelles ils se trouvent, notamment avec les constituants des sols. L'Homme est principalement exposé à ces polluants au travers de son alimentation et, ingérés en quantités trop importantes, les ETM ont des conséquences néfastes et irréversibles pouvant aller jusqu'à la mort de l'individu.

Si nous prenons l'exemple du Cd, ce dernier s'accumule dans les reins conduisant à leur dysfonctionnement. Il est très persistant dans l'organisme puisqu'il a une demi-vie de 10 à 30 ans dans le corps humain (EFSA, 2009). Il est également très ressemblant structurellement au calcium et peut ainsi être métabolisé à sa place et provoquer de l'ostéoporose. En cas d'inhalation, il peut entraîner des pneumonies aiguës et des œdèmes pulmonaires pouvant causer la mort (World health Organization, 2010). L'Agence Internationale de la Recherche sur

le Cancer (IARC) l’a classé dans le groupe 1 des substances carcinogènes pour les humains puisqu’il provoque des cancers aux poumons, aux reins et à la prostate.

Pour éviter ces pathologies, la dose hebdomadaire tolérable (DHT) a été fixée à $2.5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids corporel. Pour que ce seuil soit respecté, la Commission Européenne a fixé en 2014 des concentrations maximales en Cd allant de 0.005 à 3 mg.kg^{-1} selon les denrées alimentaires (La Commission Européenne). Cependant, ce seuil est régulièrement dépassé par les personnes vivant dans certaines régions contaminées, par les fumeurs ou encore les végétariens (EFSA, 2009).

2.2.3. Origines des ETM

2.2.3.1. Origines naturelles des ETM

Les ETM d’origine naturelle proviennent essentiellement des roches mères. Le Cd est par exemple retrouvé dans la croûte continentale supérieure à hauteur de 0.1 mg.kg^{-1} (Taylor & McLennan, 1995). Ces ETM sont ensuite retrouvés dans les sols suite aux processus de pédogenèse. Plus ponctuellement, ils peuvent aussi résulter d’un dépôt atmosphérique. En effet, les métaux peuvent être présents dans l’air sous forme de particules mesurant le plus souvent entre 0.1 et $10 \mu\text{m}$ de diamètre (Bowen, 1979). La principale source de dépôt atmosphérique d’origine naturelle est l’activité volcanique.

2.2.3.2. Origines anthropiques des ETM

Le Cd est retrouvé dans 6 % des sols pollués référencés (Basol, 2013) et les sources anthropiques de cette pollution sont très variées. Nous pouvons citer les activités industrielles comme la métallurgie, les activités minières, l’élimination de déchets hautement métalliques, le carburant automobile, les combustions, les pigments ou encore les activités agricoles (application d’engrais, fumier, boues d’épuration, pesticides et irrigation par les eaux usées) (Alloway, 2013; Rodríguez-Eugenio *et al.*, 2018). Le Cd est utilisé dans de nombreuses applications industrielles comme certaines batteries rechargeables ou certains pigments. Les principales origines de la pollution aux ETM sont les retombées atmosphériques dues à la métallurgie et autres activités industrielles qui sont la cause de 39 à 41 % des terres polluées au Cd (GisSol, 2011). Dans l’ancien bassin minier du Nord de la France, autour d’une usine de production de zinc et de plomb, la teneur en Cd atteint 2402 mg.kg^{-1} . Dans les sols agricoles, la principale source de Cd provient de l’application d’engrais phosphatés, à l’origine de 74% de l’apport de Cd sur les sols cultivés français mais également de déchets organiques, de composts urbains et surtout des boues d’épuration des eaux usées (Sterckeman *et al.*, 2018).

2.2.4. Dynamique des ETM dans le sol

Dans la solution du sol, les ETM peuvent être présents sous leur forme libre ou complexée. L'une ou l'autre forme peut interagir avec la phase solide du sol par des phénomènes de précipitation/dissolution ou de sorption/désorption (Figure 5). Généralement dans les sols, la majeure partie des ETM est associée à la phase solide, le reste est dissous dans la solution du sol (Christensen & Haung, 1999). Cependant, seule la fraction solubilisée d'ETM peut interagir avec les racines ou les microorganismes du sol. Cette fraction est appelée fraction biodisponible.

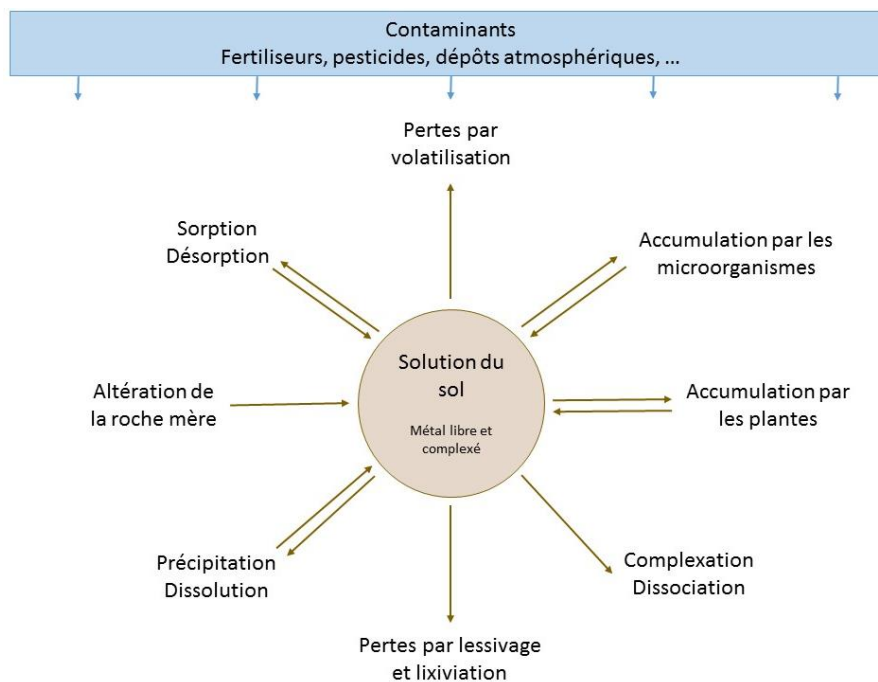


Figure 5 : La dynamique des ETM dans le sol, adapté de Alloway, (1995); Peterson and Alloway, (1979).

2.2.4.1. Complexation des ETM

Les cations métalliques peuvent se complexer avec un anion, c'est le complexe le plus simple qu'on puisse trouver. Ils peuvent aussi se complexer avec des halogènes. C'est le cas de l'ion Cd^{2+} qui peut se lier avec du chlore (CdCl^+ , CdCl_2 , CdCl_3 et CdCl_4) du brome (CdBr^+) et de l'iode (CdI^+). Il peuvent également se complexer en sol alcalin (CdHCO_3^+) et se lier fortement avec des phosphates, des sulfates ou des nitrates (CdSO_4 , CdNO_3^+ , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ et CdHPO_4) (Alloway, 1995; Helmke, 1999; Traina, 1999).

Les ETM peuvent former des complexes plus élaborés en se liant avec des substances humiques et des molécules organiques chélatantes comme des acides organiques (acide citrique, oxalique,

acétique, succinique...) et des acides aminés (Ren *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2002). Ces complexes prédominent dans la solution du sol dû à la forte proportion de substances humiques (Gardiner, 1974).

2.2.4.2. Sorption/désorption des ETM

Les mécanismes de sorption peuvent être plus ou moins forts selon que la liaison se fasse grâce à des forces électrostatiques qui sont des forces faibles ou *via* des interactions chimiques qui lient plus fortement (Christensen & Haung, 1999). La sorption est influencée par les propriétés de la solution et de la phase solide du sol et semble contrôler majoritairement la répartition des ETM dans les sols. Le pH est également un facteur déterminant puisque les protons peuvent entrer en compétition avec les ETM pour l'interaction avec les sites électronégatifs. Leur sorption augmente considérablement avec l'accroissement du pH du sol (Christensen, 1984; Sauvé *et al.*, 2000). La composition de la phase solide, organique et inorganique, influe aussi grandement sur la sorption. En effet, plus il y a de matière organique dans le sol et plus la sorption est importante. La sorption est le mécanisme majeur qui limite la concentration en ETM dans la solution du sol (Helmke, 1999). Cependant elle est réversible, même si comme pour les HAP cette réversibilité diminue avec le temps à cause du phénomène de vieillissement (Loganathan *et al.*, 2012).

2.2.4.3. Précipitation/dissolution des ETM

La formation de précipités est un autre mécanisme qui intervient dans la dynamique du polluant dans le sol, même s'il a une importance moindre en comparaison des mécanismes de sorption/désorption. Ces précipités peuvent être des phosphates de Pb, de Cd ou d'otavite (CdCO_3). Il existe aussi des mécanismes de co-précipitation qui sont formés à partir d'un ETM et d'un autre élément tel qu'un oxyde de fer, de manganèse ou de l'argile minérale. Le produit de solubilité (K_s , sans dimension), est la constante d'équilibre de la dissolution d'un solide dans un solvant. Plus le K_s est important et plus la précipitation sera faible et inversement. Par exemple, le NaCl qui est très soluble a un K_s égal à 38.98. En comparaison de la solubilité des sels de Cd tels que le CdCO_3 , le $\text{Cd}(\text{OH})_2$, et le $\text{Cd}_3(\text{PO})_4$ qui ont respectivement un K_s égal à 10^{-12} , 10^{-14} , et 10^{-33} (Alloway, 1995).

2.2.4.4. Bioaccumulation

La bioaccumulation est la capacité chez certains organismes notamment des végétaux ou des microorganismes d'absorber et de concentrer certaines substances chimiques, comme ici les

ETM. Les plantes peuvent ainsi absorber des ETM biodisponibles du sol afin de les accumuler. Ce phénomène est plus ou moins important selon l’organisme considéré et certaines plantes dites « hyperaccumulatrices » peuvent accumuler des concentrations 100 fois supérieures aux autres. C’est-à-dire qu’elles peuvent tolérer et accumuler des concentrations en ETM de l’ordre de 1000 mg.kg^{-1} de matière sèche pour le nickel, le cuivre, le cobalt, le chrome ou de plus de $10\,000 \text{ mg.Kg}^{-1}$ pour le zinc et le manganèse (Rhodes, 2013).

En ce qui concerne le Cd, cet ETM est le plus souvent assimilable par la plante lorsqu’il est présent dans la solution du sol sous sa forme Cd^{2+} (Lin *et al.*, 2016). La quantité de Cd bioaccumulée est gouvernée par les mécanismes précédemment décrits qui limitent la concentration en Cd sous sa forme libre dans la solution du sol. Ces ions libres sont absorbés dans les racines par le flux d’eau servant aux mécanismes de transpiration. Cependant, si le taux d’absorption des métaux par une plante dépasse le taux d’arrivée par convection, une zone d’épuisement se crée autour de la racine. Intervient alors un gradient de concentration qui favorise la diffusion des métaux du sol vers la racine (Das *et al.*, 1997).

3. Management et remédiation des sols pollués

3.1. Techniques biologiques et non biologiques de management des sols pollués

Chaque année, d’importantes quantités de sol sont traitées en France en vue de leur dépollution (3 225 000 tonnes en 2010). Les sols peuvent même subir plusieurs traitements successifs (Cadiere, 2012). Les procédés employés peuvent être de plusieurs natures : ils peuvent être physiques, c’est-à-dire qu’ils utilisent des fluides qui transportent la pollution ou l’immobilisent. Ils peuvent être thermiques et dans ce cas, utiliser la chaleur pour détruire le polluant (incinération) ou pour le rendre inerte (vitrification). Certains traitements chimiques permettent de détruire des contaminants *via* par exemple des réactions d’oxydation, de les rendre inertes (par précipitation), ou encore de les séparer du milieu pollué grâce à des surfactants afin de les entraîner vers une phase liquide qui sera traitée. Un autre procédé de remédiation, biologique, consiste en l’utilisation de bactéries, de champignons ou de végétaux pour dégrader partiellement ou totalement les polluants, les fixer dans le sol ou au contraire les solubiliser pour faciliter leur extraction et leur dispersion (BRGM, 2010). Ces traitements peuvent avoir lieu hors du site (*ex situ*), en procédant successivement à une excavation ou une extraction du sol, et une évacuation vers un centre de traitement (incinérateur, centres d’enfouissement, etc). Ils peuvent aussi avoir lieu sur le site soit en excavant les terres pour les

traiter tout en restant sur place (on site) soit sans excaver (in situ), c'est notamment le cas de la phytoremédiation. (BRGM, 2010).

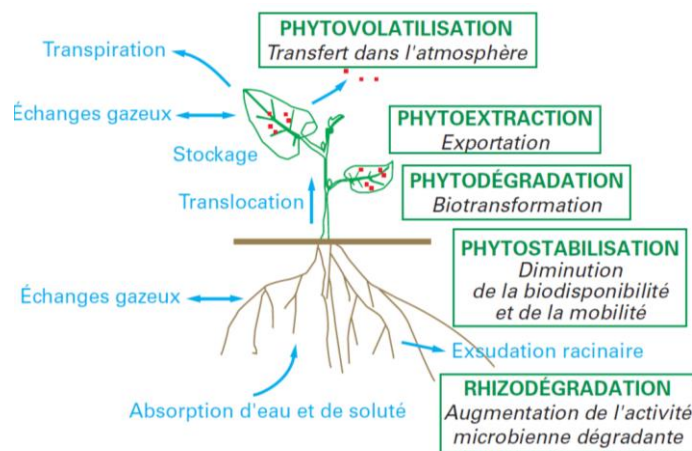
3.2. Végétalisation des sols contaminés

Du fait du grand nombre de sites et sols pollués, et des besoins croissants de production végétale à des fins alimentaires ou non, il est important de valoriser ces sites. Leur végétalisation peut permettre la production de biomasse végétale dans un but non-alimentaire tel que la production de biomatériaux, de composés biochimiques, ou servir de biocarburants ou de biocombustibles tout en permettant la phytoremédiation de ces sites.

La phytoremédiation est alternative aux techniques classiques de dépollution des sols mais peut aussi être utilisée en complément. Elle permet une remédiation in situ des polluants en cultivant directement sur le site. Cette technique peut être utilisée dans de nombreux cas de pollution : présence de métaux, de pesticides, d'explosifs ou encore d'huiles. De plus, l'implantation d'une culture sur un sol limite les effets des aléas climatiques et ainsi limite le lessivage ou l'érosion des sols. Cependant cette technique reste encore peu développée : en 2010, seuls 0,1% des sites dépollués l'ont été grâce à cette méthode (Cadiere, 2012).

Cinq procédés de phytoremédiation ont été identifiés, par lesquels la plante affecte les contaminants du sol (Etim, 2012; US-EPA, 2000a).

Figure 6 : Les 5 principaux procédés de phytoremédiation (Sterckeman et al., 2011)



- Le premier est la phytoextraction (Figure 6) qui consiste en l'absorption et la concentration d'un ou plusieurs ETM du sol par les racines jusqu'aux parties aériennes de la plante où ils seront stockés (US-EPA, 2000b). Le système aérien des plantes peut ensuite être valorisé de plusieurs façons. La biomasse peut être utilisée à des fins non alimentaire et les métaux contenus dans les tissus de la plante peuvent être récupérés afin d'être réinjectés dans l'industrie : ce procédé est appelé agromine (van der Ent et al., 2015).

- La phytovolatilisation permet le prélèvement des contaminants du sol mais aussi des sédiments ou de l'eau par la plante. Ces éléments seront ensuite transformés en une forme volatile qui sera évapotranspirée par les feuilles dans l'atmosphère (US-EPA, 2000b, 2000a). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle peut entraîner une dispersion du polluant dans les écosystèmes adjacents *via* l'atmosphère.
- La phytostabilisation permet quant à elle l'immobilisation des contaminants dans le sol. L'immobilisation est permise par des phénomènes de sorption, de précipitation ou de complexation. La végétalisation du site permet de diminuer les phénomènes d'érosion éolienne qui dispersent les particules de sol et les contaminants. De plus, l'évapotranspiration diminue l'infiltration des eaux de pluie et réduit ainsi les transferts de polluants vers les nappes phréatiques. L'intérêt premier de cette technique est d'éviter la propagation des polluants et non leur remédiation (US-EPA, 2000a).
- La phytodégradation permet comme son nom l'indique la dégradation de molécules organiques complexes prélevées dans le sol en molécules simples. La plante prélève et transporte lesdites molécules qui vont subir des réactions de transformation biochimique dans les tissus de la plante (oxydo-réduction, hydrolyse). Elles sont ensuite associées ou complexées à d'autres composés produits par la plante (acides aminés, sucres, acides organiques) et stockées dans un organe où elles n'interféreront pas avec son fonctionnement métabolique (US-EPA, 2000a).
- Et enfin, la rhizodégradation permet la dégradation des contaminants organiques grâce à la microflore attirée dans la rhizosphère par les composés émis par les racines. Dans cette zone, les microorganismes sont plus nombreux que dans le sol nu et dégradent ainsi les polluants plus facilement (US-EPA, 2000a).

La phytoremédiation est envisageable sur un large panel de contaminants, qu'il s'agisse de métaux, de pesticides, de solvants, d'explosifs, d'huiles ou encore d'hydrocarbures aromatiques. Cependant, la plupart des inconvénients liés à cette technique sont dus aux faibles rendements de la plante : les polluants ont un effet toxique sur la plante engendrant des retards de croissance, une diminution de la photosynthèse et la mise en place de mécanismes de défense entraînant des remédiations beaucoup plus longues que les techniques habituelles pouvant durer plusieurs dizaines d'années (US-EPA, 2000a).

4. Influence des ETM et des HAP sur le fonctionnement des plantes

4.1. Influence des ETM sur le fonctionnement des plantes

4.1.1. Absorption et transfert des ETM dans la plante

Dans la grande majorité des cas, la plante absorbe les ETM sous forme d'ion libre *via* des transporteurs membranaires (Helmke, 1999). Le potentiel membranaire, négatif à l'intérieur de la membrane plasmique constitue un puissant moteur pour l'absorption de cations par ces transporteurs secondaires (Clemens *et al.*, 2002; Hirsch *et al.*, 1998). Les ions métalliques sont absorbés (c'est-à-dire passent dans le symplasma racinaire) *via* les transporteurs membranaires (canaux, pompes, co-transporteurs) situés dans le plasmalemma des cellules racinaires. La plupart des transporteurs identifiés dans l'absorption des nutriments sont les transporteurs de la famille ZIP (Zinc-regulated transporter/Iron-regulated transporter-like Protein) capables de transporter de nombreux cations tels que le Zn, Fe, Mn et Cd. Les transporteurs de la famille Nramp (Natural resistance-associated macrophage protein) sont également impliqués dans le transport des ions métalliques divalents (Guerinot, 2000; Williams *et al.*, 2000).

Ce schéma classique d'absorption peut varier selon les concentrations en éléments dans la solution du sol. La plante possède des mécanismes homéostatiques pour parvenir à maintenir une concentration optimale en éléments essentiels et limiter l'absorption des non-essentiels. En effet, les ETM peuvent être divisés en deux groupes : Le premier réunit les ETM essentiels, c'est-à-dire les ETM qui sont nécessaires au fonctionnement de différents mécanismes physiologiques comme le cuivre ou le zinc même si à haute concentration ces métaux peuvent être toxiques. Le deuxième regroupe les ETM non-essentiels qui sont le plus souvent hautement toxiques comme le Cd, le Hg ou le Pb. Pour améliorer la disponibilité des éléments essentiels, la plante émet dans la rhizosphère des molécules capables de modifier leur dynamique dans le sol en facilitant leur absorption (sidérophores) ou au contraire en la limitant grâce à des chélatants (acides organiques, acides aminés) (Dong *et al.*, 2007; Haynes, 1990; Hinsinger, 2001; Jones & Darrah, 1994; Jung *et al.*, 2003; Liao & Xie, 2004; Salt *et al.*, 1999; Schwab *et al.*, 2005).

Lorsque les métaux sont dans les racines, ceux-ci sont transportés au sein de la plante principalement par la voie symplasmique, c'est-à-dire d'un cytoplasme cellulaire à un autre, ou par la voie apoplastique, *via* les interstices entre les cellules, jusqu'au xylème (Salt & Rauser, 1995; Tester & Leigh, 2001). Le transport de ces ions jusqu'à la sève est un mécanisme contrôlé qui s'effectue *via* des protéines de transport membranaire (Gaymard *et al.*, 1998).

4.1.2. Mécanismes de détoxification des ETM

Lorsque les ETM ont été absorbés par la plante, cette dernière met en place des mécanismes de détoxification pour les rendre inactifs. La première stratégie de détoxification de la plante est l’exclusion de ces molécules *in vivo* en les chélatant grâce notamment à la production d’acides aminés et d’acides organiques mais également à deux familles de polypeptides : les phytochélatines (PCs) et les métallothionines (MTs) (Cobbett, 2000). Les métaux lourds induisent la synthèse de phytochélatines qui rendent les métaux inactifs en les chélatant. Ces molécules ont la structure suivante : $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, n étant le nombre de répétition, compris entre 2 et 11. L’acide aminé terminal est la glycine. Les PCs se lient avec le Cd pour former des complexes dont les masses moléculaires sont comprises entre 2500 et 3600. C’est le groupement thiol (R-S-H) de la cystéine qui permet la chélation du Cd (Grill *et al.*, 1985). Les métallothionines sont elles aussi retrouvées dans le règne végétal mais ont une importance moindre que les PCs (Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999). Comme ces dernières, elles sont riches en cystéines. Leur formule générale est la suivante : Cys-AA-Cys ou Cys-AA-AA-Cys avec AA étant un acide aminé autre que la cystéine. Il existe de très nombreuses MTs que l’on peut séparer en deux groupes : le premier groupe recense celles retrouvées chez les mammifères tandis que le second celles chez les plantes, les champignons et les invertébrés (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Robinson *et al.*, 1993).

Une autre stratégie de détoxification des ETM est la séquestration dans les organites des cellules et principalement dans les vacuoles (Krämer *et al.*, 2000; Vögeli-Lange & Wagner, 1990). Ce stockage dans la vacuole permet d’inactiver les ETM en les empêchant d’interagir avec les processus de respiration et de photosynthèse (Clemens, 2006). Les ETM y sont complexés par des peptides, des acides organiques, des acides aminés ou encore des dérivés phosphatés (Rauser, 1999). Les ETM sont prélevés par la vacuole sous forme libre ou complexée, par le biais de transporteurs localisés dans le tonoplaste. Ces transporteurs sont par exemple des co-transporteurs H⁺/cation de type CAX (CAtion eXchanger) ou des ATPases de type P, de la sous-famille HMA (Heavy Metal Associated).

4.1.3. Impact des ETM sur le fonctionnement de la plante

La phytotoxicité des métaux est bien documentée et est principalement attribuée à deux effets : (1) Les métaux en excès induisent un stress oxydatif, et (2) par des mécanismes de compétition, les métaux non-essentiels peuvent se substituer à des métaux essentiels (Alloway, 2013).

- **Le stress oxydatif**

La présence de métaux non-essentiels ou la proportion trop importante de métaux essentiels, induit différentes voies de signalisation pour répondre spécifiquement à ces stress (DalCorso *et al.*, 2010). L’une d’entre elles implique la production de molécules ROS (Reactive Oxygen Species) ou ERO (Espèce Réactive de l’Oxygène) en français telle que l’H₂O₂. Ces molécules sont émises lors de l’accumulation de métaux lourds et servent de molécule-signal. La concentration de molécule ROS change le statut oxydo-réducteur de la cellule et induit un stress oxydatif. Les ROS peuvent peroxyder la membrane lipidique, oxyder les protéines, inhiber les enzymes et créer des dommages sur l’ADN et l’ARN (Mittler, 2002). Pour se protéger la plante produit des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase, la peroxydase, la catalase, l’acide ascorbique peroxydase et la glutathione peroxydase (Liu *et al.*, 2009a; Manara, 2012; Mittler, 2002; Xin *et al.*, 2009). Certains acides aminés (proline, bétaine), sucres et polyols permettent également la tolérance par la plante de ce stress oxydatif (Hare & Cress, 1997; Zhang *et al.*, 2007).

- **Compétition avec les métaux essentiels**

En ce qui concerne les mécanismes de compétition, on peut citer le cas de certaines enzymes dont la RuBisCo. Cette dernière possède huit sites actifs organisés autour d’un ion magnésium que le Cd peut remplacer rendant l’enzyme non-fonctionnelle. Le Cd peut aussi se substituer au magnésium central présent dans les pigments de chlorophylle (Küpper & Andresen, 2016). La RuBisCo et la chlorophylle sont toute deux impliquées dans la photosynthèse ce qui explique l’inhibition de ce mécanisme en présence de Cd. La présence de métaux essentiels ou non-essentiels en trop forte quantité entraîne une compétition au niveau des transporteurs de nutriments et peut ainsi provoquer des carences. Par exemple, le Cd diminue la concentration racinaire en zinc, cuivre et manganèse chez l’orge (Vassilev *et al.*, 2002).

4.1.4. Influence des ETM sur la morphologie de la plante

Ces modifications fonctionnelles se traduisent par des symptômes visibles au niveau morphologique (Alloway, 2013). Le développement de la plante est réduit, le système racinaire est plus compact et les feuilles plus petites (Selvam & Wong, 2008; Seregin & Ivanov, 2001). La présence d’ETM tend à réduire le rapport biomasse racinaire sur biomasse aérienne (R/S), indiquant que la plante maintient préférentiellement sa biomasse racinaire plutôt que sa biomasse aérienne (Perriguet *et al.*, 2008; Rellán-Álvarez *et al.*, 2006a). Des colorations anormales apparaissent également : un brunissement des racines et des nécroses et chloroses au

niveau des feuilles (Moustakas *et al.*, 1994; Prasad, 1995; Van Assche & Clijsters, 1990; Vassilev *et al.*, 2002, 2007). Les chloroses seront plus importantes sur les jeunes feuilles tandis que les nécroses seront plutôt visibles sur des feuilles plus anciennes où la concentration en métal y est plus importante (Carrier *et al.*, 2003; Vassilev *et al.*, 1998). Cependant, à faible dose, il est possible d'observer l'effet inverse ou hormèse (Poschenrieder *et al.*, 2013). Ce terme est défini par Helmstädter (2008) comme étant l'effet stimulant de faibles concentrations de substances toxiques sur tout un organisme.

4.2. Influence des HAP sur le fonctionnement des plantes

Les interactions entre les HAP et la plante sont à l'heure actuelle mal connues. On a ainsi peu d'information sur leur absorption et leur transfert au sein de la plante mais également sur leurs mécanismes d'action toxiques.

4.2.1. Absorption et transfert des HAP

Les HAP ont la capacité de s'adsorber à la surface des racines, avant d'être absorbés activement ou passivement (Zhan *et al.*, 2012). La majorité des HAP sont absorbés passivement par diffusion à travers la membrane plasmique (Collins *et al.*, 2006). Leur absorption est dépendante de la nature du composé, et notamment de son K_{ow} et de la composition en lipides de la racine (voir 2.1.3.5). Dans le cas d'un transport passif, les HAP semblent être transportés à travers la membrane plasmique depuis la solution du sol *via* des aquaglycoporines (Zhan *et al.*, 2012). Un transport actif a également été mis en évidence, il semblerait que ce transport se fasse *via* un symport H^+/HAP , une protéine transmembranaire permettant l'influx de 2 molécules différentes (Zhan *et al.*, 2013, 2010). Ce transporteur permettrait l'influx d'un HAP et d'un proton et son action serait facilitée par l'existence d'un gradient électrochimique existant de part et d'autre de la membrane plasmique dû aux protons H^+ .

Tout comme pour les ETM, le transport des HAP dans la plante peut se faire par voie apoplasmiques ou symplasmique jusqu'au xylème mais ces mécanismes sont encore peu connus (Wild *et al.*, 2005; Zhan *et al.*, 2010). Leur transport est dépendant de leur solubilité avec les membranes plasmiques riches en lipides mais également de leur K_{ow} (Macfarlane, 1995). En effet, ce sont les molécules qui ont un K_{ow} compris entre 2 et 4 qui sont le plus susceptibles d'être transloquées dans les parties aériennes (Duarte-Davidson & Jones, 1996).

4.2.2. Impact des HAP sur le fonctionnement de la plante

Les mécanismes de toxicité des HAP envers les plantes sont pour l'instant assez mal compris. La toxicité dépend du type de HAP et de l'espèce de plante (Baek *et al.*, 2004; Wittig *et al.*, 2003). Les HAP entraînent essentiellement une diminution de la photosynthèse et l'induction d'un stress oxydatif (Liu *et al.*, 2009b; Oguntimehin *et al.*, 2008).

La production de molécules ROS est ainsi commune à différents stress abiotiques, comme l'exposition aux ETM décrite précédemment. Elle cause par exemple des dommages par peroxydation au niveau des lipides (Liu *et al.*, 2009b). En grande quantité, la production de ROS peut aussi conduire à la mise en place par la plante de « réponses hypersensibles » qui se matérialisent par une brûlure localisée des tissus résultant d'une accumulation d' H_2O_2 . Ces zones nécrotiques permettraient d'endiguer localement la propagation des polluants dans la plante (Lamb & Dixon, 1997).

4.2.3. Mécanismes de détoxification des HAP

La plante dispose de mécanismes permettant de détoxifier les HAP en dégradant le polluant ou en le séquestrant. Ainsi, elle peut augmenter la polarité du polluant organique afin de le déplacer, par liaison notamment avec le glucose ou le glutathion. Les complexes sont ensuite séquestrés dans les vacuoles (McCutcheon & Schnoor, 2004; Shimabukuro, 1985). Certaines plantes, notamment le blé, la laitue, le soja et la tomate, peuvent métaboliser des HAP comme le fluoranthène et le benz[a]pyrène (Kolb & Harms, 2000; Sandermann *et al.*, 1984). Les métabolites formés sont conjugués à des molécules de glucose, d'acide glucuronique et d'autres composants cellulaires. Ces métabolites issus de la dégradation des HAP sont également retrouvés chez des plantes non-exposées au polluant.

4.2.4. Influence des HAP sur la morphologie de la plante

L'impact des HAP sur le fonctionnement de la plante se traduit par des modifications de leur morphologie, de leur développement et de leur fonctionnement. Visuellement, les symptômes sont une chlorose des feuilles et l'apparition de tâches blanc qui évoluent vers des lésions nécrotiques (Figure 7) (Alkio *et al.*, 2005).



Figure 7 : Feuille d'*A. thaliana* exposée au PHE (1.5 mM) pendant 34 jours (Alkio *et al.*, 2005).

La présence de HAP provoque une inhibition de la germination ainsi qu'une réduction de la croissance des racines et du système aérien. Des plants de concombre exposés à 300 μM de phénanthrène (PHE) souffrent d'une diminution de la biomasse sèche du système aérien de 50 %. En revanche, cette diminution est moins importante (-25 %) pour les racines (Ahammed *et al.*, 2012). Cette diminution, plus importante dans le système aérien que racinaire, peut être mesurée grâce au ratio R/S (Root/Shoot) qui est le rapport entre la biomasse racinaire sur la biomasse aérienne. Et en présence de PHE ce rapport augmente indiquant une modification de l'allocation de la biomasse végétale en faveur des racines par rapport aux parties aériennes (Dupuy *et al.*, 2016). La présence de HAP provoque également des modifications morphologiques des racines telles que la diminution du nombre de poils racinaires, réduisant ainsi la surface d'échange avec le sol qui peut alors induire des retards dans le développement de la plante (Alkio *et al.*, 2005). La biomasse des racines diminue mais celles-ci s'épaississent tandis que leur longueur diminue (Alkio *et al.*, 2005; Kummerová *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2009a).

5. Rhizodéposition

Les racines ont pour but principal l'absorption de nutriments, d'eau et un rôle mécanique d'ancrage de la plante dans le sol. Elles modifient également le sol de façon physique, chimique et biologique. Ce volume de sol affecté par la présence des racines d'une plante en développement est appelé rhizosphère (Hiltner, 1904). Les interactions qui interviennent entre le sol, les racines et les microorganismes sont regroupées au sein du terme « effet rhizosphérique ».

Ces modifications au sein de la rhizosphère sont dues à la libération de divers composés organiques et inorganiques, il s'agit de la rhizodéposition (Lynch, 1995). Elle n'est pas négligeable puisqu'elle représente environ 11 % du carbone net fixé par la plante et 27 % du carbone alloué aux racines (Jones *et al.*, 2009). La grande majorité de ces molécules sont organiques et dérivent de la photosynthèse. Leur composition et leur quantité varie selon le type de plante, sa physiologie et selon divers facteurs biotiques et abiotiques. A l'inverse, la rhizodéposition affecte les composants de la rhizosphère : elle peut ainsi modifier la matrice du sol, la quantité et la composition en microorganismes, ou la disponibilité des nutriments et des polluants. Ces modifications permettent une meilleure pénétration des racines dans le sol, une absorption améliorée des nutriments ou une exclusion des polluants empêchant leur absorption par la plante.

5.1. Caractéristiques des rhizodépôts

Différentes classifications des rhizodépôts existent en fonction de leur poids moléculaire ou de leur mode d’émission dans la rhizosphère. Nous allons ici utiliser une classification basée sur le mode d’émission de ces molécules selon laquelle on peut diviser les rhizodépôts en quatre familles: les exsudats racinaires au sens strict ou molécules diffusées, les molécules secrétées, les molécules excrétées et les débris racinaires (Grayston *et al.*, 1997; Nguyen, 2003).

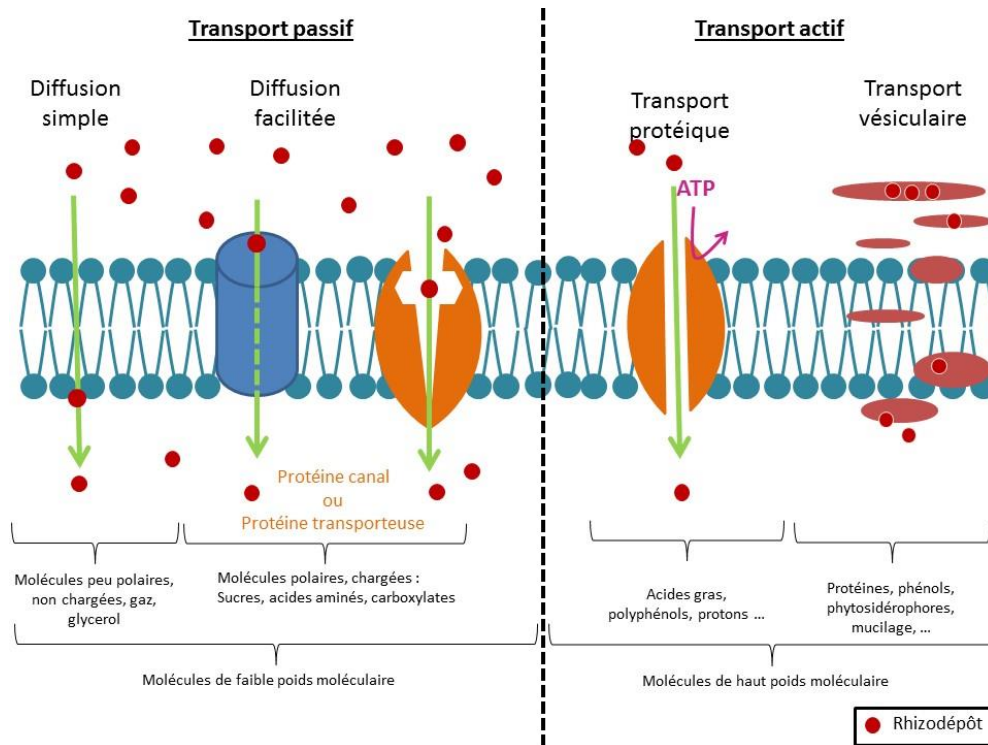


Figure 8 : Principaux mécanismes de rhizodéposition des composés à travers la membrane cellulaire de la plante, adapté de Badri and Vivanco, (2009) ; Bertin *et al.* (2003).

5.1.1. Molécules diffusées

Les molécules diffusées sont des rhizodépôts de bas poids moléculaire, peu polaires ou non chargés et communément appelées exsudats racinaires au sens strict (Jones *et al.*, 2009; Rovira, 1979). Il s’agit en majorité de sucres, d’acides organiques ou encore d’acides aminés (Uren, 2007). Le transport passif de la plupart de ces composés comme les sucres, les acides aminés ou les acides organiques de bas poids moléculaire est assuré par des transporteurs membranaires de type protéine canal ou protéine transporteuse. Cette diffusion est dite facilitée et est permise grâce à un gradient de concentration qui a lieu entre l’intérieur de la racine qui est concentré en molécules, de l’ordre du millimolaire, et la solution du sol qui est peu concentrée, de l’ordre du micromolaire (Badri & Vivanco, 2009). Si ces molécules sont de petite taille, polaires et non chargées alors leur transport peut aussi se faire par diffusion à travers les lipides membranaires

qui sont de nature perméable (Guern *et al.*, 1987; Marschner, 1995; Sanders & Berthke, 2000). On appelle ce phénomène la diffusion simple (Figure 8) et il dépend principalement de la perméabilité des lipides membranaires et du pH du cytosol (Badri & Vivanco, 2009; Guern *et al.*, 1987; Marschner, 1995; Sanders & Berthke, 2000). Que le transport se fasse par diffusion simple ou facilitée, il ne demande pas d'apport d'énergie par la plante.

Certains des exsudats, tels que des sucres et des acides aminés sont ensuite réabsorbés par la plante (Jones & Darrah, 1993; Mühling *et al.*, 1993). Ces influx et efflux d'exsudats racinaires interviennent de façon simultanée. Cependant, contrairement à l'exsudation, la réabsorption est un mécanisme actif qui nécessite la consommation d'énergie.

5.1.2. Molécules secrétées

Les molécules secrétées sont majoritairement des polysaccharides, des phospholipides, des protéines, des peptides (sidérophores), des protons ou encore des électrons et facilitent les processus externes à la plante comme l'acquisition de nutriments (Uren & Reisenauer, 1988).

Certains de ces composés, tels les polysaccharides, les protéines et les phospholipides constituent le mucilage (Bacic *et al.*, 1987; Read *et al.*, 2003). Son principal rôle est de faciliter le contact entre les racines et le sol en formant une pellicule gélatineuse autour des racines. Sa présence améliore la stabilité des agrégats présents dans le sol et, à plus long terme, favorise entre autres l'aération du sol, la croissance racinaire, diminue l'érosion, augmente la solubilité des éléments du sol dans les solutés et favorise les transferts de gaz (Guckert *et al.*, 1975; Morel *et al.*, 1990; Read *et al.*, 1999). Il est secrété par les couches externes de la coiffe racinaire (Paull & Jones, 1975). Sa production est réalisée successivement par le réticulum endoplasmique avant d'être complétée dans l'appareil de Golgi. Cet organite permet le transport du mucilage grâce à ses vésicules qui subissent une exocytose (Figure 8) (Morré *et al.*, 1967). Contrairement aux rhizodépôts diffusés, cette sécrétion est active et nécessite une dépense d'énergie de la plante. (Badri & Vivanco, 2009; Bertin *et al.*, 2003)

Les sidérophores produits par la plante sont des peptides capables de chélater le fer ainsi que certains ETM. Ils sont émis en réponse à une carence en fer ou en zinc pour faciliter l'assimilation de ces éléments (Haynes, 1990; Jones & Darrah, 1994). Leur production fait suite à l'activation de gènes induits spécifiquement dans les racines déficientes en fer (Murata *et al.*, 2006). La production des sidérophores est limitée aux plantes de la famille des graminées qui disposent de systèmes de transporteurs capables d'absorber le complexe « sidérophore-fer » et d'en faciliter l'absorption.

Tout comme les sidérophores, certaines enzymes secrétées par les racines ont pour but de faciliter l'absorption des nutriments par la plante. C'est le cas des amylases qui digèrent les polysaccharides en unités plus petites ou encore les protéases qui coupent les liaisons peptidiques des protéines. Une fois les polysaccharides coupés en unités de glucose par exemple, ces molécules de bas poids moléculaire sont plus facilement assimilables par la plante (Narasimhan *et al.*, 2003; Rovira, 1979). Cependant, la production de ces enzymes est limitée par rapport à celles produites par les microorganismes environnants (George *et al.*, 2008). Ces protéines sont émises dans la rhizosphère *via* un transport vésiculaire (Figure 8) (Badri & Vivanco, 2009; Bertin *et al.*, 2003).

Les rhizodépôts peuvent également être des composés toxiques : des polyphénols, des radicaux libres, des phytoalexines ayant une action antimicrobienne (Hartwig *et al.*, 1991; Lameta & Jay, 1987) et également des molécules allélopathiques phytotoxiques qui limitent le développement des autres plantes à proximité (Dakora & Phillips, 2002). Ces molécules sont principalement secrétées par des transporteurs protéiques (Figure 8) nécessitant la consommation d'ATP (Badri & Vivanco, 2009).

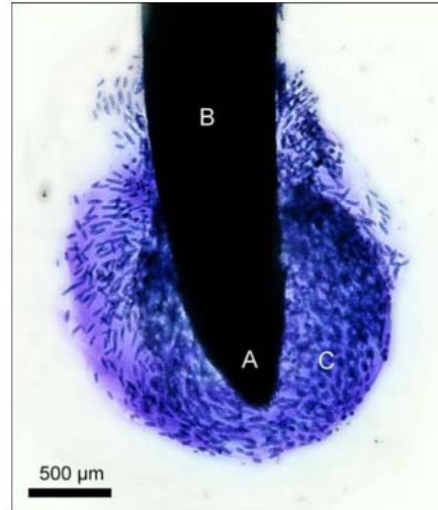
5.1.3. Molécules excrétées

Tout comme les molécules secrétées, les molécules excrétées sont émises activement dans la rhizosphère et ce transport protéique (Figure 8) s'accompagne de consommation d'ATP. Ces molécules (dioxyde de carbone, des électrons, de l'éthylène, des ions bicarbonates) permettent de faciliter le métabolisme interne de la plante. Par exemple les molécules excrétées facilitent la respiration (Uren & Reisenauer, 1988).

5.1.4. Débris cellulaires

Les débris cellulaires regroupent les cellules muées et les cellules lysées. Ces dernières sont constituées du contenu cellulaire et du lysat. Elles proviennent de la sénescence des cellules corticales. On retrouve dans la rhizosphère à la suite de cette lyse, des fragments de paroi ainsi que le contenu cellulaire ou encore des poils absorbants.

Les cellules muées aussi appelées cellules bordantes sont des cellules racinaires qui sont détachées de la couche externe de la coiffe. Cette dernière renouvelle ses cellules en permanence afin de diminuer les forces de frottement (Barlow, 1975). Une fois ces cellules détachées de la coiffe (Figure 9), elles restent vivantes dans le sol plusieurs jours et continuent de produire des rhizodépôts comme du mucilage et des exsudats racinaires (Stubbs *et al.*, 2004). Les cellules muées représenteraient moins de 10 % du carbone libéré par rhizodéposition (Iijima *et al.*, 2000).



*Figure 9 : Image microscopique montrant la pointe d'une racine de maïs entourée de mucilage et la production de cellules bordantes. (A) centre quiescent, (B) zone d'élongation racinaire et (C) mucilage et cellules bordantes (Jones *et al.*, 2009).*

5.2. Facteurs impactant la rhizodéposition

La quantité et la composition des rhizodépôts émis par les racines varient en fonction de multiples facteurs qu'ils soient environnementaux, qu'ils dépendent de la génétique ou du fonctionnement de la plante en elle-même (Figure 10).

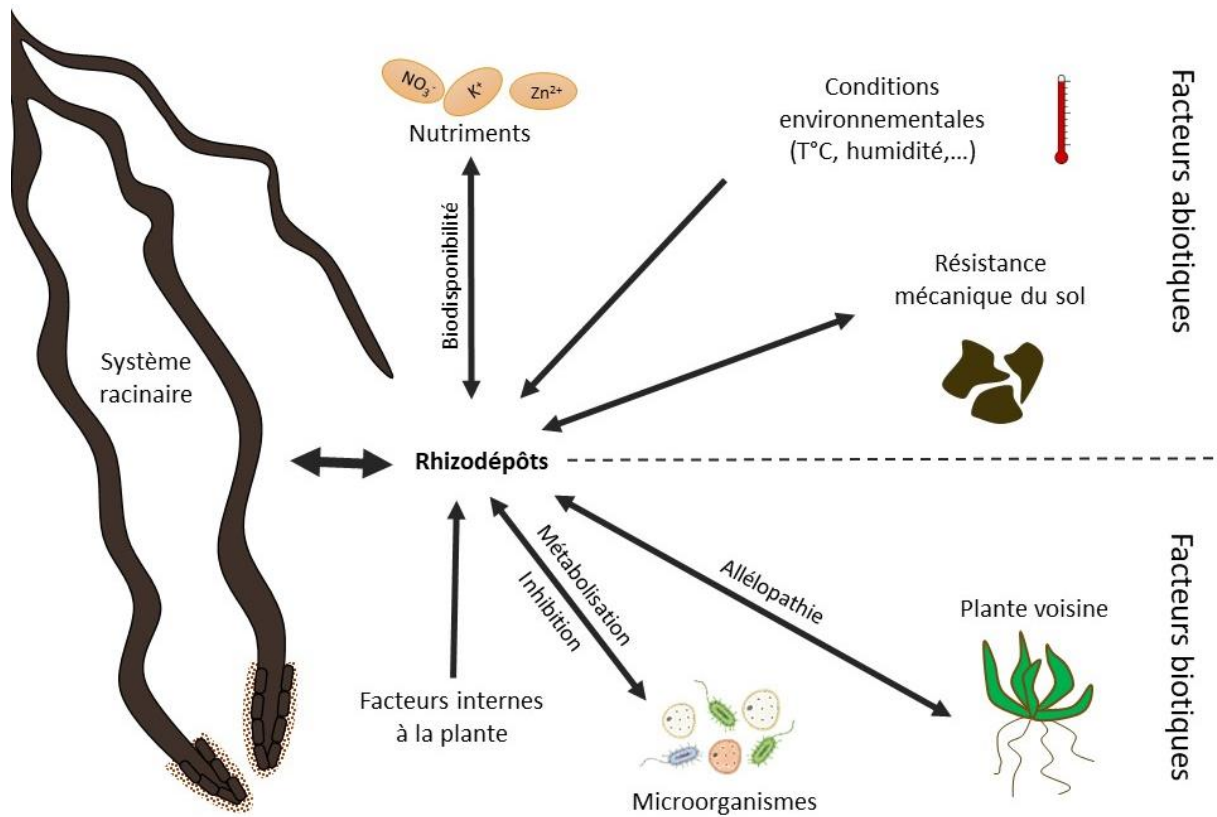


Figure 10 : Principaux facteurs influençant la rhizodéposition.

5.2.1. Facteurs biotiques

5.2.1.1. Facteurs biotiques externes

L'influence des microorganismes sur la rhizodéposition est compliquée à mettre en évidence puisque ceux-ci métabolisent les composés émis par les racines, empêchant ainsi leur quantification. De plus les microorganismes produisent aussi des exsudats compliquant ainsi leur différenciation des rhizodépôts. Malgré tout, des expériences ont permis de mettre en évidence que la présence de microorganismes stimule la production de rhizodépôts. En effet, lorsque du riz cultivé en hydroponie est inoculé avec une souche d'*Azospirillum*, l'exsudation augmente de 17 à 36 % par rapport aux conditions stériles (Heulin et al., 1987). De la même façon, une expérience réalisée sur du blé montre que 2 à 2.3 fois plus d'exsudats sont produits en présence de *Pseudomonas putida* par rapport à la même expérience en conditions stériles (Vančura et al., 1977). Cette augmentation peut être due à la production d'hormones de croissance bénéfiques aux plantes et produites par les bactéries qui vont induire une augmentation de la surface racinaire et donc une production plus importante de rhizodépôts (Dubeikovsky et al., 1993; Lippmann et al., 1995; Pokojaska-Burdziej, 1980). En plus d'agir sur la quantité d'exsudats, les microorganismes modifient également l'exsudation de façon

qualitative. Bobille et al. (2016) ont observé un profil d'acides aminés différent que les plantes soient cultivées en conditions stériles ou non. En effet, en condition de stérilité, c'est la glycine et la sérine qui sont retrouvées en grandes quantités tandis que lorsque les plantes sont cultivées de façon non-stérile, c'est l'asparagine qui est majoritairement présente.

5.2.1.2. Facteurs biotiques internes

La rhizodéposition est soumise à de nombreux facteurs internes à la plante comme son âge, son stade de développement ou encore l'espèce utilisée. Une expérience réalisée par Aulakh et al. (2001) a permis de mesurer la quantité de carbone organique total rhizodéposé par un plant de riz de la germination à la maturité. Cette teneur augmente du semis jusqu'au stade « initiation de la panicule » ou jusqu'à la floraison selon le cultivar. Après ce stade, la teneur en carbone organique total rhizodéposé diminue. Pour le cultivar Dular, la quantité de carbone rhizodéposé est d'environ $2,8 \text{ mg C} \cdot \text{plante}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$ au semis et augmente jusqu'à $5,5 \text{ mg C} \cdot \text{plante}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$ à la floraison du riz. Passé ce stade, la teneur en carbone diminue jusqu'à $4 \text{ mg C} \cdot \text{plante}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$ à maturité. De même, chez *Medicago truncatula* cultivée dans des conditions stériles, la quantité d'acides aminés totaux augmente de façon significative avec une teneur maximale à la fin du stade végétatif (Bobille *et al.*, 2016).

La rhizodéposition varie selon l'espèce ou la variété utilisée. Par exemple l'orge exsude davantage en quantité, exprimée par gramme de racine, que le blé qui exsude lui-même plus que le riz (Fan *et al.*, 2001). Aulakh et al. (2001) ont aussi montré que la rhizodéposition était dépendante du cultivar puisque pour chacun des cultivars de riz testés, les teneurs en carbone organique total rhizodéposées sont différentes. Par exemple, le cultivar IR65600 produit 4 mg de carbone par plante et par jour tandis que le cultivar Intan en produit le double.

Les rhizodépôts varient quantitativement et qualitativement en fonction du métabolisme de la plante (C3, C4 ou CAM). Par exemple, les plantes en C3 exsudent davantage de carbone organique total que les plantes en C4. Les proportions de sucres, d'acides organiques et d'acides aminés sont également modifiées selon le métabolisme. Les plantes en C3 exsudent trois fois plus de sucre que d'acides organiques, tandis que chez les plantes en C4, ces deux familles sont exsudées dans des quantités équivalentes (Vranova *et al.*, 2013). D'autre part, le métabolisme de la plante définit aussi le taux de réabsorption des exsudats racinaires. Il est de 10 % chez les plantes en C4 et atteint quasiment 70 % chez les plantes en C3 (Vranova *et al.*, 2013).

5.2.2. Facteurs abiotiques

La rhizodéposition est affectée par un grand nombre de facteurs environnementaux. Elle dépend entre autres de la température, de l’intensité lumineuse, de l’impédance mécanique ou de la présence de produits chimiques (produits phytosanitaires, présence de polluants) (Hale *et al.*, 1971).

L’impédance mécanique mesure la résistance qu’oppose le substrat à l’encontre de la racine. Plus cette résistance est importante et plus la plante est stressée. Plus l’impédance est élevée et plus la biomasse racinaire est importante par rapport à la biomasse des parties aériennes. Et indirectement, plus la biomasse racinaire est importante et plus la quantité de rhizodépôts sera grande (Bœuf-Tremblay *et al.*, 1995).

Un stress salin peut aussi modifier la rhizodéposition. Dès 100 mM de NaCl, *Kosteletzkya virginica* modifie la composition de son mucilage avec une production plus importante d’acide uronique et de rhamnose. La composition du mucilage lui permet de fixer les ions Na^+ et ainsi d’empêcher leur pénétration dans la racine (Ghanem *et al.*, 2010).

Une carence en éléments nutritifs peut modifier la rhizodéposition. Un manque de phosphore induit l’exsudation d’acides aminés et d’acides organiques et diminue l’absorption d’ions Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- (Hinsinger, 2001; Shen *et al.*, 2002, 2005; Tang *et al.*, 2009). Une carence en fer augmente l’exsudation de phénols et d’acides organiques tels que l’acide malique pour faciliter la mobilité du fer et son absorption racinaire (Vranova *et al.*, 2013). Les graminées produisent quant à elles des phytosidérophores permettant une meilleure absorption de cet élément. Dans le cas d’une carence en phosphore, *Pantoea agglomerans* modifie son profil de rhizodépôts en émettant plus de pentose que de glucose ou de fructose (Schilling *et al.*, 1998)

D’autres stress peuvent induire des modifications dans la composition des rhizodépôts, comme l’exposition à des polluants organiques ou métalliques. Environ 17 % du carbone fixé par photosynthèse est émis sous forme de rhizodépôts (Nguyen, 2003). Si la photosynthèse est négativement impactée par ces stress, alors il est probable que la quantité de carbone rhizodéposée diminue de la même façon. La surface racinaire influe également sur la quantité de molécules rhizodéposées et en cas de stress par un polluant, la surface et la biomasse racinaire diminue, ce qui a pour conséquence de diminuer la rhizodéposition (Alkio *et al.*, 2005; Aulakh *et al.*, 2001; Selvam & Wong, 2008; Seregin & Ivanov, 2001). Les molécules impactées dans un premier temps sont donc les molécules carbonées et les molécules diffusées telles que les sucres. En cas de stress tel que la présence de Cd, la quantité de sucre simple diminue. Luo

et al. (2014) ont décrit une diminution du fructose, du glucose et du mannitol exsudé et ce dès 5 μM de Cd. Au contraire, la plante peut émettre certains composés en plus grandes quantités. C'est le cas d'acides organiques émis par *Sedum alfredii*, une plante hyperaccumulatrice. En présence de Cd, la quantité d'acide phosphorique, d'acide dodecanoïque et d'acide tétronique augmente progressivement entre 5 à 400 μM de Cd tandis que l'acide oxalique et thréonique augmente par rapport au témoin seulement lorsque les concentrations en Cd sont inférieures à 40 μM de Cd (Luo *et al.*, 2014). Mais chaque plante réagit différemment à la présence d'un stress. Le sorghum produit quant à lui plus d'acide malique en présence de Cd quand le maïs produira plus particulièrement de l'acide citrique (Pinto *et al.*, 2008). Il en est de même pour d'autres ETM comme le chrome. Ce dernier induit la production d'acides organiques tels que l'acide oxalique et l'acide malique chez le riz et une diminution du pH rhizosphérique (Zeng *et al.*, 2008). Un stress causé à *Plantago lanceolata* par un herbicide, le paraquat, augmente le flux de carbone exsudé et ce, 24 heures après application de l'herbicide (Porteous *et al.*, 2000). La présence de faibles concentrations en PHE (10 mg.kg^{-1}) sur les plants de *Sorghum bicolor* augmente de 12 % l'exsudation de maltose tandis qu'une plus forte concentration (10 mg.kg^{-1}) induit une nette diminution de l'émission d'acides aminés et de protéines, respectivement -78 % et -70 % (Muratova *et al.*, 2009). Les connaissances sur l'impact des contaminants métalliques ou organiques sur la rhizodéposition sont donc limitées. Mais à l'inverse, l'effet de molécules rhizodéposées sur la rhizosphère et ses composants est mieux connu.

5.3. Impact de la rhizodéposition sur la rhizosphère

Les plantes transforment le sol qui les entoure, *via* les rhizodépôts, en le rendant plus favorable à leur croissance (Marschner, 1995). Les rhizodépôts ont notamment un rôle important de communication avec les microorganismes et les plantes avoisinantes mais ont également un impact sur le sol en lui-même et sur la biodisponibilité de ses constituants.

5.3.1. Impact de la rhizodéposition sur le substrat

Le mucilage sécrété par les racines est un composé riche en eau. Il facilite le contact entre les racines et les particules du sol. Ainsi, même en condition de sécheresse, il fait le lien entre ces deux compartiments, ce qui facilite les échanges (Nambiar, 1976). Sa composition en polysaccharide et sa teneur en eau permettent d'augmenter la stabilité des agrégats qui restent intacts en présence d'eau (Morel *et al.*, 1990). De plus, il contribue à maintenir les liaisons organo-minérales *via* la production de polysaccharides facilement adsorbables sur les minéraux argileux (Habib *et al.*, 1990; Morel *et al.*, 1990).

5.3.2. Impact de la rhizodéposition sur les organismes

5.3.2.1. Impact de la rhizodéposition sur les microorganismes rhizosphériques

La quantité et la disponibilité du carbone dans le sol est le principal facteur limitant de l’activité microbienne, c’est pourquoi la rhizodéposition est un moteur important de l’abondance bactérienne (Paterson *et al.*, 2007). La plante émet des rhizodépôts carbonés chemoattractant qui attirent les microorganismes qui métabolisent ces composés (Paterson, 2003). De plus, certains des composés rhizodéposés sont reconnus comme étant des molécules signales spécifiques pour les microorganismes (Grayston *et al.*, 1997). Ces signaux sont actifs à des concentrations infimes (10^{-6} à 10^{-12} M). Les microorganismes sont capables de reconnaître et de diriger leurs mouvements selon le gradient chimique de la molécule signal. Il s’agit le plus souvent de sucres (glucose, fructose, sucrose) ou d’acides organiques (malate, citrate, oxalate, aspartate) (Grayston *et al.*, 1997; Heinrich & Hess, 1985; Reinhold *et al.*, 1985).

C’est pourquoi dans la rhizosphère on observe une augmentation de la biomasse microbienne. Cette augmentation est mesurée grâce au ratio entre la population microbienne dans le sol rhizosphérique par la population microbienne dans le sol nu. Dans le cas du blé (Tableau 2), le ratio est toujours supérieur à 1 sauf pour les algues (Gray & Williams, 1971; Osorio Vega, 2007a).

*Tableau 2 : Nombre de microorganismes (CFU g⁻¹ de sol) dans la rhizosphère du blé (*Triticum aestivum* L.) et dans le sol non-rhizosphérique et le ratio entre la population microbienne dans le sol rhizosphérique par la population microbienne dans le sol non-rhizosphérique (adapté de Gray and Williams, 1971; Osorio Vega, 2007).*

Microorganismes	Sol rhizosphérique	Sol non-rhizosphérique	Ratio
Bactéries	1.2×10^9	5.3×10^7	23
Actinomycètes	4.6×10^7	7.0×10^6	7
Champignons	1.2×10^6	1.0×10^5	12
Protozoaires	2.4×10^3	1.0×10^3	2
Algues	5.0×10^3	2.7×10^4	0.2
Fixateurs d’azote	5.0×10^8	4.0×10^6	125
Nitrificateurs	1.26×10^8	1.0×10^5	1260

Au contraire, la plante peut émettre des rhizodépôts avec des propriétés toxiques (antimicrobiennes, insecticides et nématicides) pour repousser les microorganismes pathogènes

(Bais *et al.*, 2006; Haichar *et al.*, 2014). Ces mécanismes sont complétés par l’action de microorganismes rhizosphérique qui produisent également des composés antimicrobiens permettant à la fois de réguler la biomasse microbienne et d’induire une résistance systémique de la plante.

D’autre part, l’espèce végétale et par conséquent la nature de ses rhizodépôts influent sur la quantité et la composition de la communauté microbienne (Grayston *et al.*, 1997; Rovira, 1959). En effet certains métabolites comme le glucose ou l’acide fumarique sont métabolisés par la plupart des microorganismes tandis que d’autres molécules comme la glycine sont utilisées par une portion réduite de ces microorganismes, favorisant ainsi leur prolifération. Paterson *et al.* (2007b) ont pu comparer les communautés microbiennes d’un sol nu et d’un sol rhizosphérique amendé avec des exsudats artificiels. Ces derniers sont composés de 5 sucres, 5 acides organiques et 5 acides aminés. Sur le sol rhizosphérique on retrouvera une proportion plus importante de bactéries à gram négatif alors que sur le sol nu ce sont les bactéries à gram positifs qui sont majoritaires. De la même manière, sur un substrat contaminé en PHE, le nombre de microorganismes hétérotrophes cultivables et pouvant dégrader le PHE augmente en approchant des racines (Muratova *et al.*, 2009). Dans une autre étude, il a été montré que la présence de rhizodépôts provoque une diminution de la diversité microbienne. Benizri *et al.* (2002) ont montré que sur un sol dépourvu de rhizodépôts, 15 ribotypes étaient présents tandis que sur un sol supplémenté en rhizodépôts, seulement 9 ribotypes étaient présents.

5.3.2.2. Impact sur les plantes avoisinantes

L’allélopathie est l’influence, positive ou négative, que peut avoir une plante sur une plante avoisinante *via* l’émission de composés chimiques. Certaines plantes peuvent produire des composés allélopathiques émis par leurs racines (Bais *et al.*, 2006). Ces molécules sont souvent composées de cycles aromatiques et de groupements hydroxyles ou cétones et peuvent être de flavonoïdes, des quinones, des quinolines ou encore des acides hydroxamiques. L’émission de ces molécules est variable d’une plante à une autre, que ce soit au niveau de sa composition chimique, de son mode d’action ou de ses effets sur les plantes concurrentes (Einhellig, 1995; Weir *et al.*, 2004). L’impact d’un composé allélopathique sur les plantes avoisinantes dépend des concentrations auxquelles il est émis et de la distance à laquelle se trouvent les autres végétaux. Si ces composés sont présents en faible quantité alors ils ne pourront pas affecter la croissance ou la survie des plantes en compétition. Ils doivent également être stables

chimiquement pour conserver leur intégrité chimique. Enfin, leur impact sur les autres plantes dépend de leur résistance audit composé (Bais *et al.*, 2006).

Les phytotoxines sont un exemple de composé allélopathique, ils inhibent l'installation, la croissance et la survie de potentielles plantes voisines. Dans ce cas, l'allélopathie permet d'atténuer la compétitivité pour les ressources disponibles (nutriments, espace, lumière et eau). A ce jour, une centaine de phytotoxines ont été recensées (Dakora & Phillips, 2002). Un autre exemple d'allélopathie est la production par le blé d'acides phénoliques, d'acides hydroxamiques et de courtes chaînes d'acides gras (Wu *et al.*, 2000, 2001).

5.3.3. Impact de la rhizodéposition sur la dynamique des éléments

Les rhizodépôts peuvent influencer sur la biodisponibilité de certains nutriments pour faciliter leur absorption mais ils peuvent aussi influencer sur la dynamique des polluants, qu'ils soient organiques ou métalliques, en augmentant ou en diminuant leur biodisponibilité.

Le pH de la solution du sol est un facteur majeur dans la biodisponibilité des éléments. Ce dernier est étroitement dépendant de la forme d'azote absorbée par les racines. L'absorption d'ammonium coïncide avec un efflux de protons H^+ permettant le maintien du gradient électrochimique existant à travers la membrane plasmique. Ce flux induit une baisse du pH rhizosphérique pouvant diminuer jusqu'à deux unités (Hinsinger *et al.*, 2003; Sas *et al.*, 2001). Si la forme dominante d'azote dans le sol est le nitrate, ce qui est le cas classiquement, on aura l'effet inverse, c'est-à-dire une augmentation du pH rhizosphérique (Paterson, 2003).

Le pH peut aussi être modifié *via* l'exsudation d'acides organiques qui diminuent le pH. Cette diminution est dépendante de la plante : elle est négligeable dans le cas du maïs, provoquant une baisse n'excédant pas 0.2 à 0.3 % alors qu'elle est très importante dans le cas du lupin (Dinkelaker *et al.*, 1989; Petersen & Böttger, 1991). En effet, Dinkelaker *et al.* (1989) ont observé que le lupin (*Lupinus albus*) sur un sol calcaire de pH 7.5 pouvait abaisser le pH jusqu'à 4.8 dans sa zone rhizosphérique. La respiration racinaire libère du CO₂ qui acidifie également le sol (Hinsinger *et al.*, 2003; Marschner, 1995).

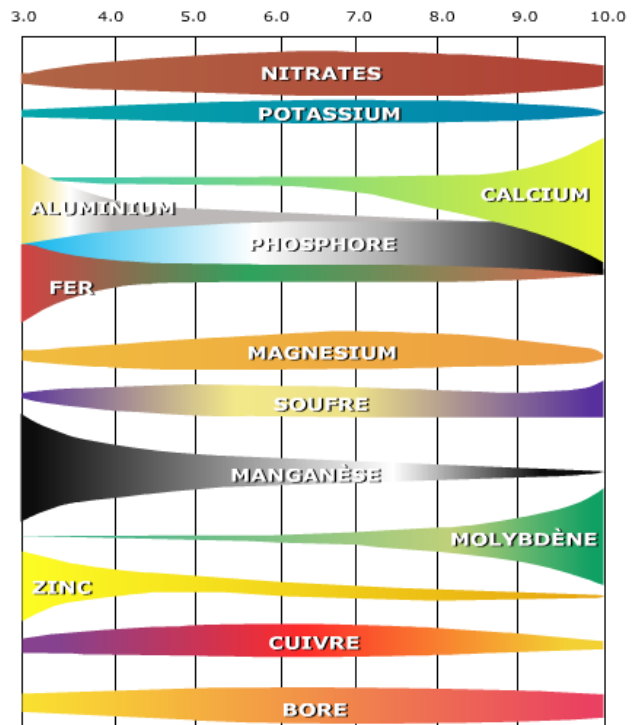


Figure 11 : L'impact du pH sur la disponibilité des éléments nutritifs (Ruellan, 2008).

Le pH du sol est un paramètre important à prendre en compte puisque de cette valeur dépend la biodisponibilité de nutriments essentiels (N, P, K) et d'oligoéléments (Zn, Cu, B,...) comme on peut le voir sur la Figure 11. Les composés anioniques rhizodéposés comme l'acide citrique, malique et oxalique permettent la mobilisation des ET par complexation (Hinsinger *et al.*, 2006; Uren, 2007). Cependant, leur capacité à se complexer à des cations métalliques comme avec le cuivre, le zinc ou le fer est modérée et diminue avec l'augmentation du pH (Ström *et al.*, 2005). D'autre part, le pH affecte directement la biodisponibilité des métaux et il a été démontré que certaines plantes peuvent, de façon active ou passive, modifier l'excrétion d'ions H⁺ lors de stress métalliques affectant ainsi le pH rhizosphérique (Hinsinger *et al.*, 2006). La diminution du pH provoquée par la présence de protons augmente généralement la solubilité et l'activité des métaux lourds. On aura ainsi une corrélation négative entre la teneur en Cd dans la plante et le pH du sol (Szteke *et al.*, 1988; Wu & Zhang, 2002). Le pH joue également un rôle dans la désorption des composés organiques tels que les HAP. En effet, la désorption des HAP est minimale à un pH compris entre 2 et 3, est maximale entre 7 et 8 et diminue après cette valeur (Yang *et al.*, 2001).

L'émission par les racines de composés chélatants est un bon moyen de contrôler la biodisponibilité des éléments essentiels ou non-essentiels. Ces chélatants sont des

carbohydrates, des acides organiques, des polypeptides, des protéines, des acides aminés, des acides nucléiques ou encore des phytosidérophores. Ces derniers permettent d'augmenter la biodisponibilité de certains cations métalliques, particulièrement en sols calcaires (Römheld, 1987). Les sidérophores sont produits suite à une carence nutritive en fer ou en zinc (Haynes, 1990; Jones & Darrah, 1994). Les gènes à l'origine de la production de ces molécules sont induits spécifiquement dans les racines déficientes en fer (Murata *et al.*, 2006). Ils se lient de façon préférentielle avec le fer mais ils peuvent aussi se complexer avec d'autres métaux (Zn). Ensuite, le complexe est absorbé par la plante *via* des transporteurs spécifiques (Zhang *et al.*, 1991). Pour ce qui est des autres métaux, les phytosidérophores ne semblent pas améliorer l'absorption du Cd ni du Mn (Shenker *et al.*, 2001). D'autres composés chélatants sont produits par rhizodéposition. Ainsi, la production d'acides organiques en présence de Cd réduit leur absorption en se complexant au métal (Hinsinger, 2001). On peut citer, l'acide citrique, oxalique, malique (Jung *et al.*, 2003; Liao & Xie, 2004; Salt *et al.*, 1999; Schwab *et al.*, 2005). C'est le cas également pour certains acides aminés tels que l'histidine (Salt *et al.*, 1999) Le mucilage produit par les cellules bordantes joue quant à lui un rôle de barrière contre l'absorption des métaux en les immobilisant (Allan & Jarrell, 1989). Il immobilise ces contaminants, empêchant ainsi leur absorption par la plante (Morel *et al.*, 1986). Les cations métalliques comme le Cd, le Pb ou le Cu se fixeraient sur les groupements carboxyle (COO^-) de l'acide uronique présent sur les chaînes de polysaccharides.

Au contraire, la plante peut émettre des composés capables d'augmenter la biodisponibilité de certains composés organiques comme les HAP. Ces molécules sont des surfactants et permettent une meilleure émulsion des molécules organiques avec la solution du sol. Ces molécules sont amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles possèdent à la fois un groupement hydrophile et un groupement hydrophobe. Ces caractéristiques permettent d'augmenter la solubilisation des HAP dans l'eau et ainsi augmenter leur biodisponibilité à la fois pour les microorganismes et la plante (Deziel *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2006; Tiehm *et al.*, 1997). Les surfactants peuvent être des acides gras, des acides neutres comme les monoglycérides ou des phospholipides, eux-mêmes composés d'un ou deux acides gras (Desai & Banat, 1997; Yap *et al.*, 2010, p. 2010). Toutes ces molécules sont retrouvées dans les rhizodépôts. C'est plus particulièrement le cas des phospholipides qui sont présents en forte proportion dans le mucilage (Read *et al.*, 2003). Des acides organiques comme l'acide malique, l'acide oxalique ou l'acide lactique, exsudés pourraient aussi agir comme des surfactants en améliorant la désorption des hydrocarbures de

la matrice du sol (An *et al.*, 2010, 2011; Gao *et al.*, 2010b; Read *et al.*, 2003; Siciliano & Germida, 1998).

Enfin, l'impact principal de la rhizodéposition sur la dynamique des polluants organiques est, directement ou indirectement, leur dégradation (Martin *et al.*, 2014). Ce mécanisme appelé rhizodégradation est la dégradation de la matière organique dont font partie les HAP. Il a été montré que la dégradation des HAP augmente de 30 à 44 % sur un sol végétalisé par rapport à un sol nu (Reilley *et al.*, 1996). L'impact principal attribué aux rhizodépôts sur les polluants organiques tels que les HAP est indirect, il s'agit du chimiotactisme (Joner & Leyval, 2003; Smalla *et al.*, 2001). De par l'émission de sources de carbone à proximité des racines, on retrouve des populations bactériennes beaucoup plus nombreuses dans cette zone que dans le reste du sol (Osorio Vega, 2007). Ces bactéries peuvent ensuite métaboliser les polluants organiques. Ce phénomène peut être accentué par la libération par les racines ou les microorganismes de biosurfactants qui rendent les HAP plus disponibles et donc plus accessibles à la biodégradation (Cébron *et al.*, 2011; Siciliano & Germida, 1998). Chez les microorganismes, les surfactants les plus connus sont des rhamnolipides. Les plantes peuvent également dégrader directement les polluants organiques en produisant des enzymes capables de dégrader les contaminants telles que des laccases, des déhalogénases, des nitroréductases, des nitrilases ou encore des peroxydases (Gerhardt *et al.*, 2009).

6. Dispositifs de culture et de collecte des rhizodépôts

De nombreux dispositifs de culture et de collecte des rhizodépôts existent, afin de récolter le plus souvent, soit du mucilage soit des exsudats racinaires.

6.1. Culture et collecte des exsudats racinaires

6.1.1. Description des différents dispositifs de culture et de collecte des exsudats racinaires

La culture et la collecte des exsudats racinaires sont souvent indissociables puisqu'elles sont en général pratiquées de façon simultanée. Une des principales différences entre les dispositifs de culture et de collecte est la stérilité. En effet, certains dispositifs sont entièrement stériles (Figure 12A, B) (Hodge *et al.*, 1996; Sandnes *et al.*, 2005). Il s'agit de désinfecter ou stériliser au préalable tous les composants du microcosme (dispositif de culture, substrat, graine, solution nutritive, etc) et de conserver la stérilité durant toute la durée de la culture et de la collecte. Au contraire, la culture des plantes ainsi que la collecte des exsudats peut se faire en conditions

non-stériles comme c'est le cas dans différents dispositifs de la Figure 12F, H et I. Il est également possible de cultiver les plantes dans des conditions de semi-stérilité, c'est-à-dire que le système racinaire est conservé dans un environnement stérile tandis que le système aérien est à l'air libre. La séparation est réalisée au niveau du collet grâce à du coton, du silicone ou de la paraffine additionnée de coton cardé comme montré dans la Figure 12C, D et E (Boeuf-Tremblay *et al.*, 1995; Groleau-Renaud *et al.*, 1998b; Yoshitomi & Shann, 2001). Enfin, dans cette autre expérience réalisée par Hodge *et al.* (1996), l'équipe a cultivé de la fêtuque ou du plantain lancéolé dans des conditions stériles mais les dispositifs étaient soumis à une action bactérienne indirecte. Des bactéries sont inoculées dans une partie du dispositif séparée des racines par un filtre laissant passer les molécules émises par les microorganismes mais pas lesdits microorganismes (Figure 12 G).

Les dispositifs diffèrent également selon le substrat utilisé pour la croissance des plantes. La collecte des exsudats peut se faire directement dans ce même substrat ou dans un autre. Ainsi, les plantes peuvent être cultivées dans une solution nutritive qui apporte tous les nutriments nécessaires à la croissance de la plante, en hydroponie stricte (Figure 12 E) (Groleau-Renaud *et al.*, 1998b; Kuijken *et al.*, 2015). Pour appliquer une contrainte mécanique sur le système racinaire, des billes de verre peuvent être ajoutées dans les dispositifs, mimant ainsi l'impédance mécanique exercée par le sol sur les racines (Figure 12 B) (Boeuf-Tremblay *et al.*, 1995; Groleau-Renaud *et al.*, 1998b; Sandnes *et al.*, 2005). Dans ces cas où la plante pousse en hydroponie stricte, les exsudats sont collectés *via* la solution nutritive, par diffusion. Les plantes peuvent également être cultivées en hydroponie partielle. C'est-à-dire qu'elles poussent dans un substrat tel que le sable mais les nutriments sont apportés *via* une solution nutritive (Tang & Young, 1982). Dans ce cas, la collecte des exsudats peut également se faire *via* la solution nutritive par percolation de celle-ci à travers le sable et les racines en entraînant les molécules organiques avec elle (Figure 12 A et D) (Eltrop & Marschner, 1996; Hodge *et al.*, 1996). Mais elle peut aussi se faire après la récolte des plantes, le rinçage des racines et le trempage de celles-ci dans une solution pour laisser diffuser les exsudats dans la solution. Dans ce dernier cas, les plantes peuvent également être cultivées dans de la terre (Figure 12 I) (Gransee & Wittenmayer, 2000). Il est également possible de cultiver la plante dans de l'agar, comme dans l'expérience de Hoffland *et al.* (1989) ou (Hodge *et al.*, 1996) (Figure 12 G et H).

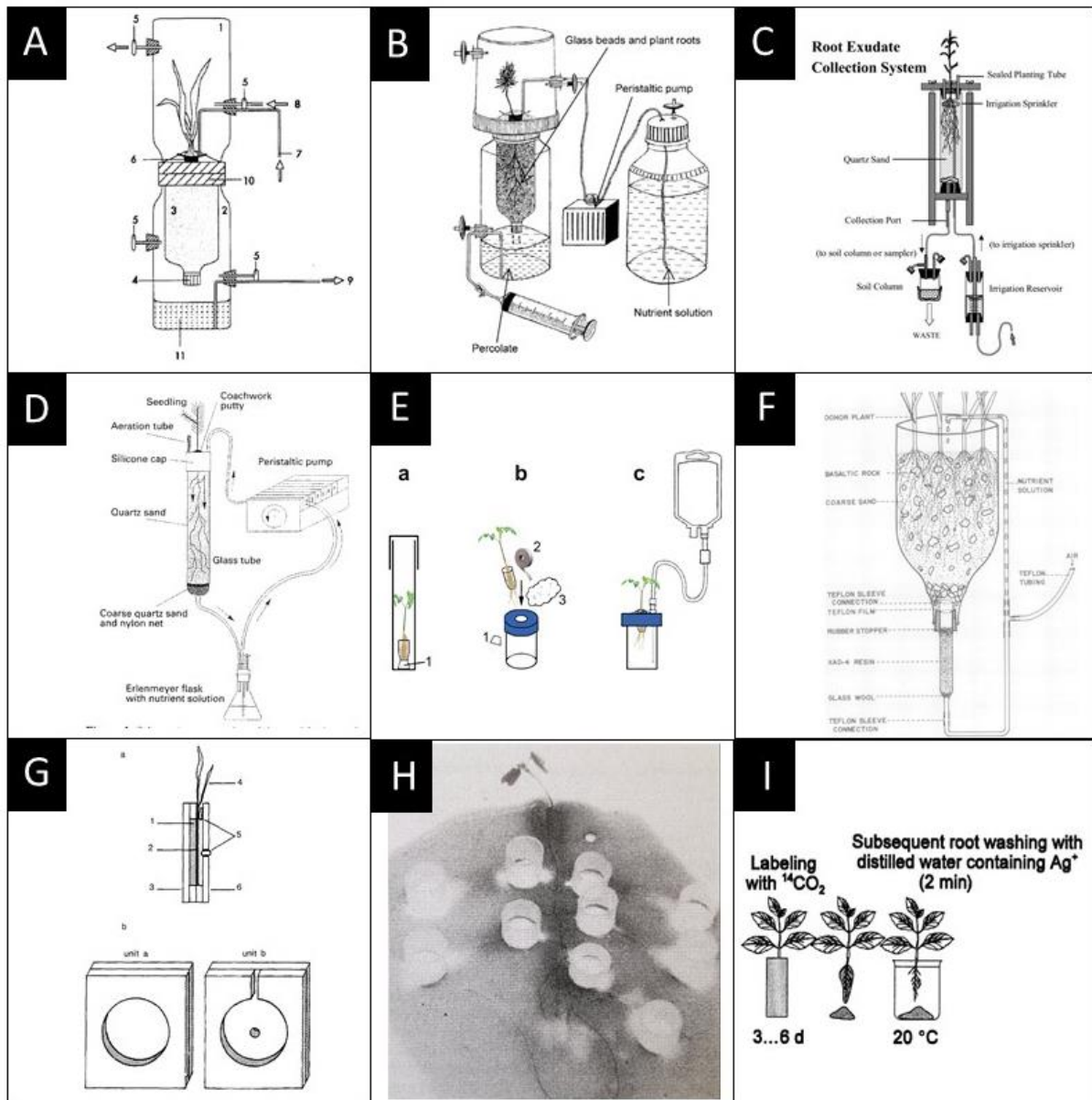


Figure 12 : Dispositifs utilisés dans différentes études pour la collecte des exsudats racinaires. A (Hodge et al., 1996), B (Sandnes et al., 2005), C (Yoshitomi & Shann, 2001), D (Eltrop & Marschner, 1996), E (Kuijken et al., 2015), F (Tang & Young, 1982, p. 198), G (Meharg & Killham, 1991), H (Hoffland et al., 1989) et I (Gransee & Wittenmayer, 2000).

La collecte des exsudats peut se dérouler durant la culture de la plante ou après sa récolte. Dans le premier cas, la collecte peut se faire en continu au fur et à mesure de la croissance de la plante, comme c'est le cas dans les dispositifs de la Figure 12 A, B, C, D et F (Eltrop & Marschner, 1996; Hodge *et al.*, 1996; Sandnes *et al.*, 2005; Tang & Young, 1982; Yoshitomi & Shann, 2001). La solution nutritive sert à alimenter la croissance de la plante et aussi à collecter les exsudats ; dans ce cas elle est collectée et renouvelée régulièrement. La récolte des exsudats peut également se faire à la fin de la culture et dans ce cas, la culture et la collecte se font dans des milieux différents (Figure 12 I) (Gransee & Wittenmayer, 2000).

Enfin, la collecte des exsudats peut avoir lieu dans tout le système racinaire, c'est ce qui est fait classiquement, ou de façon localisée. Dans le premier cas, les exsudats de l'ensemble du système racinaire sont collectés contrairement à l'expérience réalisée dans la Figure 12 H où les exsudats sont récoltés de façon ciblée, aux extrémités racinaires par le biais de petits cylindres contenant de la solution nutritive dans laquelle des exsudats diffusent passivement à travers la racine (Hoffland *et al.*, 1989).

6.1.2. Avantages et inconvénients des différents dispositifs de culture et collecte des exsudats racinaires

Chacun des systèmes décrits précédemment s'accompagne d'avantages et d'inconvénients, et sont plus ou moins adaptés à certaines conditions expérimentales. Un dispositif stérile ou semi stérile permet de conserver l'intégrité chimique des exsudats, qui ne seront pas dégradés par les microorganismes. En effet, la plupart des molécules exsudées sont des composés de bas poids moléculaire tels que les sucres ou les acides aminés facilement métabolisés par les microorganismes. Ces molécules seront donc plus facilement retrouvées dans un système stérile que dans un dispositif non-stérile. Cependant, il est établi que les microorganismes ont tendance à stimuler l'exsudation, les molécules exsudées dans les dispositifs stériles sont ainsi sous-estimées en comparaison d'un dispositif non-stérile (Heulin *et al.*, 1987; Hodge *et al.*, 1996; Pokojaska-Burdziej, 1980; Vančura *et al.*, 1977). La taille des plantes durant la culture est également à prendre en compte. Les dispositifs entièrement stériles ont tendance à être de petite taille. De ce fait, pour des plantes à développement rapide tel que le maïs, les dispositifs semi-stériles ou non-stériles sont plus adaptés.

Le substrat servant de support à la croissance des racines doit également être choisi précautionneusement. Un système en hydroponie stricte doit être additionné d'un apport d'oxygène pour ne pas asphyxier les racines. Ces systèmes sont très éloignés d'un système sol plante classique, notamment parce qu'ils n'exercent pas de contrainte mécanique sur les racines. Cette dernière influe sur la physionomie des racines. En effet, en culture hydroponique, les racines présentent un diamètre moins important, moins de poils racinaires et leur architecture elle-même peut être modifiée (Boeuf-Tremblay *et al.*, 1995; Groleau-Renaud *et al.*, 1998b). Or, on sait notamment que la surface racinaire influe sur la quantité d'exsudats produits. Si la surface d'échange entre la solution et les racines diminue, l'exsudation en sera réduite. Si un apport de polluant est prévu dans le système, il faut prendre en compte sa solubilité. Par exemple, le Cd sous sa forme Cd^{2+} est soluble dans l'eau alors que de nombreuses molécules organiques telles que certains hydrocarbures aromatiques polycycliques ne le sont pas. C'est le

cas du PHE, ce dernier est peu soluble dans la solution nutritive (solubilité aqueuse de 1,2 mg L⁻¹ à 20°C) et doit donc être apporté par un autre biais, par mélange avec le support de culture par exemple.

6.2. Culture et la collecte du mucilage

6.2.1. Description des différents dispositifs de culture et de collecte du mucilage

De même que pour la récolte des exsudats racinaires, il existe plusieurs procédés de collecte du mucilage : par centrifugation, aspiration, ou en raclant la racine à l'aide d'une spatule en verre. Comme expliqué précédemment, le mucilage est visible à l'œil nu chez certaines espèces telles que le maïs et forme une couche gélatineuse à la surface de celles-ci. C'est d'ailleurs pour cette raison que le maïs est une plante modèle pour l'étude du mucilage et est largement étudiée (Ahmed *et al.*, 2015; Chaboud, 1983; Chaboud & Rougier, 1984; Ma *et al.*, 2010; Morel *et al.*, 1986; Read *et al.*, 1999; Zickenrott *et al.*, 2016).

Une des méthodes de collecte du mucilage est l'aspiration. La couche de mucilage adhérent à la racine est aspirée à l'aide d'un tube en plastique relié à un tube en verre sous vide dans lequel s'accumule les rhizodépôts (Morel *et al.*, 1986). Il est également possible d'aspirer cette couche gélatineuse *via* des pipettes pasteur ou des seringues comme montré dans la Figure 13 A ou en raclant l'épiderme racinaire à l'aide d'une tige en verre ou d'un autre objet (Ahmed *et al.*, 2015; Chaboud, 1983; Chaboud & Rougier, 1984; Ma *et al.*, 2010; Read *et al.*, 1999; Zickenrott *et al.*, 2016).

Ces méthodes peuvent être réalisées en plein champ ou dans la terre. Le maïs possède deux types de racines, les racines séminales et les racines nodales. Ces dernières sont entourées, lorsque les conditions hygrométriques sont suffisantes, d'un manteau mucilagineux (Floyd & Ohlrogge, 1970). De plus, lors des premiers stades de développement du maïs, ces racines sont aériennes. Dans ces conditions il est donc possible de sectionner les racines nodales, de les plonger dans l'eau *ex situ* pour réhydrater le mucilage et de le collecter *via* les méthodes décrites précédemment (Ahmed *et al.*, 2015; McCully & Boyer, 1997; Morel *et al.*, 1986). En laboratoire, les plants peuvent être cultivés aussi bien en conditions stériles que non-stériles. La collecte est essentiellement réalisée sur de très jeunes plants, au maximum quatre jours après la germination. Les graines sont mises à germer sur du papier filtre humide et le mucilage est récolté sur le jeune système racinaire deux à quatre jours après germination (Chaboud, 1983; Chaboud & Rougier, 1984; Jones & Morre, 1973; Ma *et al.*, 2010; Read *et al.*, 1999).

Préalablement à la récolte, il est possible de tremper le système racinaire des plantules dans une solution de CaCl_2 et d’antibactérien afin d’hydrater le mucilage (Ma *et al.*, 2010).

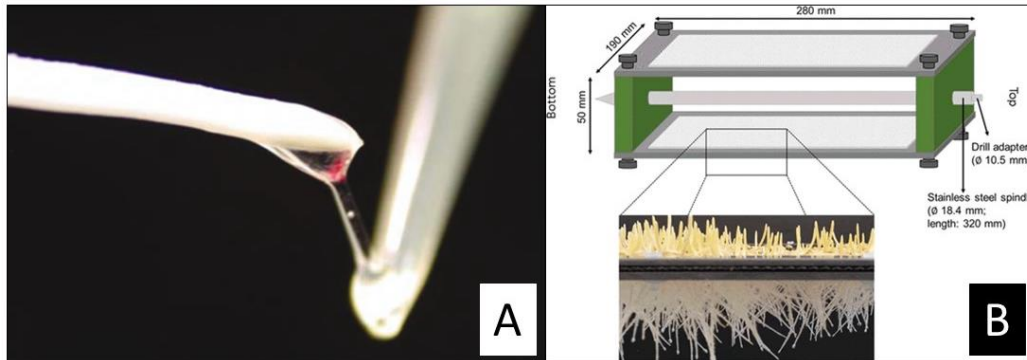


Figure 13 : Dispositifs utilisés dans différentes études pour la collecte du mucilage (Ma *et al.*, 2010; Zickenrott *et al.*, 2016).

Une autre méthode consiste à racler les racines grâce à un racleur en caoutchouc tout en appliquant une force centrifuge de faible puissance (570 RPM) directement intégrée dans le dispositif de culture comme montré dans la Figure 13 B.

6.2.2. Avantages et inconvénients des différents dispositifs de culture et collecte du mucilage

Concernant la collecte du mucilage, les méthodes décrites précédemment sont très similaires les unes aux autres même si elles peuvent être adaptées au champ ou au laboratoire. La méthode de collecte du mucilage au champ ne permet pas sa récolte sur l’ensemble du système racinaire mais uniquement sur les racines nodales encore aériennes aux premiers stades de développement de la plante. Cependant les études n’indiquent pas si l’échantillon collecté est représentatif de l’ensemble du mucilage. De plus, cette récolte est spécifique au maïs, du fait de ses racines nodales aériennes. Les autres recherches menées en laboratoire permettent quant à elles de récolter le mucilage sur l’ensemble du système racinaire de nombreuses espèces mais uniquement sur des plantules de très petite taille, âgées de quelques jours et mises à germer dans un environnement très humide. Néanmoins, on sait que la rhizodéposition évolue au fur et à mesure du stade de développement de la plante (Gransee & Wittenmayer, 2000). Il serait donc intéressant de pouvoir analyser la composition du mucilage après les premiers jours de la plantule. Pour que le mucilage soit facilement récupérable, il faut que celui-ci soit bien gonflé et donc bien hydraté. Les expériences doivent ainsi être menées sous une forte hygrométrie ou en plaçant les racines quelques heures dans l’eau juste avant la récolte pour réhydrater le

mucilage. A ce jour, les méthodes de collecte du mucilage sont ciblées et adaptés à de jeunes plantules.

Objectifs de la thèse

Dans cette première partie, nous avons mis en évidence les impacts des polluants qu'ils soient organiques ou métalliques sur le système sol/plantes et notamment en ce qui concerne les terres agricoles. Cette synthèse bibliographique a aussi permis de cerner certains enjeux du XXI^{ème} siècle tels que l'omniprésence des polluants. A ce constat sont associés des problématiques telles que la sécurité alimentaire ou l'impact des contaminants sur la santé humaine. Cependant, malgré la pollution, il paraît nécessaire de valoriser ces sites délaissés notamment en les végétalisant à des fins de phytoremédiation ou de production végétale alimentaire ou non. Deux principaux verrous existent vis-à-vis de la végétalisation de ces sites contaminés. Le premier est l'absorption des polluants par la plante qui rendent les cultures impropres à la consommation. Le deuxième verrou est l'impact des polluants sur la plante qui diminue entre-autre les rendements et modifie le fonctionnement de celle-ci. Pour débloquer ces verrous, une partie de la solution réside dans l'importance d'une meilleure compréhension des mécanismes de tolérance de la plante envers ces contaminants, notamment en étudiant d'avantage le rôle de la rhizodéposition vis-à-vis des polluants.

Une rapide étude bibliométrique (Figure 14) souligne le nombre limité de publications portant sur les rhizodépôts (« root exudates » ou « mucilage ») et les polluants (« polycyclic aromatic hydrocarbons » et « heavy metals »). D'autre part, la rhizodéposition est souvent restreinte uniquement aux exsudats racinaires, tandis que le mucilage est rarement étudié. En effet, lorsqu'on recherche root exudates et heavy metals on a quatre fois plus de résultats qu'en cherchant mucilage et heavy metals. L'écart se creuse encore d'avantage en remplaçant « heavy metals » par « polycyclic aromatic hydrocarbons ».

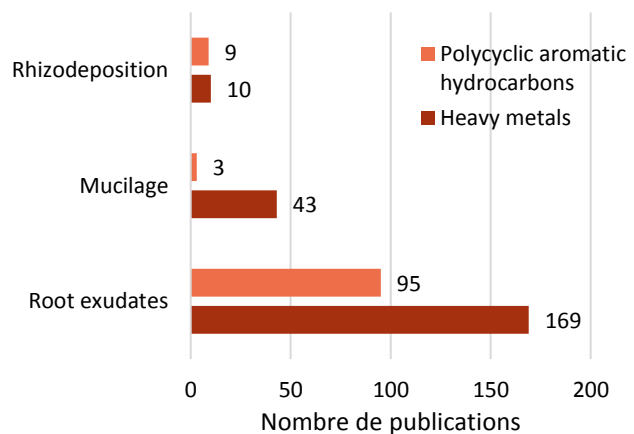


Figure 14 : Analyse bibliométrique des articles référencés dans Web of Science de 1950 à 2019 en utilisant les termes « rhizodeposition », « mucilage » et « root exudates » suivi de « polycyclic aromatic hydrocarbons » ou heavy metals ».

L'objectif de la thèse est donc de mieux caractériser l'impact de deux polluants modèles, le phénanthrène représentant la famille des polluants organiques de type HAP et le Cd pour la famille des éléments traces métalliques sur la rhizodéposition du maïs, utilisé comme plante modèle.

Pour répondre à cet objectif, nous nous sommes posés trois questions :

- (i) La plante émet-elle des rhizodépôts qualitativement et quantitativement différents en présence et en l'absence de polluants ?
- (ii) Ces rhizodépôts sont-ils différents si les polluants sont de nature organique ou métallique ?
- (iii) Quelle est la relation entre l'impact des polluants sur le fonctionnement de la plante et la rhizodéposition ?

Pour répondre à ces questions, la démarche générale a été :

- (i) Tout d'abord la mise au point d'un dispositif permettant la culture de plants de maïs exposés au niveau des racines à une pollution organique ou métallique
- (ii) Le développement/choix d'une méthode de collecte des rhizodépôts permettant de conserver leur intégrité chimique
- (iii) La mise au point de méthodes permettant d'analyser les principales familles de molécules composant les rhizodépôts et leur identification
- (iv) L'analyse morphologique et physiologique des plantes permettant d'évaluer l'impact des polluants sur leur métabolisme
- (v) L'étude dans la littérature des molécules identifiées dans les rhizodépôts et leurs effets connus sur les polluants
- (vi) Et enfin, la corrélation entre les processus mis en place au sein de la plante et ceux dans la rhizosphère face aux stress abiotiques

Chapitre II

Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Le maïs, une plante modèle

Nous utilisons le maïs (*Zea mays L.*) pour plusieurs raisons : le maïs est devenu récemment la céréale la plus cultivée à travers le monde devant le riz et le blé avec 817 millions de tonnes annuelles (FAOSTAT, 2009). C'est une plante d'une grande importance économique qui génère plusieurs milliards de dollars de revenu annuel. Le maïs est utilisé comme organisme modèle dans la recherche fondamentale depuis plus d'un siècle. Il possède une croissance rapide et une biomasse importante. Cette plante est étudiée dans des domaines variés tels que l'évolution du génome ou encore la résistance aux parasites (Strable & Scanlon, 2009). Le maïs est souvent utilisé pour étudier ses rhizodépôts qui sont émis en grandes quantités, notamment grâce à son large système racinaire et son rôle dans l'écologie de la rhizosphère (Benizri *et al.*, 2002; Boeuf-Tremblay *et al.*, 1995; Groleau-Renaud *et al.*, 1998a; Iijima *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2010; Morel *et al.*, 1990). Le mucilage entourant ses racines est d'ailleurs visible à l'œil nu. Au laboratoire, cette plante a également été étudiée à plusieurs reprises dans le cas de contaminations aux HAP et aux ETM (Dupuy *et al.*, 2015, 2016; Pernot *et al.*, 2014; Perriguy *et al.*, 2008).

La variété utilisée ici (MB862, INRA) est un hybride obtenu à partir d'un croisement entre les lignées F356 et D171 et cette variété a déjà été utilisée au laboratoire (Dupuy, 2014). Les graines utilisées sont désinfectées en surface selon un protocole employé par Baudoin (2001). Elles sont immergées dans de l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4 , 95 % v/v, 30 sec), rincées dans de l'eau déminéralisée, à nouveau plongée dans l'éthanol (Et-OH, 95 % v/v, 5 min), rincées, immergées dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 10 % v/v, 30 min) avant d'être rincées une dernière fois. Elles sont ensuite transférées en boîtes de Petri sur un milieu nutritif (Gélose tryptone soja). Après deux jours, les graines ayant germé sur des boîtes dépourvues de contamination sont sélectionnées pour être implantées dans les dispositifs.

1.2. Choix et préparation du substrat

Le substrat de culture est choisi pour être inerte vis-à-vis des rhizodépôts à collecter et des contaminants. Il doit être exempt de matière organique de façon à identifier clairement les molécules rhizodéposées. Le substrat doit permettre une bonne progression des racines dans le dispositif tout en opposant une résistance mécanique de façon à se rapprocher le plus possible du comportement des racines dans le sol. Pour ces raisons, nous avons choisi d'utiliser du sable de quartz (\varnothing 0.4-0.8 mm, Sibelco).

Pour s'assurer de l'absence de matière organique et de contaminant, le sable est préalablement lavé. Il est mis en contact avec de l'acide chlorhydrique (12 %, v/v) pendant une nuit puis rincé abondamment sur un tamis (200 μm) à l'eau déminéralisée jusqu'à obtention d'un pH équivalent à celui de l'eau utilisée. Le tamis permet de se débarrasser des particules fines inférieures à 200 μm . Le sable est ensuite séché en étuve ventilée (Memmert, 70 °C, 2 jours) avant d'être porté à 200 °C pendant 2 h pour stérilisation.

1.3. Apport des éléments nutritifs

La solution nutritive choisie pour l'apport des éléments est adaptée de la « solution de Hoagland » (Hoagland & Arnon, 1938). Des solutions mères individuelles sont préparées pour chacun des macroéléments (KNO_3 1.0 mol.L⁻¹, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1.0 mol.L⁻¹, KH_2PO_4 0.2 mol.L⁻¹, MgSO_4 0.4 mol.L⁻¹) tandis que les microéléments sont préparés en mélange (MnCl_2 , ZnSO_4 , CuSO_4 , H_3BO_3 , MoO_3 , 0.1 mmol.L⁻¹). Le fer est également préparé en solution individuelle ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaFeO}_8$, 0.01 mol.L⁻¹). Un volume défini de ces éléments est ensuite prélevé pour former une solution fille (SF) qui, après dilution au 1/10^{ème}, donne la solution nutritive (SN), avec les concentrations en nutriments suivantes : KNO_3 0.5 mmol.L⁻¹, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.5 mmol.L⁻¹, KH_2PO_4 0.1 mmol.L⁻¹, MgSO_4 0.2 mmol.L⁻¹, MnCl_2 9.1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, ZnSO_4 0.77 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, CuSO_4 0.32 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, H_3BO_3 46 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, MoO_3 0.15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaFeO}_8$ 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

1.4. Conditions de culture

Toutes les expériences sont réalisées dans une chambre de culture selon les conditions suivantes : la photopériode est de 16 heures, la température à 23 °C le jour, 18 °C la nuit et 70 % d'humidité relative. Le rayonnement lumineux est d'environ 350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

1.5. Expérience préliminaire et choix des concentrations

Ces expériences préliminaires visent à connaître la concentration en Fe et en Cd à ajouter aux solutions nutritives en vue de l'expérience définitive.

- Modélisation des interactions entre le Cd et le Fe

Pour déterminer la spéciation du Cd et du Fe dans la solution nutritive, le logiciel Visual MINTEQ (KTH) a été utilisé. En effet, ces deux éléments peuvent interagir avec des éléments de la solution nutritive et ainsi diminuer la quantité de Cd ou de Fe biodisponible. C'est donc pour maximiser la biodisponibilité de ces deux éléments que le logiciel a été utilisé en rentrant tous les ions et leur concentration ainsi que le pH.

- **Première expérience préliminaire**

Lors de cette expérience préliminaire, deux concentrations en Fe (5 et 10 μM) ont été testées et pour chaque concentration en Fe, on a quatre concentrations en Cd (0, 2, 5 et 10 μM) soit au total huit modalités. Pour chaque modalité, trois répétitions ont été réalisées soit 24 dispositifs. Après stérilisation et pré-germination, les plantules ont été enterrées dans 680 g de sol préalablement traités selon le protocole décrit précédemment.

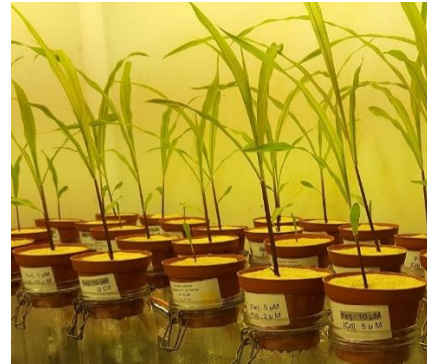


Figure 15 : Photographie de l'expérience préliminaire en phytotron.

La culture a été réalisée en phytotron et les nutriments ont été apportés *via* 150 mL d'une solution nutritive de Hoagland diluée au 1/10^{ème} et supplémentée en Fe et en Cd selon les concentrations préalablement choisies. Le volume de solution correspond à 80% de la capacité de rétention. Cette valeur est maintenue tout au long de la culture puis, après deux semaines, les plantes sont récoltées pour être pesées et mesurées.

- **Deuxième expérience préliminaire**

La seconde expérience est réalisée avec une concentration en Fe de 10 μM pour tous les plants mais en augmentant les concentrations en Cd qui sont désormais de 0, 20, 40 et 60 μM soit quatre modalités et 12 dispositifs. Les autres conditions de culture sont conservées et les plantes sont récoltées deux semaines après le semis.

1.6. Dispositifs de culture

Pour mener à bien les expériences, trois dispositifs de culture ont été testés après une étude bibliographique des différents modes de culture et de collecte des rhizodépôts.

1.6.1. Dispositifs de culture stériles de récolte en continu des rhizodépôts

Le premier dispositif de culture stérile de récolte en continu des rhizodépôts (Figure 16) vise à collecter essentiellement les exsudats racinaires de bas poids moléculaires, souvent fortement solubles. Ces derniers sont collectés en conditions stériles, empêchant ainsi les microorganismes de consommer les exsudats facilement dégradables.

1.6.1.1. Constitution des dispositifs

Le dispositif (Figure 16), inspiré de Baudoin, 2001; Boeuf-Tremblay et al., 1995; Groleau-Renaud, 1998 est composé d'une colonne en verre de 45 cm de haut et 5.5 cm de diamètre et disposant de 3 entrées (Techlab) : une entrée d'air sur le dessus et deux entrées à mi-hauteur permettant l'irrigation. Deux de ces entrées sont équipées d'un filtre 0.2 μm empêchant l'entrée de microorganismes tandis que la 3^{ème} est étanche grâce au tuyau permettant l'irrigation. Le dispositif contient 680 g de sable et est également équipé d'une sortie en bas de la colonne afin d'évacuer la solution résultante après percolation à travers le sable et les racines. Cette solution est récoltée dans un pot de récolte hermétique et disposant d'un bouchon septum situé sous la colonne et raccordé *via* un tuyau dont l'extrémité est équipée d'une aiguille. Une seconde aiguille raccordée à un filtre 0.2 μm permet la circulation de l'air tout en empêchant l'entrée de microorganismes. La colonne en verre est équipée d'un bouchon en verre rodé au sommet de celle-ci pour faciliter l'implantation de la graine. L'irrigation est permise *via* une pompe péristaltique (BVP Standard ISM 444, Ismatec) et une tête de pompe à cassettes (CA-8, Ismatec) permettant le passage des tuyaux (Tuyaux avec stoppeur pharmed BPT 0.25mm, extension de tuyaux pharmed ismaprene 0.25 mm, raccords en acier 0.30 mm, Ismatec) reliant la colonne à la solution nutritive contenue dans une bouteille en verre. Des ergots en verre sont également inclus dans le dispositif.

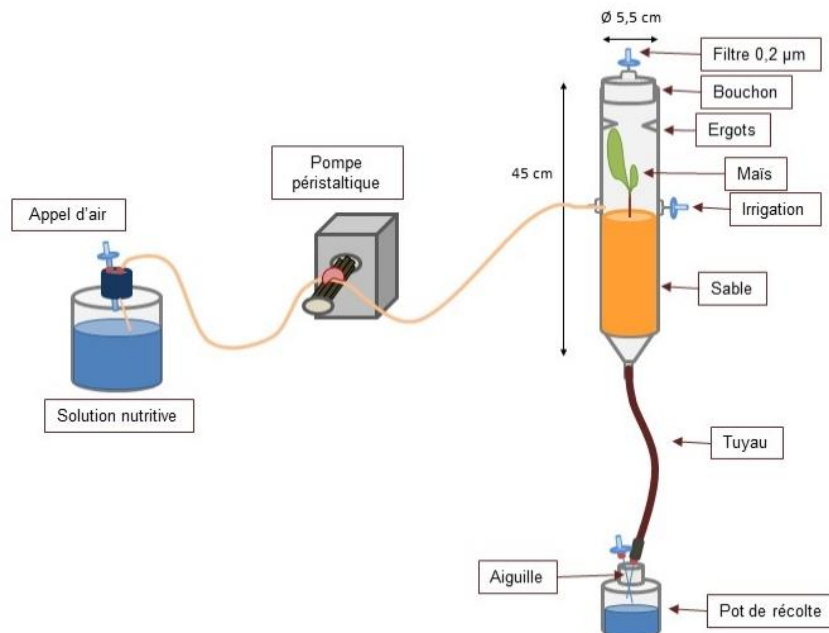


Figure 16 : Schéma du dispositif de culture stérile de récolte en continu des rhizodépôts (Source : Tatiana Buisson)

L'ensemble du dispositif est thermorésistant, permettant ainsi son autoclavage (20 minutes, 120°C).

1.6.1.2. Déroulement de la culture et méthode de collecte

L'irrigation du dispositif est assurée par la pompe péristaltique avec un débit journalier de 100 mL de la solution nutritive (SN) de Hoagland diluée au 1/10^{ème} pour les éléments majeurs et non diluée pour les éléments mineurs.

Lorsque la plante atteint 20 cm et touche le bouchon au sommet de la colonne, il faut déplacer le dispositif sous hotte à flux laminaire et dans des conditions stériles, placer un coton cardé autour de la tige, sur les ergots. Ainsi la plante peut croître sans contrainte de hauteur tout en restant stérile sous le coton.

L'irrigation permet, par percolation, de collecter dans le flacon de récolte une solution d'exsudation. Cette dernière est composée de la solution d'Hoagland diluée et des molécules exsudées par les racines entraînées par ladite solution. Le contenu du flacon est récolté tous les deux jours dans des conditions stériles *via* une seringue stérile à travers le septum. Nous supposons que la solution récoltée est essentiellement composée de molécules diffusées très solubles de type saccharides, acides aminés ou petits acides organiques.

Tout au long de la culture, les conditions de stérilité sont vérifiées. Pour cela, un volume de 100 µL de solution est prélevé afin de subir un étalement sur boîte de pétri (Gélose tryptone soja). Les boîtes sont ensuite incubées à 27 °C pendant sept jours.

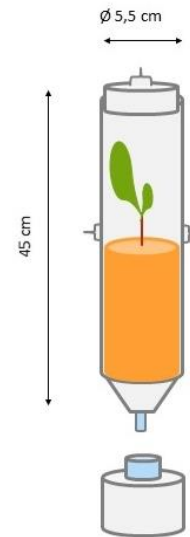
1.6.2. Dispositifs de culture non-stériles de récolte en continu des rhizodépôts

Ce second dispositif permet de collecter essentiellement les exsudats racinaires solubles et de bas poids moléculaires. Sensiblement identique au premier dispositif, la récolte est réalisée au cours du temps mais se déroule en conditions non-stériles. En effet, les microorganismes stimulent la production d'exsudats (Heulin *et al.*, 1987; Vančura *et al.*, 1977). Ils sont naturellement présents dans les sols et la rhizosphère est la résultante de l'action des rhizodépôts mais également l'action des microorganismes.

1.6.2.1. Constitution des dispositifs

Le dispositif ci-contre (Figure 17) est similaire au dispositif stérile précédent, à la différence que la culture se fait dans des conditions non-stériles. Il est composé de la colonne en verre précédemment décrite contenant 680 g de sable et d'un pot de récolte.

Figure 17 : Schéma du dispositif de culture non-stérile de récolte en continu des rhizodépôts (Source : Tatiana Buisson).



1.6.2.2. Déroulement de la culture et méthode de collecte

Les plants sont irrigués tous les deux jours avec 150 mL de SN diluée au 1/10^{ème} pour les éléments majeurs et non diluée pour les éléments mineurs.

La solution d'exsudation collectée dans les pots de récolte est récupérée 30 minutes après irrigation, le temps que la solution percole à travers le sable puis est immédiatement filtrée et congelée à -20 °C.

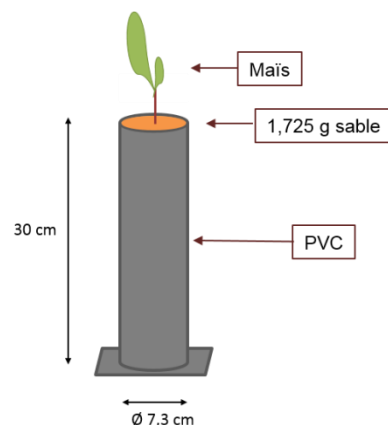
1.6.3. Culture non-stérile et récolte finale des rhizodépôts

Ce dernier dispositif vise à récolter différents types de rhizodépôts, à savoir les exsudats racinaires diffusés de bas poids moléculaire mais également le mucilage de plus haut poids moléculaire tapissant les racines.

1.6.3.1. Constitution des dispositifs

Les dispositifs de culture (Figure 18) sont des colonnes en polychlorure de vinyle (PVC) de 30 cm de hauteur et 7,3 cm de diamètre contenant 1,725 kg de sable sec. Le sable est placé dans un sac étanche à l'intérieur du tube PVC afin de faciliter la manipulation au moment de la récolte.

Figure 18 : Schéma du dispositif de culture non-stérile de récolte finale des rhizodépôts (Source : Tatiana Buisson).



1.6.3.2. Déroulement de la culture et méthode de collecte

En début de culture, 250 mL de SN non diluée sont apportés et constituent un stock de nutriments nécessaire à la croissance du maïs pendant toute la durée de l'expérience. Un autre apport de Fe est réalisé deux à trois semaines après le début de la culture avec 10 mL d'une solution à 0.042 g.L^{-1} de FeNaEDTA. La teneur en eau du substrat est maintenue à 80 % de la capacité de rétention en eau (CRE) par pesée, tous les deux jours, avec un ajustement avec de l'eau déminéralisée.

A l'issue de la culture, les plants de maïs sont récoltés. Ils sont sortis délicatement des dispositifs et le sable adhérent aux racines, appelé sable rhizosphérique est conservé sur le système racinaire. En effet, il est admis que le sol retiré manuellement en secouant la plante est appelé sol nu tandis que le sol qui reste accroché aux racines représente le sol rhizosphérique (Pinton *et al.*, 2007). Dans notre expérience, le reste du sable est quant à lui appelé sable non-rhizosphérique. Il est homogénéisé, puis environ 100 g sont conservés au congélateur à $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Dans certaines expériences, une partie des dispositifs est laissé sans plantes. Dans ce cas, le sable est appelé sable non-planté. De même que pour le sable non-rhizosphérique, le sable non-planté est homogénéisé et une portion de 100 g est prélevée et stockée dans des conditions similaires.

Suite à la récolte des plantes, deux étapes de collecte des rhizodépôts sont réalisées. La première consiste à récupérer le sable qui adhère aux racines par l'intermédiaire de mucilage qu'il convient d'extraire. En effet, l'émission simultanée durant la nuit de mucilage et d'eau permet le gonflement de ce premier. Il sèche ensuite et adhère aux racines pendant la phase de transpiration (McCully, 1995). Le mucilage, du fait de son haut poids moléculaire ne diffuse pas dans tout le système mais reste à proximité immédiate des racines (Rovira, 1969). Pour le récolter, les racines sont trempées dans un tampon phosphate salin (TPS : NaCl, 8 g.L^{-1} , Na_2HPO_4 , $1,44 \text{ g.L}^{-1}$, KH_2PO_4 , $0,24 \text{ g.L}^{-1}$, pH 7,2) de volume défini (Tableau 3(a)) permettant de recouvrir l'intégralité des racines et du sable adhérent. L'utilisation du tampon TPS permet de minimiser les échanges entre la solution et la racine et notamment la diffusion d'exsudats racinaires grâce à ses propriétés isotoniques et également d'éviter la dénaturation des protéines grâce à son pH optimal (Borg *et al.*, 2019; Šamaj *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1999; Vaughn & Campbell, 1988; Willats *et al.*, 2001). L'intégralité du sable est manuellement décrochée dans la solution tampon en frottant délicatement le sable contre les racines. L'opération étant réalisée

dans le tampon, le sable se décroche facilement des racines. La solution tampon et le sable sont alors mis en agitation rotative (2 h, 17 tours.min⁻¹) afin de solubiliser les molécules adhérentes au sable rhizosphérique. Cette solution est ensuite filtrée (Whatman, 516-0803, seuil rétention 2 µm) pour retirer le sable résiduel et d'éventuels débris racinaires. La solution résultante est appelée extrait de sable rhizosphérique. Le sable rhizosphérique est quant à lui séché (45 °C pendant 2 jours) et pesé. Les autres échantillons de sable, non-rhizosphérique et non-planté, subissent également cette étape d'extraction à partir d'une masse définie de sable (30 g) dans 100 mL de TPS pour former respectivement les extraits de sable non-rhizosphérique et les extraits de sable non-planté.

La seconde étape de collecte vise à récolter des exsudats racinaires diffusés, elle a été adaptée d'un protocole de Luo et al., (2014). Pour cela, les racines débarrassées de leur sable rhizosphérique sont rincées avec de l'eau déminéralisée puis trempées 6 heures dans un volume défini d'eau déminéralisée (Tableau 3(b)) permettant d'immerger l'intégralité des racines. La solution résultante est appelée solution de diffusion.

Tableau 3 : Volumes de TPS (a) et d'eau (b) utilisés pour la récolte des solutions de rhizodéposition dans les 3 expériences à suivre. L'expérience n°1 correspond à l'influence du Cd sur la rhizodéposition, l'expérience n°2 à l'influence du PHE sur la rhizodéposition et l'expérience n°3 à l'évolution temporelle de la rhizodéposition soumise à l'exposition à un polluant.

Expériences	N°1	N°2	N°3		
			Récolte 1	Récolte 2	Récolte 3
Volume de TPS (a)	150 mL	150 mL	50 mL	100 mL	100 mL
Volume d'eau (b)	150 mL	200 mL	50 mL	100 mL	100 mL

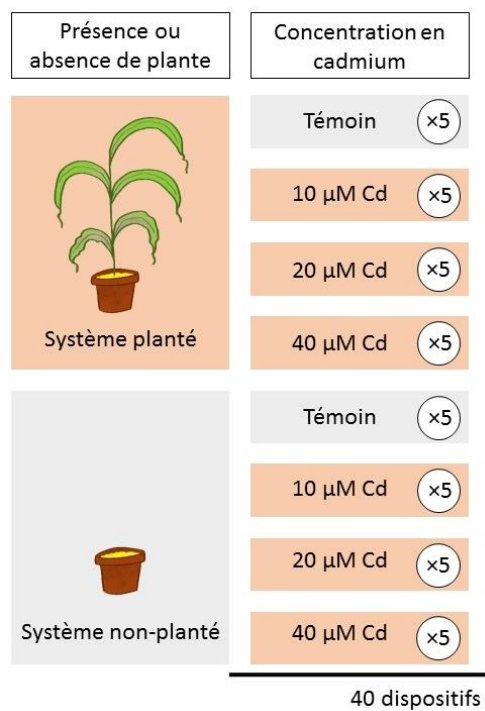
2. Présentation des expériences

Suite aux tests des différents dispositifs de culture, le dispositif de culture non-stérile et de récolte finale des rhizodépôts a été choisi. En effet, le maintien des conditions stériles tout au long de la durée d'expérimentation a été difficile à obtenir et le principe de récolte en continu des exsudats ne permet pas d'obtenir des concentrations suffisantes pour le dosage des composés organiques. Le dispositif a permis la mise en place de trois expériences en conditions contrôlées permettant la récolte de deux types de solutions de rhizodépôts :

- Expérience n°1 : Effet du Cd sur la rhizodéposition du maïs
- Expérience n°2 : Effet du PHE sur la rhizodéposition du maïs
- Expérience n°3 : Evolution temporelle de la rhizodéposition soumise à l'exposition à un polluant

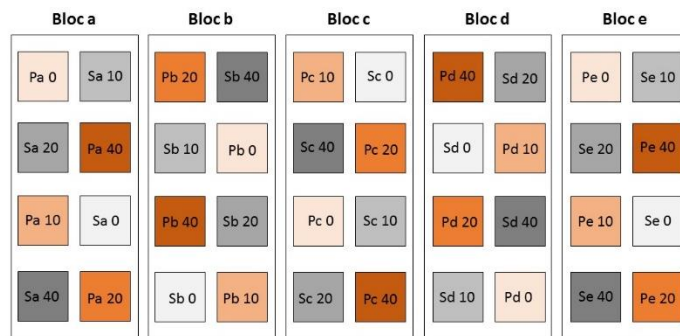
2.1. Effet du Cd sur la rhizodéposition du maïs

La première expérience permet d'exposer les plantes à un gradient croissant de concentrations en Cd allant de 0, 10, 20 jusqu'à 40 μM de Cd dans des conditions non-stériles. Pour chaque modalité, 5 répétitions plantées et 5 répétitions non-plantées sont réalisées (Figure 19). La répartition des répétitions est réalisée en blocs aléatoires (Figure 20). La culture a duré cinq semaines après semis.



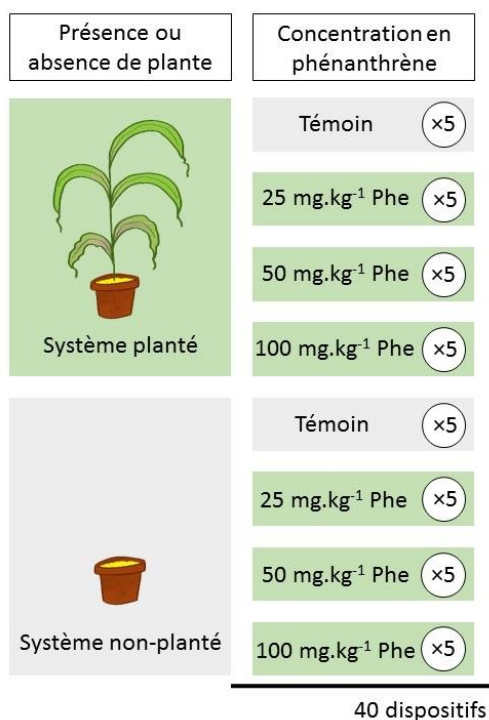
← Figure 19 : Plan d'expérimentation de l'expérience « effet du Cd sur la rhizodéposition du maïs ».

Figure 20 : Schéma du dispositif expérimental en pots en conditions de cultures contrôlées. P pour les dispositifs plantés, S pour les dispositifs non-plantés. 0, 10, 20, 40 correspond aux concentrations en Cd en μM . Les lettres a, b, c, d, e correspondent aux répétitions.



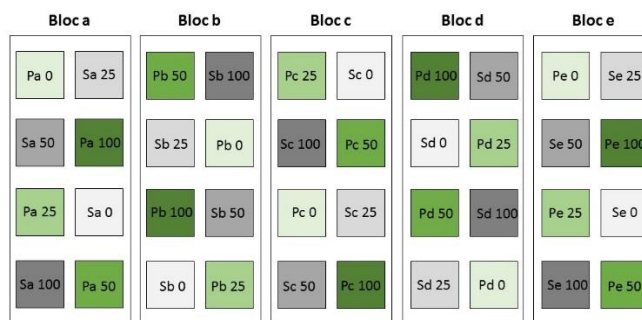
2.2. Effet du phénanthrène sur la rhizodéposition du maïs

Pour cette deuxième expérience, les plantes sont soumises à des concentrations croissantes en PHE : 0, 25, 50, 100 mg.kg^{-1} . Chaque traitement est appliqué sur des dispositifs plantés ou non-plantés et chaque modalité fait l'objet de cinq répétitions (Figure 21). Les plantes sont disposées dans le phytotron en blocs aléatoires et sont récoltées après cinq semaines de culture (Figure 22).



← Figure 21 : Plan d'expérience « effet du PHE sur la rhizodéposition du maïs ».

↓ Figure 22 : Schéma du dispositif expérimental en pots en conditions de cultures contrôlées. P pour les dispositifs plantés, S pour les dispositifs non-plantés. 0, 25, 50, 100 correspond aux concentrations en PHE en mg.kg⁻¹. Les lettres a, b, c, d, e correspondent aux répétitions.



2.3. Evolution temporelle de la rhizodéposition du maïs soumis à l'exposition à un polluant

Cette expérience permet de récolter les plants de maïs et ses rhizodépôts à trois stades phénologiques. Le maïs est exposé soit à du Cd à des concentrations de 40 ou 100 μM , soit à du PHE à des concentrations de 100 ou 250 mg.kg⁻¹. Un témoin non contaminé est également réalisé. Un tiers des dispositifs mis en place est récolté lorsque les plantes atteignent quatre feuilles puis deux autres tiers à six et huit feuilles. Seuls des dispositifs plantés sont mis en place. Chaque modalité est répétée cinq fois, ce qui fait au total 75 dispositifs (Figure 23).

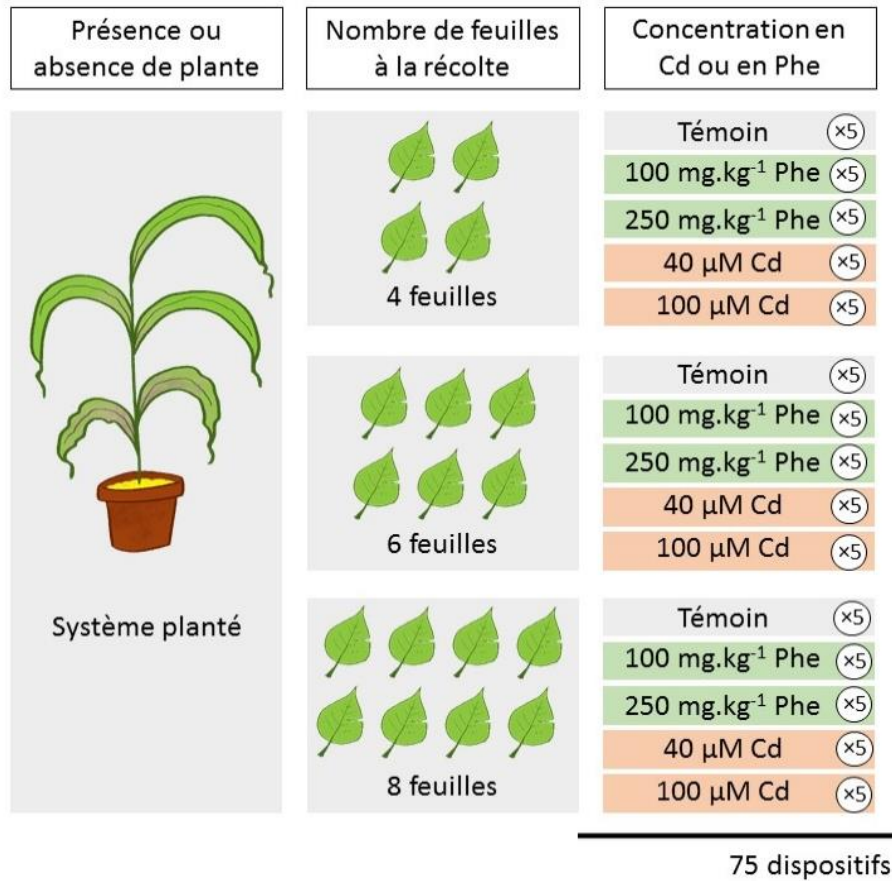


Figure 23 : Plan d'expérimentation de l'expérience « Evolution de la rhizodéposition ».

La répartition des dispositifs est réalisée en blocs formés de façon aléatoires (Figure 24).

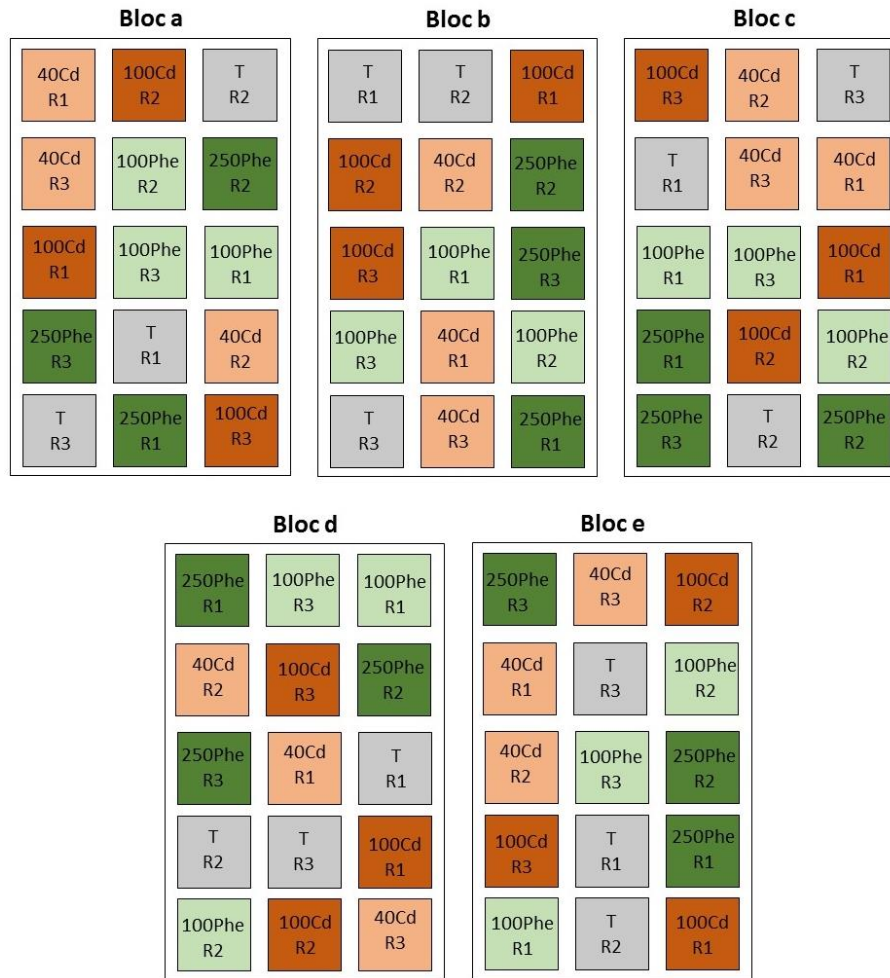


Figure 24 : Schéma du dispositif expérimental « Evolution de la rhizodéposition » en pots en conditions de cultures contrôlées. Les carrés verts correspondent aux concentrations en PHE (100 et 250 mg.kg⁻¹), les carrés oranges aux concentrations en Cd (40 et 100 µM) et T en gris indique les témoins. R1, R2 et R3 correspondent aux trois dates de récolte.

3. Contamination des dispositifs

3.1. Expérience n°1 : Culture de plantes contaminées au Cd

Le Cd est apporté sous forme de Cd(NO₃)₂. Ce composé étant soluble dans l'eau, il est apporté en une fois dans la SN, en début de culture. Dans un premier temps, une solution mère de Cd est réalisée (0.05 mol.L⁻¹). Des volumes de 0, 2, 4 et 8 mL sont apportés dans les SF avant une dilution au 1/10^{ème} permettant d'obtenir les SN aux concentrations en Cd attendues (0, 10, 20 et 40 µmol.L⁻¹ de Cd). Une fois converties en g.kg⁻¹ de sable, ces valeurs en µmol.L⁻¹ correspondent respectivement aux concentrations suivantes : 0, 163, 326 et 652 mg.kg⁻¹.

3.2. Expérience n°2 : Culture de plantes contaminées au phénanthrène

Le PHE est non soluble dans l'eau et est donc apporté directement par mélange avec le sable. Pour cela, une solution mère (SM) de PHE (43,1 g.L⁻¹) est réalisée dans du dichlorométhane

(DCM). Dans un premier temps, seul 10 % (m/m) du sable est contaminé avec une solution de PHE préparée à partir de SM de manière à obtenir un sable contaminé à une concentration dix fois supérieure à celle souhaitée au sein des dispositifs (en pratique 2 kg de sable sont contaminés avec 250 mL de solution de DCM préparée à partir de SM). Ce sable est ensuite placé sous sorbonne jusqu'à évaporation complète du DCM puis mélangé aux 90 % restant non-contaminés pour obtenir du sable contaminé à la concentration désirée. Le Tableau 4 reprend les volumes de solution SM apportés pour chaque niveau de PHE testé.

Tableau 4 : Préparation des solutions filles de PHE pour la seconde expérience, Cf : Concentration finale de PHE dans les dispositifs.

Cf (mg.kg ⁻¹)	0	25	50	100
Volume de SM (mL)	0	11.6	23.2	46.4
Volume de DCM (mL)	250	238.4	226.8	203.6

3.3. Expérience n°3 : Evolution de la rhizodéposition

Pour cette troisième expérience, les dispositifs sont soit non-contaminés, soit contaminés par du Cd ou du PHE selon la méthode décrite précédemment. Dans le cas du Cd les concentrations testées sont de 40 et 100 μM (soit 652 et 1630 mg.kg^{-1}). Pour le PHE, elles sont de 100 et 250 mg.kg^{-1} . Le protocole de contamination est le même que celui décrit en 3.2.

4. Mesures réalisées sur les plantes

4.1. Mesure des échanges gazeux foliaires

Les mesures de photosynthèse et de transpiration sont réalisées grâce à un système échangeur de gaz, le LI-COR 6400 XT (LI-COR, Austin, USA) sur deux feuilles, avant récolte (Figure 25). Pour l'expérience n°1, les feuilles sélectionnées sont les feuilles 7 et 8 tandis que pour la seconde expérience, les mesures sont réalisées sur les feuilles 6 et 7.

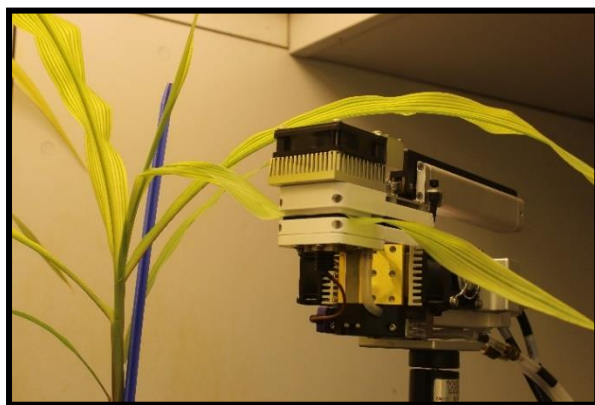


Figure 25 : LI-COR 6400 XT pendant une mesure des échanges gazeux foliaires d'une feuille de maïs (Source : Tatiana Buisson).

Ces dernières sont choisies pour leur taille permettant de remplir intégralement la chambre de mesure. Pour l'expérience n°3, les mesures d'échanges gazeux foliaires n'ont pas été réalisées

du fait de feuilles trop petites pour les deux premières récoltes. Chaque feuille est placée dans la chambre de mesure de surface connue (3×2 cm) sous conditions contrôlées ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR [photosynthetically active radiation ou rayonnement photosynthétiquement actif], Flux $300 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$, $T^{\circ}\text{air/block } 23^{\circ}\text{C}$, $\text{CO}_2\text{R } 400 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$). Le Li-cor mesure les échanges de CO_2 et d' H_2O réalisés entre la plante et la chambre de mesure pour en déduire une activité photosynthétique de la feuille ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) et une activité de transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Cinq mesures successives sont réalisées, une fois les activités photosynthétiques et de transpiration stabilisées.

4.2. Mesures morphologiques réalisées sur les plantes

Une fois les solutions de rhizodépôt récoltées, la longueur totale du système racinaire et la hauteur totale du système aérien sont mesurées (en cm). Ensuite, la plante est séparée en trois parties : le système racinaire, la tige et les feuilles et chaque partie est pesée.

4.3. Caractérisation du système foliaire

La surface foliaire est mesurée grâce à un appareil de calcul de surface portatif (LI-COR LI-3000C) couplé à un accessoire pour convoyeur à courroie transparente (LI-COR LI-3050C). Cet appareil permet de mesurer la surface foliaire en cm^2 . Les symptômes foliaires sont également notés.

4.4. Caractérisation du système racinaire

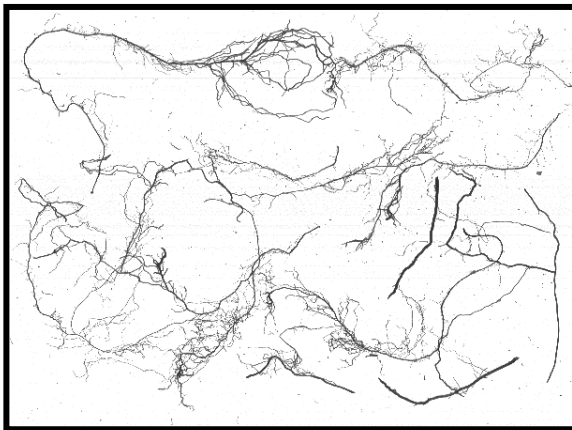


Figure 26 : Numérisation d'un système racinaire de maïs avant analyse par le logiciel Winrhizo®.

Le système racinaire est scanné selon une résolution de 600 dpi (Epson Expression 10000 XL) et l'image résultante (Figure 26) est analysée au moyen du logiciel d'analyse d'image WinRhizo® (WinRhizo, 2005, Regent Instruments Inc.). Cette analyse permet d'obtenir la longueur totale des racines (cm), leur diamètre moyen (mm), leur volume (cm^3) et la surface racinaire (cm^2).

4.5. Préparation des échantillons en vue des analyses

Les échantillons de plantes (feuille, tige, racine) sont plongés dans l'azote liquide avant d'être congelés séparément en attendant d'être broyés. Le broyage est effectué manuellement grâce à un mortier et un pilon sous azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre fine.

Le matériel congelé et broyé est ensuite pesé et réparti pour les analyses biochimiques suivantes : analyses des pigments, protéines, acides aminés et glucides totaux. Une partie de ce matériel, environ 1 g si possible, est séché (40 °C, 48 h) afin de déterminer le taux d'humidité de l'échantillon. Le matériel végétal sec est utilisé pour réaliser les analyses élémentaires : carbone, azote, éléments traces et éléments majeurs (Figure 27).

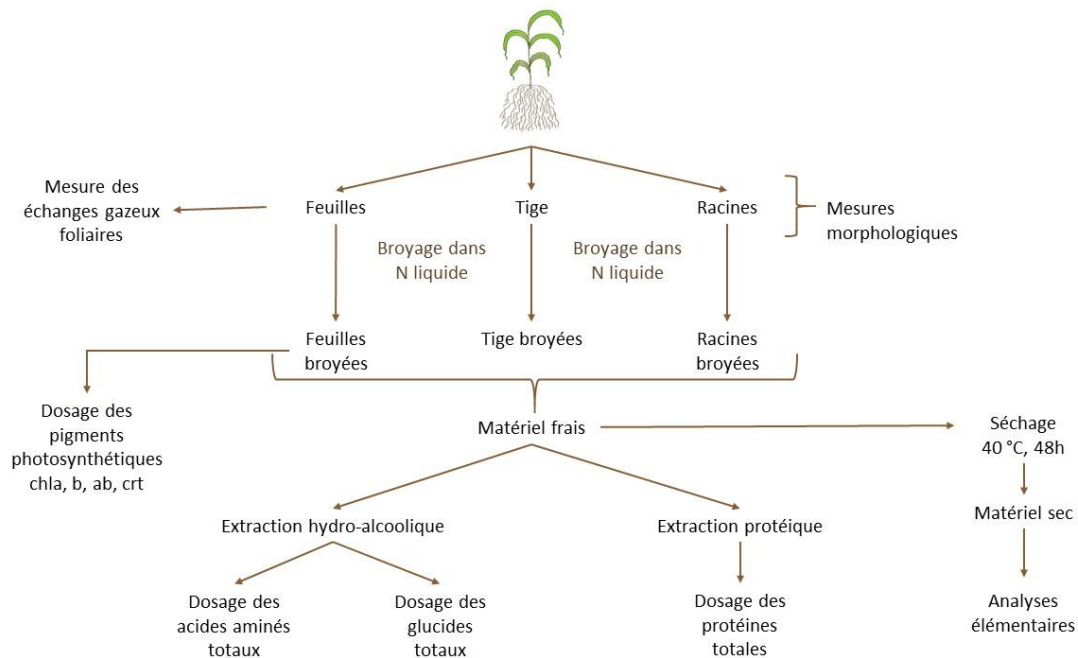


Figure 27 : Schéma des différentes analyses réalisées sur les échantillons de plante lors des trois expériences.

4.6. Analyses élémentaires

4.6.1. Dosage du carbone et azote total

Les teneurs en carbone et en azote des échantillons de tiges, feuilles et racines sont mesurées par combustion sèche, au moyen d'un analyseur élémentaire (Vario Micro Cube, Elementar). Une fraction homogène de 7 mg de matériel végétal sec finement broyé est pesé et introduit dans une nacelle en étain (6 × 4 mm, Sytab). Le pourcentage en carbone et en azote est obtenu

par comparaison avec un standard de sulfanilamide dont les teneurs en carbone et azote sont connues (C : 41.81 %, N : 4.65 %).

4.6.2. Mise en solution et dosage des éléments en traces et éléments majeurs

Les teneurs en éléments en traces et en éléments majeurs sont mesurées dans les échantillons de tiges, feuilles et racines séchés et broyés. Pour la mise en solution, une prise d'essai d'environ 50 mg est pesée dans un DigiTUBE (SCP Science), à laquelle est ajouté 1 mL d'acide nitrique (HNO_3 , 14.65 mol.L⁻¹) et 2 mL de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 12.7 mol.L⁻¹). Le mélange est laissé 16 heures en contact avant la phase de minéralisation. Celle-ci est réalisée grâce à un dispositif DigiPREP JR (SCP Science) avec une première montée en température jusqu'à 95 °C pendant 60 minutes et maintenue à 95 °C, 120 minutes. Après refroidissement, les échantillons sont complétés avec de l'eau déminéralisée (qsp 10 mL) puis filtrés à 0.45 µm. Pour chaque série de 40 échantillons, trois blancs sans prise d'essai sont ajoutés ainsi que trois contrôles internes réalisés à partir d'un échantillon de plante dont les teneurs en éléments sont connues. Les éléments (Al, As, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Zn) sont ensuite dosés par spectrométrie d'émission atomique en plasma induit d'argon (ICP-AES, ICAP 6300, Thermo Scientific).

4.7. Dosage des pigments photosynthétiques

Les pigments chlorophylliens (chlorophylle a, b et a+b) et les caroténoïdes sont extraits selon le protocole décrit par Lichtenthaler and Wellburn (1983). Pour cela, 500 µL d'acétone (80%, v/v) est ajouté à 30 mg de matériel végétal congelé. Après agitation à l'obscurité (17 tours.min⁻¹, 30 min) et centrifugation (4000 g, 20 min, 4°C), l'absorbance est lue à 663, 645 et 440 nm. Les différentes teneurs en pigments (mg.g⁻¹) sont calculées selon les équations suivantes :

$$\text{Chlorophylles a+b} = 22 A_{645} + 8.02 A_{663}$$

$$\text{Chlorophylle a} = 12.7 A_{663} - 2.69 A_{645}$$

$$\text{Chlorophylle b} = 22.9 A_{645} - 4.68 A_{663}$$

$$\text{Caroténoïdes} = (4.7 A_{440} - (1.38 A_{663} + 5.48 A_{645}))$$

4.8. Extraction et dosage des glucides et des acides aminés

4.8.1. Extraction hydro-alcoolique des sucres et acides aminés

Une étape d'extraction des sucres et des acides aminés est nécessaire préalablement à leur dosage (Harrison *et al.*, 2003). À 100 mg de matière congelée et broyée (tige, feuille ou racine) est ajouté 1 mL d'éthanol (80 %, v/v). Les échantillons sont ensuite agités pendant 1 h dans un agitateur rotatif (17 tours min⁻¹). Ils sont placés dans des jarres remplies de glace pour maintenir une température basse. Les extraits sont ensuite centrifugés (10 min, 14 000 g) et le surnageant récupéré avant que le culot ne subisse une deuxième (éthanol, 1 mL, 60 % v/v) puis une troisième extraction (eau déminéralisée, 1 mL). Entre chaque étape d'extraction, une centrifugation est réalisée afin de prélever le surnageant. Les trois surnageants sont ensuite assemblés pour former l'extrait hydro-alcoolique utilisé pour le dosage des acides aminés et des sucres totaux.

4.8.2. Dosage des glucides solubles totaux

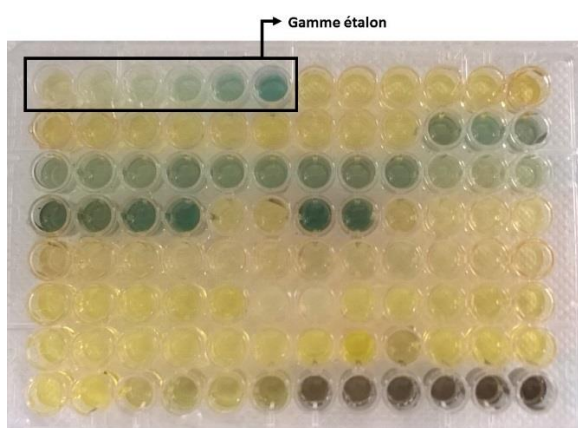


Figure 28 : Microplaque 96 puits lors du dosage des glucides solubles totaux selon la méthode à l'anthrone.

Une analyse combinant acide sulfurique et anthrone et décrite par Leyva *et al.* (2008) est utilisée pour doser les glucides présents dans les tissus végétaux (feuille, tige, racine). L'anthrone réagit avec la plupart des oses, diosides et polysaccharides pour former une coloration verte-bleue (Figure 28). L'analyse est menée sur microplaque par triplicats analytiques en mélangeant 50 µL d'extrait hydro-alcoolique à 150 µL de réactif (0,1 g anthrone, 100 mL acide sulfurique 98 %).

Du fait d'une réaction exothermique, la plaque est refroidie 10 minutes sur un lit de glace avant d'être placée 20 minutes à 100°C, recouverte d'un tapis de scellage. Une fois la plaque à température ambiante, celle-ci est lue à 620 nm. La molécule d'étalonnage utilisée ici est le glucose.

4.8.3. Dosage des acides aminés et ammonium totaux

Les acides aminés totaux et l'ammonium sont dosés selon la méthode utilisant la ninhydrine adaptée de Rosen (1957). La technique est basée sur la réaction colorimétrique des groupements aminés avec la ninhydrine formant un produit violet (Figure 29).

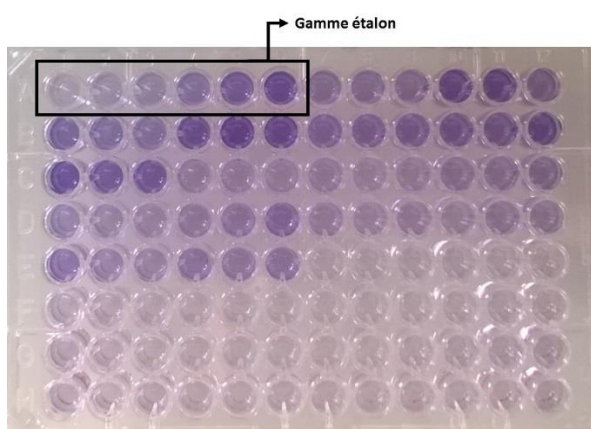


Figure 29 : Microplaques 96 puits lors du dosage des acides aminés totaux selon la méthode à la ninhydrine.

Du fait d'une quantité importante de réactifs, des microplaques à puits profonds sont utilisées (1.2 mL). Dans chaque puits, sont ajoutés successivement 100 μ L d'extrait hydro-alcoolique préalablement dilué au 1/5^{ème} dans l'eau, 50 μ L d'une solution de cyanure de potassium (10 mM KCN, dans tampon acétate, 2.6 M, pH = 5.2) et 50 μ L de solution de ninhydrine (ninhydrine 3% m/v, dans de l'éther monométhyle d'éthyl glycol).

Après agitation, la plaque est incubée 15 minutes à 100 °C puis la réaction est arrêtée avec l'ajout de 500 μ L d'une solution d'eau/isopropanol (50/50, v/v). Un volume de 200 μ L de la solution résultante est prélevé et transféré dans une microplaque classique (300 μ L) afin d'être lue au spectrophotomètre à 570 nm (Figure 29). La molécule d'étalonnage utilisée est la glutamine.

4.9. Extraction et dosage des protéines

4.9.1. Extraction des protéines

Comme pour les sucres et acides aminés, une étape d'extraction est nécessaire préalablement au dosage des protéines dans les tissus végétaux (tiges, racines et feuilles). L'extraction est réalisée d'après la méthode décrite par Fontaine et al. (2006) en ajoutant 400 μ L de tampon d'extraction (100 mM tricine, 40 mM CaCl₂, 0.5 % m/v polyvinylpyrrolidone, 0.5 % v/v triton 100 X, 1 mM acide éthylènediaminetétraacétique, 10 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM phénylméthylsulfonyl, pH = 8) à 100 mg de matériel végétal. Une centrifugation (15 000 g,

15 min, 4 °C) est réalisée après une homogénéisation de 3 min. Le surnageant obtenu constitue l'extrait protéique.

4.9.2. Dosage des protéines

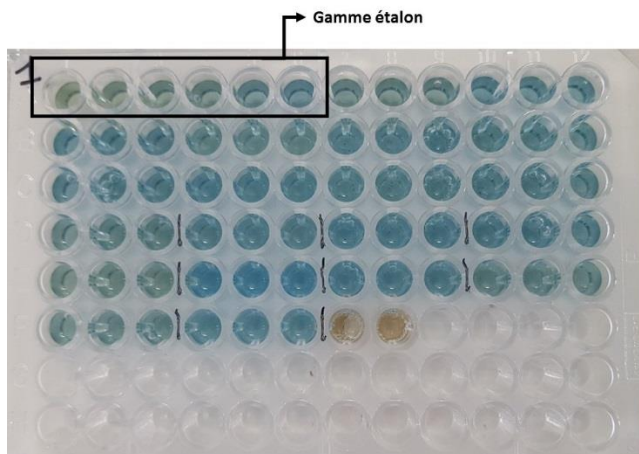


Figure 30 : Microplaque 96 puits lors du dosage des protéines selon la méthode de Bradford.

Le dosage des protéines est ensuite effectué suivant les instructions du kit Bio-Rad Protein Assay d'après la méthode décrite par Bradford (1976). Cette méthode a pour principe la formation de complexes entre le bleu de Coomassie contenu dans le réactif et les résidus basiques et aromatiques des protéines. En se liant aux protéines, le complexe devient bleu tandis que sous sa forme libre il est rouge.

Dans une microplaque (Figure 30), 10 μ L d'échantillon est ajouté à 200 μ L de réactif dilué au 1/5^{ème} dans l'eau. Après 5 min d'incubation, la microplaque est lue à 595 nm. La molécule d'étalonnage utilisée est le sérum albumine bovine fourni dans le kit.

5. Analyse des solutions de rhizodéposition

5.1. Préparation des échantillons

Suite à la collecte (Figure 31), les solutions de rhizodéposition sont filtrées à 0.45 μ M (Filtre polypropylène et acrylique modifié, Acrodisc) pour retirer les éventuels débris cellulaires et grains de sables résiduels puis immédiatement congelées à -20°C. Avant analyse, les solutions sont décongelées et deux sous-échantillons d'environ 40 mL sont prélevés pour être lyophilisés (Lyophilisateur Alpha 1-4 LDplus, Christ). Pour un échantillon, nous disposons donc de la solution sous sa forme liquide non lyophilisée et de deux sous-échantillons sous forme sèche après lyophilisation. Le premier sous-échantillon sec est repris dans 3 mL d'eau déminéralisée, permettant la solubilisation de petites molécules telles que les sucres ou les acides aminés et servira par la suite aux analyses LC-MS et aux analyses biochimiques totales. Pour une meilleure solubilisation des composés, l'échantillon est plongé dans un bain à ultrasons (5210, Branson) pendant 45 minutes puis filtré à nouveau (0.45 μ M) et conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Le second sous-échantillon est quant à lui repris dans 3 mL d'acétonitrile et

également soumis aux ultra-sons pendant 45 minutes. Ces étapes permettent la mise en solution de molécules organiques, telles que les acides organiques ou les acides gras, dosées par GC-MS. La solution est également filtrée à 0.45 μM puis conservée au congélateur à -20°C jusqu'à analyse.

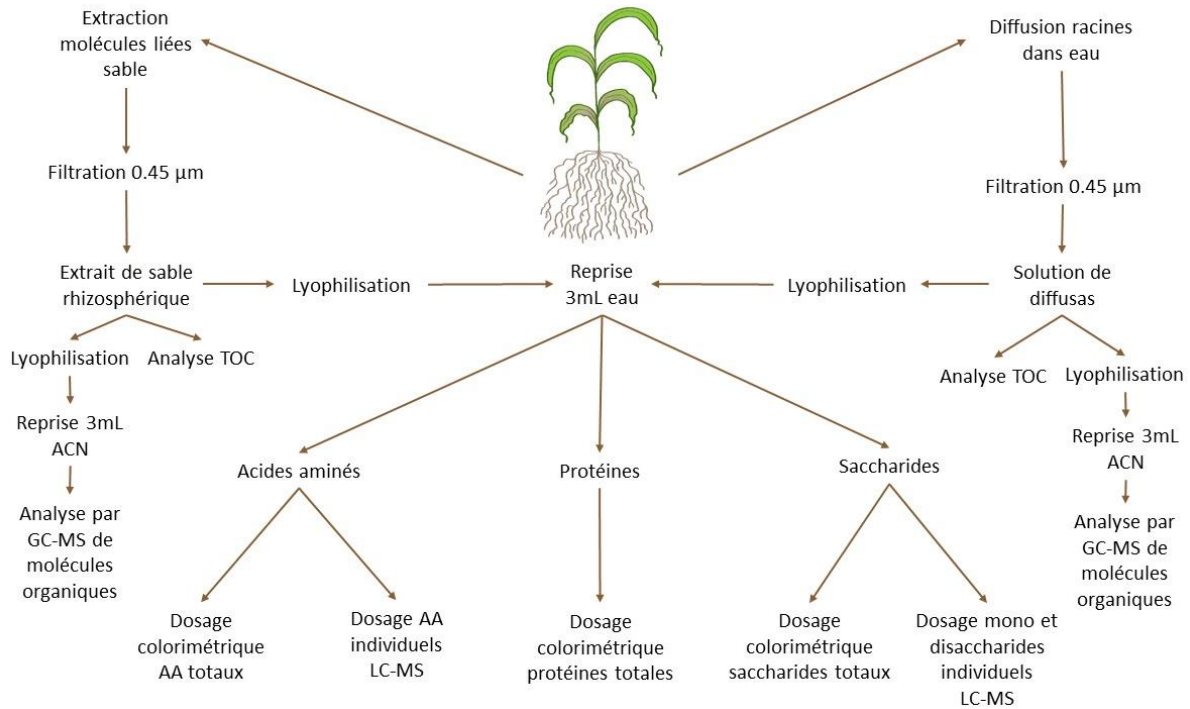


Figure 31 : Schéma des différentes analyses réalisées sur les solutions de rhizodépôts lors des trois expériences. TOC carbone organique total, ACN acétonitrile, AA acides aminés.

5.2. Mesure du carbone total

Le carbone total dans les solutions de rhizodéposition est mesuré sur les échantillons non-lyophilisés au moyen d'un analyseur de carbone organique total (TOC-VSCN, Shimadzu). Le carbone inorganique étant inférieur aux limites de quantifications dans nos échantillons, le carbone total est donc assimilé au carbone organique. Une solution commerciale de carbone organique total (TOC Standard, SCP Science) est utilisée comme contrôle et comme étalon. Le volume d'injection est de 50 μL .

5.3. Dosage des glucides

5.3.1. Dosage des glucides totaux

Le dosage des glucides totaux est réalisé selon le protocole de Leyva et al. (2008). Un volume de 50 μL d'échantillon est ajouté à 150 μL de la solution d'anthrone et le reste du protocole est identique en tous points à celui décrit en 4.8.2.

5.3.2. Dosage de mono et di-saccharides

Huit mono et di-saccharides sont quantifiés dans les solutions de rhizodépôts concentrées selon le protocole de Ricochon et al. (2011) : la cellobiose, le glucose, le saccharose, le fructose, le mannose, le mannitol, le xylose et le rhamnose. Les composés d'intérêt sont analysés quantitativement sur un système LC-MS (Thermo Scientific, États-Unis), comprenant une pompe de distribution de solvant binaire connectée à un détecteur à photodiodes (PDA) et un spectromètre de masse LTQ équipé d'une interface d'ionisation opérant en ionisation chimique à pression atmosphérique négative (APCI). L'analyse chromatographique est réalisée sur une colonne Polyamine II HILIC (250 x 4,6 mm, 5 μ m, YMC, Allemagne) équipée d'une colonne de garde (7,5 x 4,6 mm, 5 μ m, YMC, Allemagne). Les phases mobiles consistaient en un mélange d'eau ultrapure (phase A) et de 1 % de chloroforme dans de l'acétonitrile (phase B). 20 μ L d'extraits sont injectés dans le système et les sucres sont séparés à un débit de 1 mL.min⁻¹ en mode isocratique (A/B : 25/75). Les sucres sont analysés en mode SIM grâce à des adduits chlorés [M + 35]⁻ et [M + 37]⁻ qui correspondent aux isotopes stables du chlore. Les fenêtres m/z utilisées pour le criblage spécifique sont définies comme suit : 167-188 m/z pour le xylose, 198-202 m/z pour le rhamnose, 214-232 m/z pour le fructose, le glucose, le mannose et le mannitol, 376-382 m/z pour le saccharose et le cellobiose. Les conditions de spectrométrie de masse sont les suivantes : la tension de nébulisation est fixée à 6 kV, le gaz source est réglé (en unités arbitraires min⁻¹) respectivement pour le gaz du fourreau, le gaz auxiliaire et le gaz de balayage à 40, 10 et 10, la température capillaire est réglée à 225 °C, la tension capillaire est fixée à -10 V, les tensions de la lentille tubulaire, de la lentille de séparation et de la lentille frontale sont respectivement fixées à -47 V, 78 V et 5,25 V. Les paramètres d'optique ionique sont optimisés en mode APCI à l'aide d'une solution standard de glucose à 0,1 g.L⁻¹ perfusée en phase mobile (A / B : 25/75) à un débit de 5 μ L.min⁻¹. Afin de doser les polysaccharides de l'extrait de sable rhizosphérique concentré, un volume de 1 mL de la solution de rhizodépôts concentrés est hydrolysée en conditions acides selon un protocole adapté de Happi Emaga et al. (2012) (15 min, 105 °C, HCl 7,7%, rampe de température de 45 min). Les courbes d'étalonnage externes des sucres sont tracées de 0,001 à 0,1 mg.L⁻¹ pour les solutions de diffusat et de 0,001 à 0,5 mg.L⁻¹ pour les extraits de sable rhizosphérique.

5.4. Dosage des acides aminés

5.4.1. Dosage des acides aminés totaux

Le protocole est identique à celui décrit en 4.8.3., à l'exception de la prise d'essai de solution de rhizodéposition qui est ici de 100 μL .

5.4.2. Dosage des acides aminés individuels

L'identification et le dosage de 19 acides aminés sont réalisés sur le système LC-MS (ThermoFisher Scientific) opérant en mode électro-spray positif (ESI⁺) d'après un protocole adapté de Chaimbault (2000) : la glycine, la sérine, l'alanine, la thréonine, l'asparagine, la cystéine, l'acide aspartique, la proline, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, la glutamine, l'acide glutamique, la valine, la lysine, la méthionine et la leucine non différenciée de l'isoleucine. Ces acides aminés sont séparés sur une colonne poreuse de graphite (150 mm * 2.1 mm, Hypercarb, Thermofisher) équipée d'une colonne de garde (7.5 mm \times 4.6 mm cartridge, YMC, Germany) et élués par deux phases mobiles : de l'acide nanofluoropentanoïque dilué dans de l'eau (20 mM) pour la phase A et de l'acétonitrile pour la phase B. Les deux phases sont délivrées à un flux de 0.200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ selon le gradient décrit dans le Tableau 5 et le volume d'injection est de 16 μL .

Tableau 5 : Gradient d'éluion des deux phases mobiles ; A (acide nanofluoropentanoïque 20 mM) et B (acétonitrile).

Temps (min)	0	10	12	29	34	50	50.5	56
% B	0	5	27	27	70	70	0	0
% A	100	95	73	73	30	30	100	100

Les temps de rétention des acides aminés dans nos mélanges complexes sont d'abord validés grâce à un criblage en MS2. Ensuite, les analyses quantitatives sont réalisées en routine en MS en mode balayage de 70 à 300 m/z permettant le criblage des ions parents correspondant à leur forme monoprotonée $[\text{M}^+\text{H}]^+$. Les conditions de spectrométrie de masse sont réglées comme suit : la tension de nébulisation est fixée à 4.5 kV, le gaz source est réglé (en unités arbitraires min-1) respectivement pour le gaz du fourreau, le gaz auxiliaire et le gaz de balayage à 20, 5 et 5, la température capillaire est réglée à 250 °C, la tension capillaire est fixée à -16 V, les tensions de la lentille tubulaire, de la lentille séparatrice et de la lentille frontale sont respectivement

fixées à 50 V, -60 V et -5,25 V. Les paramètres d'optique ionique sont optimisés en mode ESI+ *via* un réglage automatique grâce à une solution standard de norleucine à 0,1 g.L⁻¹ perfusée en phase mobile (A/B : 50/50) à un débit de 5 µL.min⁻¹. Des courbes de calibration externes sont réalisées à partir de deux mélanges de référence. Le premier est un mélange commercial comprenant de nombreux acides aminés (Amino Acid Standards, physiological Acidics, Neutrals, and Basics, Produit n° A9906, mmol.ml⁻¹ Sigma Aldrich) et le second en complément, un mélange de trois acides aminés : asparagine, cystéine, glutamine. Les données brutes sont ensuite traitées *via* le logiciel XCALIBUR (version 2.1, Thermoscientific).

5.5. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines solubles totales dans les rhizodépôts est effectué en suivant les instructions du kit Quick Start Bradford Protein Assay d'après le principe décrit par Bradford (1976). Un volume de 100 µL de solution de rhizodéposition est ajouté dans les puits d'une microplaque en triplicat ainsi que 100 µL du réactif contenu dans le kit dilué au 1/5^{ème}. Après 5 min d'incubation à température ambiante à l'obscurité, l'absorbance est lue à 595 nm. Le standard utilisé est une solution d'albumine de sérum bovin fournie avec le kit.

5.6. Préparation des échantillons et dosage de molécules organiques

En complément du dosage des sucres et des acides aminés individuels, une approche par GC-MS a été utilisée pour identifier d'autres familles de molécules (acides organiques, acides gras...) selon un protocole adapté de Luo et al. (2014). Pour cela, les solutions de rhizodéposition solubilisées dans l'acétonitrile subissent une étape de dérivation, dont le protocole est décrit par Luo et al. (2014). Cette étape préalable à l'analyse permet de doser un grand nombre de molécules et d'améliorer les performances chromatographiques comme la séparation ou l'intensité des pics. Deux dérivations successives sont appliquées sur les échantillons. La première est une réaction de méthyloxyamination consécutive à l'ajout de méthyloxyamine hydrochloride. Cette dernière molécule réagit avec les groupements carbonyles en formant un dérivé d'oxime (CH₃ON). La seconde dérivation est une réaction de silylation due à l'ajout de N-méthyl-N-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide (MSTFA). Cette réaction implique le remplacement d'un hydrogène sur le composé initial (OH, SH, NH) par un groupe triméthylsilyle (SiMe₃). Pour cela, un volume de 1 ml de la solution de rhizodépôts lyophilisée et reprise dans l'ACN est ajouté dans un flacon GC-MS compatible et évaporé à sec sous un flux d'azote. Le résidu sec est mis en suspension dans 1 ml de n-hexane (≥ 95%) auquel est ajouté 40 µL de méthyloxyamine hydrochloride (20 mg.ml⁻¹, dans du pyridine). Après agitation

rotative (2 h, 37 °C, 17 tours min⁻¹), 70 µL de MSTFA sont ajoutés et le tout est agité à nouveau (30 min, 37°C, 17 tours min⁻¹).

La détermination des acides organiques et autres composés dans nos solutions de rhizodéposition est réalisée grâce au système GC-MS composé d'une chromatographie en phase gazeuse (7890A, Agilent Technologies, USA) couplée à un spectromètre de masse (5975C, Agilent Technologies, USA) équipée d'une source d'ionisation électronique (EI) et d'un passeur d'échantillons automatique MPS. Une colonne capillaire DB-5MS (25 m x 0,25 mm x 0,251 m) de Agilent J & W (Agilent Technologies, USA) est utilisée. L'injection est réalisée en mode splitless avec 10 µL d'échantillons à 230 ° C. Le débit de gaz vecteur (hélium) est de 1 mL.min⁻¹. La température de la colonne est maintenue pendant 2 min à 50°C, suivie d'une rampe de 13 min jusqu'à 180 °C et maintenue pendant 5 min à cet température, suivie d'une nouvelle rampe de 14 min jusqu'à 250 °C et 10 min à 250°C. Les températures d'interface et de source d'ions sont ajustées à 250 et 220 °C. Les spectres de masse sont enregistrés à 2,66 balayages.s⁻¹ avec une plage de balayage m/z de 50 à 600. Des échantillons contrôles d'acide malonique ou benzoïque (150 µmol.L⁻¹) et des blancs sont intercalés régulièrement pendant la séquence.

Chapitre III

Profil métabolique des rhizodépôts de haut et bas poids moléculaire du maïs exposé à des concentrations croissantes de cadmium

La concentration en Cd biodisponible est dépendante de la présence de ligands dans le sol. Ces derniers peuvent, entre autres, être des rhizodépôts, et être aussi variés que des acides aminés, des acides organiques ou encore des polysaccharides. Leur émission dans la rhizosphère pourrait être le premier mécanisme permettant à la plante de mieux tolérer les stress abiotiques tels que la présence de Cd. C'est pourquoi le but de cette étude est de caractériser qualitativement et quantitativement la composition des principaux rhizodépôts émis par le maïs (*Zea mays L.*) soumis à un stress cadmié afin de discuter leur rôle dans la disponibilité et la tolérance au Cd.

Suite à une expérience permettant de déterminer les concentrations en Cd à appliquer, des plants de maïs sont cultivés pendant six semaines dans du sable à quatre niveaux d'exposition au Cd (0, 10, 20 et 40 μM de Cd dans une solution nutritive) et deux types de rhizodépôts sont recueillis à la fin de la culture. Le mucilage et d'autres molécules adhérant au sable rhizosphérique sont extraits avec un tampon et les exsudats racinaires sont collectés par diffusion dans l'eau. Le carbone total, les protéines, les acides aminés et les sucres sont analysés dans les deux types de rhizodéposition et environ 40 molécules sont identifiées par GC-MS et LC-MS. L'impact du Cd sur la morphologie (allocation de biomasse, architecture racinaire, surface foliaire) ainsi que sur la physiologie du maïs (activité photosynthétique, teneurs en protéines, acides aminés et sucres) a également été évalué. La toxicité du Cd a entraîné une diminution de la croissance des plantes et une baisse de l'activité photosynthétique. Elle a également eu un impact sur la rhizodéposition avec une diminution du carbone total, des sucres et des acides aminés. Une telle diminution n'était pas perceptible pour les protéines. Ces observations ont été confirmées par l'analyse individuelle des composés. En particulier une augmentation de certains acides organiques comme l'acide lactique ou l'acide aconitique qui peuvent modifier, directement ou indirectement, la spéciation et la dynamique du Cd dans le sol et pourraient jouer un rôle dans la tolérance du maïs au Cd.

Expérimentations préliminaires : choix des concentrations en cadmium

Chapitre 3a.

1. Introduction

Les expériences préliminaires ont pour objectif de déterminer les concentrations en Cd auxquelles exposer le maïs de façon à observer des effets du polluant sur la morphologie et la physiologie de la plante sans pour autant entraîner un effet léthal.

D'autre part, le fer est apporté sous forme de FeNa-EDTA pour sa capacité à être stable dans l'eau contrairement au FeCl_3 qui a tendance à précipiter sous forme d'hydroxydes très peu assimilable par la plante. L'EDTA chélate le Fe, mais en présence de Cd, ces métaux peuvent entrer en compétition et le Cd peut ainsi prendre la place du Fe dans le complexe Fe/Na-EDTA rendant le Cd et le Fe non absorbables par la plante. Les concentrations en Fe et en Cd libre dépendent l'une de l'autre et peuvent provoquer des carences en Fe et une réduction de l'effet attendu du Cd. C'est pourquoi nous avons dans un premier temps testé plusieurs concentrations.

Dans la première expérience préliminaire, deux concentrations en Fe (5 et 10 μM) et trois concentrations en Cd (2, 5 et 10 μM) sont testées, en plus du témoin non contaminé. Dans la seconde expérience préliminaire, les plantes sont toutes soumises à des concentrations en Fe de 10 μM , en revanche, les concentrations en Cd sont plus élevées que dans la première expérience : 20, 40 et 60 μM . Les cultures ont duré chacune 20 jours.

2. Résultats

2.1. Expérience préliminaire n°1



Figure 32 : (A) Photographie des plants de maïs durant la culture exposés à des concentrations croissantes en Cd (0, 2, 5 et 10 μM) et à deux concentrations en Fe (5 et 10 μM). (B) Photographie des plants de maïs, à l'issue de la culture, exposés à 2 ou 10 μM de Cd et 5 ou 10 μM de Fe (Source : Tatiana Buisson).

Visuellement, les plants ne présentent pas de symptômes foliaires de type chlorose ou nécrose (Figure 32). Ils ne semblent pas affectés par le gradient de concentration en Cd et ne semblent pas être carencés en Fe.

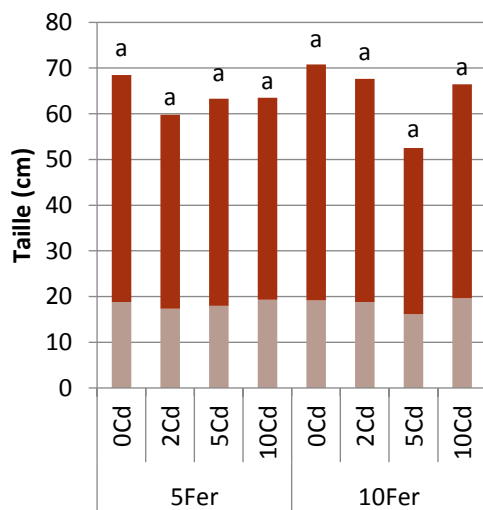


Figure 33 : Taille moyenne en cm du système aérien (SA) et du système racinaire (SR) de plants de maïs exposés à des concentrations croissantes en Cd (0, 2, 5 et 10 μM) et à deux concentrations en Fe (5 et 10 μM).

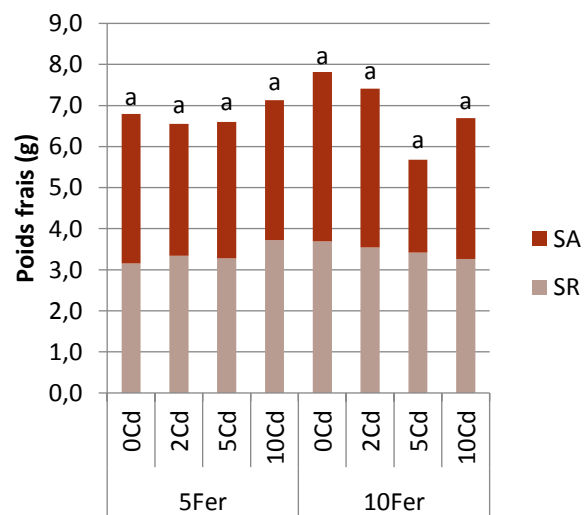


Figure 34 : Poids en g du système aérien (SA) et du système racinaire (SR) frais de plants de maïs exposés à des concentrations croissantes en Cd (0, 2, 5 et 10 μM) et à deux concentrations en Fe (5 et 10 μM).

Moyenne, $n = 3$. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes au seuil de 5 %. Une Anova à un facteur suivie du test post-hoc de Tukey est utilisée ou un test de Kruskal-Wallis suivi du post-hoc de Fisher.

Les plants ne présentent pas de différence significative au niveau de leur taille (Figure 33) ni au niveau de leur poids frais (Figure 34). Les systèmes racinaires mesurent en moyenne 18 ± 3 cm et les systèmes aériens 46 ± 7 cm.

2.2. Expérience préliminaire n°2

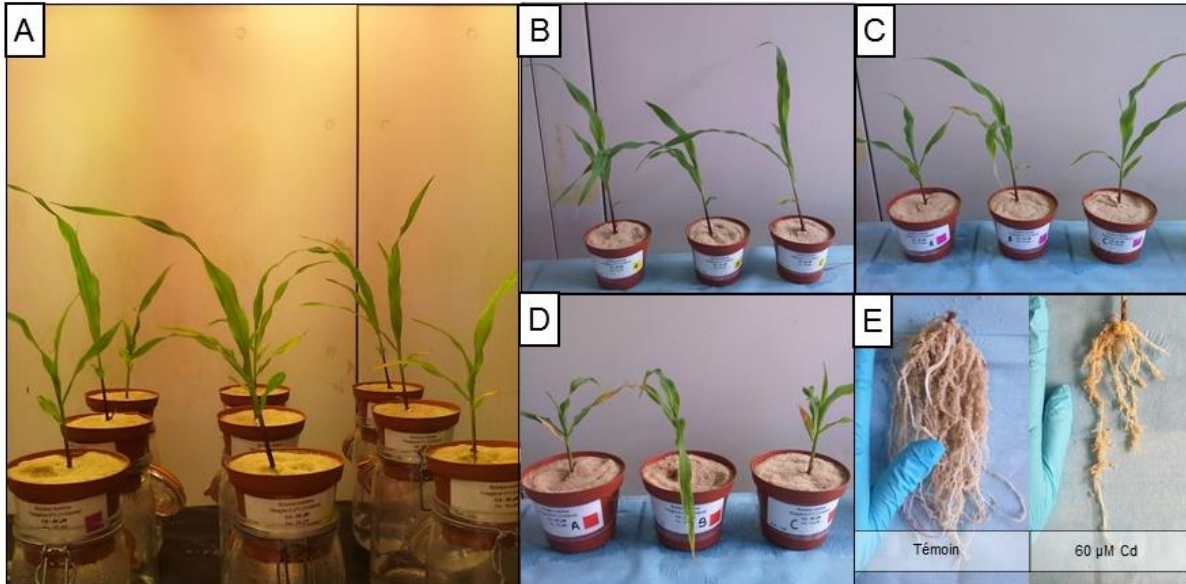


Figure 35 : Photographie des plants de maïs exposés à des concentrations croissantes en Cd (0, 20, 40 et 60 μM) durant la culture et des plants (A) à l'issue de la culture exposés à 20 μM de Cd (B), 40 μM de Cd (C) et 60 μM de Cd (D). Photographie de racines de maïs non-exposés et exposés à 60 μM de Cd et du sable rhizosphérique adhérent (E) (Source : Tatiana Buisson).

Dans cette seconde expérience préliminaire, des symptômes foliaires sont visibles dès 20 μM de Cd avec l'apparition de chloroses sur les feuilles basses. Sur les modalités 40 et 60 μM , en plus des chloroses, des nécroses font leur apparition, plus importantes pour la modalité 60 μM (Figure 35).

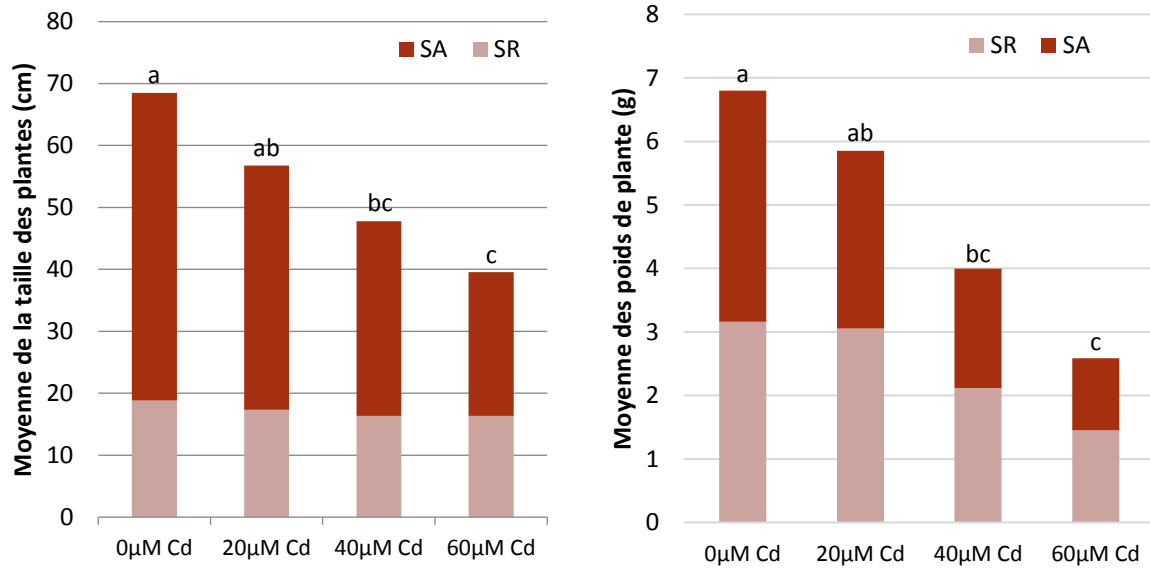


Figure 36 : Taille totale du SA et du SR (cm) selon la concentration en Cd (0, 20, 40 et 60 µM) et 10 µM de Fe. Figure 37 : Poids frais du SA et du SR (g) selon la concentration en Cd (0, 20, 40 et 60 µM) et 10 µM de Fe.

Moyenne, n=3. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes au seuil de 5 %. Une Anova à un facteur suivie du test post-hoc de Tukey est utilisée ou un test de Kruskal-Wallis suivi du post-hoc de Fisher.

La taille des plantes est visiblement et significativement affectée par la présence de Cd avec une diminution graduelle de celle-ci (Figure 36). Il en est de même pour leur poids frais (Figure 37). Ainsi, les témoins pèsent environ 6.8 g tandis que les plants exposés à 60 µM pèsent environ 2.6 g.

3. Conclusion

Dans la première expérience, les plants de maïs, sur la durée d'exposition, ne sont pas affectés par la présence de Cd ni par les différentes concentrations en Fe. Les concentrations choisies en Cd sont trop faibles pour avoir un effet toxique visible sur les plants après 20 jours de croissance. En revanche la deuxième expérience, menée avec des concentrations plus importantes en Cd, met en évidence l'impact significatif du métal sur la morphologie des plants. Les concentrations choisies ici mettent clairement en évidence l'effet toxique du polluant sur la plante. En conséquence, pour la suite de l'expérience, les concentrations suivantes en Cd ont été retenues sont 0 (témoin), 10, 20 et 40 µM. La concentration 10 µM représente une modalité qui semble peu affecter le fonctionnement de la plante alors que la concentration 40 µM l'affecte davantage. La modalité 20 µM représente quant à elle une concentration intermédiaire.

Les résultats de l'expérience portant sur l'évolution quantitative et qualitative de la rhizodéposition du maïs en réponse à une exposition à des doses croissantes de Cd sont présentés ci-dessous. Une première partie des résultats a fait l'objet d'un article accepté dans

Environmental Science and Pollution Research. Il comporte les résultats sur les rhizodépôts récoltés ainsi que sur certains paramètres biochimiques mesurés dans la plante en particulier au niveau racinaire. La deuxième partie correspond à des résultats complémentaires portant sur les teneurs en Cd, carbone et azote dans la plante ainsi que sur des paramètres biochimiques mesurés dans les parties aériennes.

Profiling of main metabolites in root exudates and mucilage collected from maize submitted to cadmium stress

Chapitre 3b.

C. Lapie¹, P. Leglize^{1*}, C. Paris^{2,3}, T. Buisson¹, T. Sterckeman¹

¹Université de Lorraine, Inra, Laboratoire Sols et Environnement, F-54000 Nancy, France

²Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, F-54000 Nancy, France

³Plateau d'Analyse Structurale et Métabolomique, SF4242, EFABA, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Environmental Science and Pollution Research

April 2019, 26:17520-17534, 10.1007/s11356-019-05168-0

1. Introduction

Cadmium is one of the most dangerous trace element for all kinds of living beings and is not necessary for any biological function, except for a marine diatom enzyme (Lane *et al.*, 2005; Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999). Concerning human health, Cd causes kidney failure and is associated with an increased risk of cancer. The major source of Cd exposure for the non-smoking population is dietary intake. Potatoes, bread and rolls, fine bakery wares, leafy vegetables or chocolate are some important sources of Cd (EFSA, 2012). Cadmium in food comes from cultivated soils where the metal exists at trace concentrations. These are mainly the consequence of inputs from human activities, and in particular from agricultural practice. In France, 74% of Cd input in soils is due to phosphate fertilizer (Sterckeman *et al.*, 2018). To reduce population exposure to Cd, it is important to better understand the mechanisms driving Cd uptake by plants.

Accumulation of Cd by plants strongly depends on its concentration and its speciation in soil solution (Lin *et al.*, 2016). Cd may be present in free or complexed forms in soil solutions and Cd uptake in plants is controlled by the concentration of Cd²⁺ (Wu and Zhang, 2002). Concentrations of other cations can alter Cd assimilation by competing for transmembrane carriers (Clarkson & Lüttge, 1989; Rivetta *et al.*, 1997; Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999). pH drives Cd uptake by improving Cd²⁺ desorption from the solid phase in case of acidification (Buekers *et al.*, 2007). Likewise, Cd²⁺ concentration is modulated by the presence of ligand-

like dissolved soil organic matter, which binds ionic Cd even if Cd affinity to those ligands is lower than other elements such as copper and lead (Ren *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2002). Thereby, the presence of these chelating molecules in soil solution results in a reduction in the Cd uptake (Lin *et al.*, 2014, 2016). Other ligands can be found, especially in rhizosphere in which plants emit a large range of molecules and could play an important role in the solubility or phyto-availability of trace metals.

These molecules, called rhizodeposits, can be classified in five groups according to Grayston *et al.*, 1997: (1) the water soluble root exudates comprising low molecular weight substances, lost passively by the roots according to a concentration gradient, without metabolic activity (amino acids, organic acids, sugars, phenolics and many secondary metabolites, phytosiderophores); (2) secretions comprising high molecular weight substances, depending on metabolic processes for their release, which can take place against the electrochemical potential gradient; (3) lysates released from autolyzed and sloughed off cells; (4) gases (ethylene, carbon dioxide, hydrogen cyanide); (5) mucilage, which is mainly composed of polysaccharides and polygalacturonic acids of high molecular weight.

Rhizodeposits can physically and chemically modify the rhizosphere characteristics and its quantitative and qualitative composition could vary from one species to another. They can be modified by many environmental factors like biotic or abiotic stress. The nutritional status of the plant can also affect the composition of its rhizodeposits. In case of phosphorus deficiency, amino acids and organic acids are emitted specifically in the rhizosphere by a rhizodeposition process to facilitate phosphorus intake by chelation mechanisms (Hinsinger, 2001; Shen *et al.*, 2002, 2005; Tang *et al.*, 2009). Also, iron deficiency induces phenol secretion, malate and other acids to facilitate Fe mobility and root absorption (Chen *et al.*, 2017; Vranova *et al.*, 2013). In the same way, the presence of pollutants, like Cd, could modify composition of rhizodeposits (Luo *et al.*, 2014). Indeed, the production of phytosiderophores secreted by roots, decreases when organic acids like acetic, oxalic, glutamic, citric and succinic acid increase in the presence of Cd (Chen *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011). Other stress markers like proline, peroxidase or superoxide dismutase in a rhizosphere are positively correlated to the presence of Cd (Fan *et al.*, 2001). Yet in general, little information is available on the impact of Cd on rhizodeposition. This information is necessary to describe the feed-back effect of Cd exposure on the speciation and root uptake of the metal itself.

Indeed, exuded organic acids such as citric, oxalic or malic acid can reduce trace metal uptake by chelation (Hinsinger, 2001; Jung *et al.*, 2003; Liao & Xie, 2004; Salt *et al.*, 1999; Schwab

et al., 2005). The complexation rate between organic acids and Cd is significant and can reach 85% for citrate in the rhizosphere soil solution of lupins (Römer *et al.*, 2000). A similar phenomenon was observed for Ni, with some amino acids like histidine (Rauser, 1999; Salt *et al.*, 1999). In addition, mucilage prevents metal uptake through chelation of the cations by the carboxylic groups of the uronic acids located on the polysaccharide chains (Allan & Jarrell, 1989; Mench *et al.*, 1987; Morel *et al.*, 1986). In contrast to the other metabolites previously cited, sugars show molecular properties, which prevent interactions with metals. However they attract microbial biomass by chemotactism, which can modify Cd bioavailability through various pH modifications, the formation of insoluble metal sulfides and the production of organic substances, proteins or extracellular polymers (Dong *et al.*, 2007; Francis, 1990). Rhizodeposits in general, such as nutritive substrates or signaling compounds, can modify the number and activities of rhizosphere microorganism communities (Benizri *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2007; Grayston *et al.*, 1997; Paterson, 2003).

In this study, we assessed qualitatively and quantitatively the impact of Cd on mucilage and root exudate composition, regarding the main molecule families, i.e. sugars, amino acids, organic acids, polysaccharides and proteins, in order to discuss their role in Cd availability and tolerance.

2. Materials and methods

2.1. Plant cultivation

The experiment was conducted in a growth chamber (photoperiod 16 h, 23/18°C day/night temperatures, relative humidity 70%, photosynthetic photon flux density (PPFD) 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Maize (*Zea mays L.*, MB862, INRA) was cultivated in sand (particle size of 0.4-0.8 mm, Sibelco, France) in polyvinyl chloride cylindrical pots (diameter 7.3 cm, height 30 cm, 1 725 g dry sand per pot). The sand was washed with 12% hydrochloric acid to remove any carbonates and contaminants, rinsed with deionized water, and then dried in an oven (70°C, 48 h, then 200°C, 2 h).

There were four Cd levels in the nutritive solution: 0, 10, 20, 40 μM Cd. When expressed as mg of Cd by kg of dry sand, these levels correspond to 0, 163, 326, 652 mg Cd (kg sand)⁻¹, respectively. For each Cd level, there were five replicates. The resulting 20 pots were placed randomly in the growth chamber. Nutrients were added with Cd contamination ($\text{CdNO}_3\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) in a single dose, at the very beginning of the cultivation in a 250 mL nutritive solution adapted from Hoagland and Arnon (1938), 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mM KH_2PO_4 , 2 mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

90 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 460 μM H_3BO_3 , 1 μM MoO_3 , 10 μM Fe-EDTA, pH 5.4-5.5. The Cd speciation was calculated with Visual MINTEQ (KTH, Sweden). In the nutrient solutions containing 10, 20 and 40 μM of Cd, about 85% of Cd was in Cd^{2+} form, which is the most phyto-available. The 250 mL volume of nutrient solution corresponded to 80 % of the water holding capacity and humidity was maintained at 80% with deionized water (18 M Ω) every two days. Maize seeds were sterilized (H_2SO_4 95% 30 sec, ethanol 95% 5 min, H_2O_2 10% 30 min) before planting and pre-germinated in petri dishes with growth medium (4 g.L⁻¹ Tryptic Soy Agar, 12 g.L⁻¹ agar/agar, Sigma Aldrich). After two days, only non-contaminated germinated seeds were planted in our systems. After three weeks, foliar symptoms indicating iron deficiency appeared (randomly, whatever the treatment), so a 10 mL solution of 100 μM Fe-EDTA was added to each pot.

2.2. Photosynthesis and respiration measurement

The photosynthesis and respiration rates were measured after six weeks with the gas exchange open system Li-Cor 6400 xt (Li-Cor, USA) on 8th leaf. Each leaf was placed inside the Li-Cor chamber, in the following conditions of air temperature, CO₂ concentration and PPFD: 23 °C, 400 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.3. Collection of rhizodeposits

After six weeks of cultivation, the plants were harvested, and two rhizodeposit solutions were collected. The first resulted from the sand extraction. Sand adhering to roots is known as rhizospheric sand (Pinton *et al.*, 2007). In this area, water released by roots during the night induces a swelling of the mucilage, which then dries and adheres to the surrounding sand particles during transpiration (McCully, 1995). Then, mucilage was collected by washing the root system with a phosphate-buffered saline (150 mL PBS, 8 g.L⁻¹ NaCl, 1.44 g.L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.24 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 0.11 g.L⁻¹ KCl). PBS is commonly used for washing procedures because of its isotonicity with cells and its capacity to avoid protein denaturation (Borg *et al.*, 2019; Šamaj *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1999; Vaughn & Campbell, 1988; Willats *et al.*, 2001). It prevents or at least reduces the release of root exudates, contrarily to water of other non-isotonic solutes and permits mainly mucilage to be collected. The sand in the buffer solution was agitated for two hours in an overhead shaker (Reax 20, Heidolph, 15 RPM) and then removed by filtration on Whatman paper. The resulting solution is referred to as rhizospheric sand extract.

The second rhizodeposit solution was collected according to Luo *et al.*, 2014. After sand removal, roots were washed with deionized water and plunged into 150 mL of deionized water for 6 hours, to collect the root exudates. This second solution is called diffusate solution.

Both rhizodeposit solutions were kept at -20 °C. A 50 mL volume of each rhizodeposit solution was freeze-dried until all the water is completely sublimated (alpha 1-4 LDplus, Martin Christ, Germany). The freeze-dried residue obtained was resuspended in 4 mL of deionized water and the concentrated solution was filtered with 0.45 µm filters (Syringe filters, Acrodisc) to remove any dead cells and root parts before chemical analyses. The concentrated solution was used for protein, carbohydrates and amino acids analysis. For GCMS analysis, 50 mL of non-concentrated rhizodeposit solution were freeze-dried and re-suspended with 4 mL of acetonitrile (ACN, HPLC-S Gradient Grade) and filtered with 0.45 µm filters.

Two different solvents were used, either water or ACN, because organic acids are more soluble in organic solvents like ACN while sugars, amino acids and most proteins are preferably dissolved in water. In order to maximize solubilisation and homogenization, concentrated solutions were submitted to ultrasound for 45 minutes (Bransonic ultrasonic bath, Branson 5210, USA). Even after those steps, there is a possibility that some compounds could remain insoluble and were lost with filtration.

2.4. Plant morphological measurements

After both solutions had been collected, foliar symptoms were noted and root and shoot length were measured. Leaves, stems and roots were separated and weighed. Leaves were scanned using a portable leaf area meter and the transparent conveyor belt accessory (LICOR LI-3000C and LI-3050C, USA). The roots were scanned and the images obtained were analysed using WinRhizo® software (WhinRhizo, 2005, Regent Instruments Inc., Canada) in order to determine the root surface area of each plant. The fresh material was stored at - 20 °C until being manually cryogenically ground, using a pestle and mortar together with liquid nitrogen.

2.5. Plant biochemical measurements

Hydro-alcoholic extractions were performed in order to extract carbohydrates and amino acids from plant matter, according to Harrison et al. (2003). 100 mg of fresh material was added to 1 mL ethanol 80% (v:v) and agitated (17 RPM, 1 hour, 4 °C). The extract was centrifuged (10 min, 14 000 g) and the supernatant was sampled and kept to one side. The pellet was submitted to a second and a third extraction similar to the first one with 60% ethanol and then with water. The three supernatants were merged to constitute a solution designated as hydro-alcoholic extract.

The anthrone-sulfuric acid assay described by Leyva et al. (2008) was used to quantify the carbohydrate content in the hydro-alcoholic root extract. The anthrone reagent was prepared immediately prior to analysis by dissolving anthrone (0.1%, w:v) in a concentrated sulfuric acid

(96%) solution. Standard solutions were prepared by diluting glucose (1.0 g.L^{-1} in demineralized water). $150 \mu\text{L}$ of anthrone reagent and $50 \mu\text{L}$ of the standard or sample were added to each well of a microplate. The later was kept at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min, then incubated at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min. Microplates were then cooled at room temperature and the absorbance was read at 620 nm with a microplate spectrophotometer (Synergy HT, Biotek Instruments, USA).

Total soluble amino acids were determined with ninhydrine according to Rosen (1957) and glutamine was used as a standard. $100 \mu\text{L}$ of the standard or sample (hydro-alcoholic extract or rhizodeposit solution) was added to the deep well microplate. Then, $50 \mu\text{L}$ of KCN (10 mM, in 2.6 M acetate buffer, pH 5.2) and $50 \mu\text{L}$ of ninhydrine solution (3% w:v in ethyl glycol monomethyl ether) were added before incubating the microplate at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min. At the end of the incubation, the reaction was stopped by adding $500 \mu\text{L}$ of an isopropanol/water mix (50:50, v:v) and the absorbance was read at 570 nm with a microplate spectrophotometer.

Plant proteins were extracted from 100 mg of plant fresh material, using $400 \mu\text{L}$ of extraction buffer (100 mM tricine, 40 mM CaCl_2 , 0.5% (w:v) polyvinylpyrrolidone, 0.5 % (v:v) triton 100 X, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl, pH 8). The suspension was agitated for 3 min. The supernatant was collected after centrifugation ($15\ 000 \text{ g}$, 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) to constitute the soluble protein extract. Proteins were determined following the Bio-Rad Protein Assay instructions according to Bradford, 1976. The standard was bovine serum albumin (1.37 mg/mL , Bio-rad). $10 \mu\text{L}$ of each standard or protein extract from plants and $200 \mu\text{L}$ of five times diluted dye reagent was mixed into each well. The absorbance was read at 595 nm after 5 min of incubation at room temperature.

2.6. Analyses of rhizodeposits

Total carbon in non-concentrated rhizodeposit solutions was measured using a total organic carbon analyzer TOC-VSCN (Shimadzu, Japan). Rhizodeposit solutions were previously filtered with $0.45 \mu\text{m}$ syringe-filters (Acrodisc). A TOC standard solution (TOC Standard, SCP Science, France) was used both as standard and control sample.

Total carbohydrate, amino acid and protein contents of concentrated rhizodeposit solutions were measured using the same protocol as for plant material: (1) carbohydrate content was quantified using the anthrone-sulfuric acid assay used for plant extract ((Leyva *et al.*, 2008)); (2) total soluble amino acids and ammonium were determined according to Rosen (1957); (3) protein content was determined following the Bio-Rad Protein Assay protocol for microplate according to (Bradford, 1976).

Molecular analyses were performed on concentrated solutions. Mono and di-saccharides were quantified following the protocol described by Ricochon et al. (2011). Compounds of interest were quantitatively analysed on a LC-MS system (Thermo Scientific, USA) including a binary solvent delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ mass spectrometer equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in atmospheric pressure chemical ionization negative mode (APCI⁻). Chromatographic analysis was performed on a Polyamine II HILIC column (250 × 4.6 mm, 5 μm, YMC, Germany) fitted with a guard column (7.5 × 4.6 mm, 5 μm, YMC, Germany). Mobile phases consisted in a mix of ultrapure water (phase A) and 1% of chloroform in acetonitrile (phase B). 20 μL of extracts were injected into the system and sugars were separated at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ through the isocratic mode (A/B: 25/75). Sugars were analysed in SIM mode, thanks to chlorinated adducts [M+35]⁻ and [M+37]⁻ which correspond to stable chlorine isotopes. The m/z windows used for the specific screening were set as follows: 167-188 m/z for xylose; 198-202 m/z for rhamnose; 214-232 m/z for fructose, glucose, mannose and mannitol; 376-382 m/z for sucrose and cellobiose. Mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage was set at 6 kV; source gases were set (in arbitrary units min⁻¹) for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 40, 10 and 10, respectively; capillary temperature was set at 225 °C; capillary voltage was set at -10 V; tube lens, split lens and front lens voltages at -47 V, 78 V and 5.25 V, respectively. Ion optics parameters were optimized in APCI⁻ mode by automatic tuning using a standard solution of glucose at 0.1 g.L⁻¹ infused in mobile phase (A/B: 25/75) at a flow rate of 5 μL.min⁻¹. Furthermore, in order to determine polysaccharide content of the rhizospheric sand extracts, a volume of 1 mL of concentrated rhizodeposit was hydrolysed in acidic conditions according to a protocol adapted from Happi Emaga et al. 2012 (15 min, 105 °C, 7.7% HCl, 45 min temperature ramp) before LC-MS analysis. The external calibration curves of sugars were plotted from 0.001 to 0.1 mg.L⁻¹ for diffusate solutions and from 0.001 to 0.5 mg.L⁻¹ for rhizospheric sand extracts.

Native amino acids were quantitatively analysed using the same LC-MS system, but operating in electrospray positive mode (ESI⁺). A porous graphitic column (Hypercarb, 100 × 2.1 mm, 5 μm, Thermo Hypersil-Keystone) fitted with a guard column (7.5 mm × 4.6 mm cartridge, YMC, Germany) was used to separate 19 amino acids according to the protocol described by Chaimbault et al. (2000): glycine, serine, alanine, threonine, asparagine, cysteine, aspartic acid, proline, histidine, arginine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, glutamine, glutamic acid, valine, lysine, methionine and leucine/isoleucine isomers (impossible to differentiate due to the same retention time and the same MS² fragmentation pattern). Mobile phases consisted in a mix

of water modified with nonafluoropentanoïc acid (20 mM) (Phase A) and pure acetonitrile (HPLC-S Gradient Grade) (Phase B). Separation of compounds of interest was achieved with a first linear gradient from 0% to 70% of B for 50 min and then a second linear gradient from 70% to 100% of B for 6 min. The flow rate was set at 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and the injection volume was set at 16 μL . The retention times of amino acids in complex mixtures were first validated thanks to MS2 screening and then the quantitative analyses were routinely performed in MS full scan mode (from 70 to 300 m/z), thereby allowing the screening of parent ions corresponding to mono-protonated form $[\text{M}+\text{H}]^+$. Mass spectrometric conditions were as followed: spray voltage was set at 4.5 kV; source gases were set (in arbitrary units min^{-1}) for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 20, 5 and 5, respectively; capillary temperature was set at 250 $^{\circ}\text{C}$; capillary voltage at -16 V; tube lens, split lens and front lens voltages at 50 V, -60 V and -5.75 V, respectively. Ion optics parameters were optimized in ESI⁺ mode by automatic tuning using a standard solution of norleucine at 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ infused in mobile phase (A/B: 50/50) at a flow rate of 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. External calibration curves were plotted from 0.0003 to 0.03 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for both rhizodeposit solutions.

An additional semi-quantitative analysis of rhizodeposit was performed using GC-MS system following a protocol adapted from Luo et al. (2014). A 1 mL volume of the concentrated solution in ACN was added to a GC-MS-compatible-vial and blown to dryness under a nitrogen flow; the dry residue was suspended in 1 mL of n-hexane ($\geq 95\%$). Samples were derivatized with 40 μL of methoxyamine hydrochloride (20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in pyridine 99+%, 2 h, 37 $^{\circ}\text{C}$) and 70 μL N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA, 30 min, 37 $^{\circ}\text{C}$). The GC-MS system consisted of gas chromatography (7890A, Agilent Technologies, USA) coupled with a mass spectrometer (5975C, Agilent Technologies, USA) equipped with an electron ionization source (EI) and a Gerstel MPS autosampler. A DB-5MS capillary column (25 m \times 0.25 mm \times 0.251 μm) from Agilent J&W (Agilent Technologies, USA) was used. The injection was performed in splitless mode with 1 μL of samples at 230 $^{\circ}\text{C}$. The carrier gas (helium) flow rate was 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The column temperature was held for 2 min at 50 $^{\circ}\text{C}$, 13 min ramp to 180 $^{\circ}\text{C}$ and held for 5 min, 14 min ramp to 250 $^{\circ}\text{C}$ and 10 min at 250 $^{\circ}\text{C}$. Interface and ion-source temperatures were respectively adjusted to 250 and 220 $^{\circ}\text{C}$. Mass spectra were recorded at 2.66 scans. $\cdot\text{s}^{-1}$ with a m/z 50–600 scanning range.

2.7. Data processing

Raw GCMS signals were processed on MassHunter Workstation software (Qualitative Analysis, v. B.06.00, Agilent Technologies) after chromatogram deconvolution. Spectra were

compared with two search unit mass libraries: (NIST 14, NIST Mass Spectral Library and Wiley 275, Wiley Online Library). Compounds were identified when similarities were greater than 70% and compounds from the blank (derivatized hexane) were subtracted from other samples. Then, chromatograms were integrated using MassHunter Workstation software (Quantitative Analysis, v. B.07.00, Agilent Technologies). LCMS signals were processed using XCALIBUR software program (v. 2.1). All biochemical or compound contents were expressed per gram of dry root.

For all analyses, data were tested for the normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett test) for $p < 0.05$. In case of normality and homoscedasticity, a one-way ANOVA and the Tukey's HSD (Honestly Significant Difference) test were used to compare means (Test 1). Alternatively, the Kruskal-Wallis' method followed by the Fisher's LSD (Least Significant Difference) test was used (Test 2). Data were analysed using R Studio (v. 3.4.4).

3. Results and discussion

3.1. Impact of Cd on maize growth, morphology and biochemistry

The maize plants did not show any visible toxic foliar symptoms except those exposed to the highest Cd level, which had signs of necrosis at the leaf tips. Plant biomass decreased in leaves and stem (Table 1) as Cd exposure increased. Although non-significant, the reduction was greater in the stem (-52%) than in the leaves (-35%) while root biomass is constant. This trend was confirmed by the root to shoot ratio, which increased significantly with Cd content from 0.39 for the control to 0.63 for the 40 μM treatment. This rise indicated that under abiotic stress like Cd exposure, maize preferably allocated biomass to the roots rather than to the shoots (Dupuy *et al.*, 2016; Perriguet *et al.*, 2008; Rellán-Álvarez *et al.*, 2006b). Leaf area as well as root surface tended to decrease with increasing Cd exposure. Leaf area gradually decreased by 12%, 28% and 39% respectively for 10, 20 and 40 μM Cd exposures when compared to the control. The root surface was lower in the Cd-exposed plants than in the control plants, but no significant difference could be observed between the various Cd concentrations.

The non-significance of these results might be due to wide genetic heterogeneity between plants. According to Poorter *et al.* (2012), with such a variability, it would be necessary to cultivate more than 10 replicates to statistically confirm any differences between two modalities, which is rarely done. On the other hand, the non-significance of the maize response to Cd exposure could reveal the capacity of this species to tolerate Cd, even at relatively high concentrations. Indeed, in agricultural soils, maize is only exposed to nanomolar concentrations

of Cd (Cornu *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2016), while in our experiment it was exposed to micromolar concentrations and even here, foliar symptoms, indicating Cd toxicity, appeared only on the highest Cd content (40 μM Cd). Our results are in line with those of Perriguet *et al.* (2008), who observed no consistent modification to the growth variables of hydroponically cultivated maize (for 12 or 24 days) exposed to up to 10 μM Cd. In their experiment, the decrease in root and shoot appeared at the next exposure level of 100 μM .

Table 1. Maize plant characteristics (mean values \pm standard deviation) according to the different level of Cd exposure. R/S: root to shoot biomass ratio. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different ($n = 5$, $p = 0.05$).

Cd level (μM)	Organ	Test	0	10	20	40
Biomass DW (g)	Leaf	1	1.52 \pm 0.59 a	1.20 \pm 0.28 a	0.85 \pm 0.50 a	0.98 \pm 0.54 a
	Root	2	1.03 \pm 0.52 a	0.77 \pm 0.25 a	1.03 \pm 1.03 a	0.81 \pm 0.33 a
	Stem	1	0.99 \pm 0.52 a	0.58 \pm 0.23 a	0.38 \pm 0.28 a	0.48 \pm 0.31 a
R/S ratio		2	0.39 \pm 0.12 a	0.47 \pm 0.23 ab	0.73 \pm 0.40 b	0.63 \pm 0.19 b
Surface area (cm²)	Leaf	1	605 \pm 159 a	532 \pm 74 a	433 \pm 196 a	367 \pm 167 a
	Root	1	798 \pm 2114 a	673 \pm 64 a	554 \pm 311 a	667 \pm 282 a
Photosynthetic activity ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	8 th leaf	2	7.17 \pm 1.31 a	5.65 \pm 2.88 a	3.31 \pm 2.27 a	3.69 \pm 1.96 a
Amino acids (mg.g⁻¹ DW)	Root	1	25 \pm 7 a	32 \pm 14 a	44 \pm 19 a	43 \pm 22 a
Proteins (mg.g⁻¹ DW)		1	34 \pm 5 a	37 \pm 7 a	17 \pm 2 b	17 \pm 3 b
Sugars (mg.g⁻¹ DW)		1	125 \pm 63 a	136 \pm 29 a	88 \pm 52 a	89 \pm 39 a

Photosynthesis did seem to be impacted by Cd. Indeed, photosynthesis activity in plants submitted to the highest Cd concentration was only 50% of that of the control, and this decline was visible from the 10 μM Cd treatment, even if it was not significant. Inhibition of photosynthesis in the case of Cd presence is classic, as Cd can be a substitute to magnesium in RuBisCo and chlorophyll pigments, rendering them non-functional while they are essential to photosynthesis (Küpper *et al.*, 2007). Even for the biochemical measurements (Table 1), plant functioning was impacted as of 20 μM of Cd. Total sugar tended to decrease with Cd exposure. The same tendency was observed by Moya *et al.* (1993) in rice roots submitted to 10 and 100 μM of Cd, namely soluble sugar did not seem impacted while starch decreased significantly

with increasing Cd exposure. Our procedure includes both mono and poly-saccharide analysis. Concerning protein content, its reduction was significant from 34 to 17 mg per gram of dry root respectively in control and at 40 μM Cd exposure. However, our results shown in Table 1 conflict with those of previous studies which for their part, showed an increase in plant proteins content in the presence of Cd or abiotic stress related to the production of Heat Shock proteins and metallothioneins (Bauman *et al.*, 1993; Leita *et al.*, 1991; Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999), which are well-known to be involved in trace metal tolerance and the chelation mechanism (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Hall, 2002). This contradictory trend could be explained by the fact that we analyzed total proteins where previous works focused on heat shock proteins. In contrast to proteins, amino acid content did tend to be positively impacted by the presence of Cd, even if the results were not significant. The increase in amino acid content in roots has already been described by Costa and Spitz (1997) in white lupin with Cd concentrations below 100 μM .

3.2. Impact of Cd exposure on the composition of rhizodeposit solutions

The two rhizodeposit solutions had very different biochemical compositions. In the diffusate solution, there was an large amount of sugar, while the rhizospheric sand extract was essentially composed of sugar and amino acids (Table 2). In both solutions, total carbon content (per g of dry root) decreased as Cd exposure increased, down to 50% for the highest Cd concentration compared to the control, although the difference was not statistically significant. This trend was visible from the first Cd exposure level, respectively -24% and -18% for the diffusate solution and the rhizospheric sand extract. The same trend was observed for the sugar content. The decrease was significant for the diffusate solution, with a drop of 73% for the 40 μM Cd compared to the control. This decline in sugar and carbon content can be explained by a decrease in photosynthetic activity and a decrease in sugar in the roots. Indeed, above 17% of net carbon fixed by photosynthesis is lost by the roots through the rhizodeposition mechanism (Nguyen, 2003). Therefore, it is likely that the quantity of rhizo-deposited carbon is dependent on photosynthesis. Concerning amino acids, their content decreased at the two highest Cd exposure levels (20 and 40 μM), in both the diffusate solution and the rhizospheric sand extract, even if this was not significant in the diffusate solution. Total protein content in rhizospheric sand extract decreased significantly when plants were exposed to low Cd content before returning at the level of the control, for the highest Cd content. In contrast, protein content in diffusate solution stay fixed. The constancy in protein emission while all other compounds tend

to decrease suggests that proteins could be involved in active rhizospheric mechanisms of maize tolerance to Cd exposure.

Table 2. Total carbon, sugar, amino acid and protein content in the two rhizodeposit solutions of maize according to the Cd exposure level (mean \pm standard deviation). Expressed in mg of metabolite per g of dry root. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different ($n = 5$, $p = 0.05$).

Sample nature		Diffusate solution (per hour)					Rhizospheric sand extract				
Cd level	μM	Test	0	10	20	40	Test	0	10	20	40
Total carbon	mg. g ⁻¹	2	2.0 \pm 1.2 a	1.5 \pm 0.6 a	0.9 \pm 0.4 a	0.9 \pm 0.3 a	1	6.3 \pm 3.4 a	5.2 \pm 2.2 a	5.1 \pm 2.6 a	3.2 \pm 0.6 a
Sugar	mg. g ⁻¹	1	2.2 \pm 1.5 a	2.0 \pm 1.7 a	0.2 \pm 0.2 b	0.6 \pm 0.2 b	1	5.1 \pm 1.3 a	4.7 \pm 2.5 a	3.6 \pm 2.2 a	3.4 \pm 1.2 a
Amino acid	mg. g ⁻¹	2	0.11 \pm 0.12 a	0.06 \pm 0.05 a	0.03 \pm 0.03 a	0.04 \pm 0.03 a	1	1.0 \pm 0.7 a	1.0 \pm 0.4 ab	0.3 \pm 0.2 c	0.5 \pm 0.2 bc
Protein	mg. g ⁻¹	2	0.033 \pm 0.015 a	0.043 \pm 0.023 a	0.041 \pm 0.024 a	0.038 \pm 0.015 a	1	0.12 \pm 0.01 a	0.09 \pm 0.02 b	0.05 \pm 0.01 c	0.11 \pm 0.04 ab

3.3. Impact of Cd on the composition of diffusate solutions

The most abundant sugar in diffusate solutions was glucose, representing half of total sugar, followed by fructose, which contributed to more than 30% of these carbohydrates (Table 3). Mannose and cellobiose represented respectively 2.5% and 1%, while xylose, rhamnose, mannitol and sucrose represented less than 1% of the sugars. Cadmium had a negative impact on sugar concentrations, significantly and negatively affecting the concentration of glucose, fructose and mannose. The glucose content was six times lower for the highest Cd concentration compared to the control. Fructose content also decreased, from 682 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for the control to 145 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for the 40 μM Cd level. Mannose exudation decreased by almost 30% in the highest Cd concentration compared to the control. The other sugars showed the same trend, although the difference between Cd exposure levels was not statistically significant. For the two highest concentrations of Cd, sucrose was below the limit of detection (LD). In general, for the sugars measured, the 10 μM of Cd level did not seem to have any effect either on mono or di-saccharide concentrations compared to the control. On the other hand, the plants exposed to 20 and 40 μM of Cd level released less sugar into the diffusate solution. This drop was statistically different for glucose, sucrose, mannose and fructose. A decrease in monosaccharides like fructose, glucose or mannitol in root exudates has previously been described by Luo et al. (2014) even at low Cd exposure levels (5 μM of Cd).

With the GC-MS procedure, 14 different molecules were found in the diffusate solution in concentrations above the limit of quantification (LQ). Most of these were organic acids: glyceric, cinnamic, lactic, propionic, citric and aconitic acid. There were also two monoglycerides (monostearin and monopalmitin), two fatty acids (stearic acid and hexadecanoic acid), two sugar alcohols (xylitol and threitol), a catecholamine (dopamine) and a coumarin (murrangatin isovalerate). Concentrations of most organic acids tended to increase with Cd exposure compared to the control and especially for the highest Cd level. The content of citric and aconitic acid increased significantly in the diffusate solution for plants exposed to Cd compared to the non-exposed ones. An increase in organic acid emission in the case of heavy metals presence has frequently been described in previous studies. However, the nature of the principal acids is dependent on plant species. Sorghum enhanced malate exudation in presence of Cd, while maize mainly increased citrate (Pinto *et al.*, 2008). Wild tomatoes submitted to Cd stress induce oxalate secretion, helping to exclude Cd from entering roots (Zhu *et al.*, 2011).

Fatty acids and monoglyceride concentrations also increased with Cd exposure, although the 10 μM Cd level had no effect on their concentration. Stearic acid significantly increased in the two highest Cd exposures in comparison with the control. The same trend was noticed for the two sugar alcohols and the dopamine: no effect was observed for the 10 μM of Cd level but an increase for the two highest Cd concentrations, significant for xylitol was noted. Concerning the coumarin-type molecules, there was no effect of Cd on the murrangatin isovalerate content. There were 16 amino acids above the LQ in the diffusate solution and the three most represented were alanine, threonine and valine (around 3 to 4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), whereas all other amino acids were present at levels below 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Asparagine, cysteine and glutamine were present, but below the LQ. Almost all amino acids tended to decrease with increasing Cd exposure, except methionine and glutamine. For all other 16 amino acids, the drop was gradual and visible from the lowest Cd level (10 μM Cd), but was not statistically significant except for aspartic acid, which was 69% lower for the 40 μM Cd level compared to the control. The literature shows that amino acid emission in the case of Cd stress varies according to the species and even to the genotype. For example, Fu *et al.* (2018) showed that the contents of four amino acids secreted by the rice line Lu527-8 increased significantly with Cd exposure, while the same change failed to appear in another line, Lu527-4.

Table 3. Metabolite profiling (mean values \pm standard deviation, related to root dry weight) in diffusate solution of maize according to the Cd exposure level. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different ($n = 5, p = 0.05$)

Molecule		Test	Cd exposure				
			0 μM	10 μM	20 μM	40 μM	
Monosaccharides	fructose	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	2	682 \pm 240 ab	822 \pm 344 a	486 \pm 715 bc	145 \pm 150 c
	glucose		1	1039 \pm 342 ab	1190 \pm 805 a	444 \pm 561 ab	169 \pm 189 b
	mannitol		2	6.0 \pm 3.8 a	7.8 \pm 8.2 a	6.3 \pm 10.7 a	2.4 \pm 2.6 a
	mannose		2	56 \pm 12 a	77 \pm 48 a	46 \pm 67 ab	16 \pm 12 b
	rhamnose		2	3.0 \pm 2.9 a	2.3 \pm 1.4 a	2.8 \pm 2.7 a	0.9 \pm 0.5 a
	xylose		2	7.9 \pm 4.8 a	6.9 \pm 3.8 a	3.4 \pm 3.1 a	4.6 \pm 3.9 a
Disaccharides	sucrose	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	2	4.5 \pm 4.4 a	4.1 \pm 2.9 a	0.0 \pm 0.0 b	0.4 \pm 0.9 b
	cellobiose		2	23.2 \pm 26.5 a	17.0 \pm 23.4 a	0.0 \pm 0.0 a	2.6 \pm 5.7 a
Monoglycerides	1-Monopalmitin	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	2	1.64E+05 \pm 6.77E+04 a	1.62E+05 \pm 6.27E+04 a	2.96E+05 \pm 2.26E+05 a	2.30E+05 \pm 7.76E+04 a
	Monostearin		2	1.05E+05 \pm 4.49E+04 a	1.01E+05 \pm 4.47E+04 a	1.82E+05 \pm 1.63E+05 a	1.80E+05 \pm 1.06E+05 a
Fatty acids	Stearic acid	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	2	6.57E+04 \pm 3.05E+04 a	1.11E+05 \pm 6.86E+04 ab	2.86E+05 \pm 3.46E+05 b	2.29E+05 \pm 1.59E+05 b
	Hexadecanoic acid		2	1.13E+05 \pm 8.32E+04 a	1.31E+05 \pm 1.19E+05 a	2.89E+05 \pm 3.35E+05 a	2.36E+05 \pm 1.53E+05 a
Sugar alcohols	xylitol	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	2	1.82E+03 \pm 1.13E+03 a	3.41E+03 \pm 2.20E+03 ab	1.72E+04 \pm 1.31E+04 b	6.38E+03 \pm 4.40E+03 bc
	D-Threitol		2	4.09E+03 \pm 3.29E+03 a	4.35E+03 \pm 3.01E+03 a	1.01E+04 \pm 1.03E+04 a	9.48E+03 \pm 1.69E+04 a
Coumarin	murrangatin isovalerate	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	2	1.02E+05 \pm 1.11E+05 a	1.40E+04 \pm 1.98E+03 a	1.04E+05 \pm 1.33E+05 a	9.88E+04 \pm 2.01E+05 a
Catecholamine	Dopamine		2	7.21E+02 \pm 5.94E+02 a	6.23E+02 \pm 4.09E+02 a	1.37E+03 \pm 1.48E+03 a	1.61E+03 \pm 1.33E+03 a
Organic acids	Glyceric acid	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	1	5.47E+02 \pm 1.51E+02 a	5.85E+02 \pm 3.43E+02 a	6.92E+02 \pm 5.33E+02 a	1.08E+03 \pm 4.98E+02 a
	p-Cinnamic acid		2	1.96E+03 \pm 1.28E+03 b	2.85E+02 \pm 1.48E+02 a	7.72E+03 \pm 4.20E+03 c	1.26E+02 \pm 1.60E+01 a
	Lactic acid		1	2.37E+04 \pm 1.79E+04 a	1.95E+04 \pm 1.83E+04 a	3.01E+04 \pm 2.49E+04 a	5.24E+04 \pm 5.29E+04 a
	Propionic acid		1	3.24E+04 \pm 2.46E+04 a	2.66E+04 \pm 2.50E+04 a	4.18E+04 \pm 3.49E+04 a	7.20E+04 \pm 7.32E+04 a
	Citric acid		2	2.35E+01 \pm 1.10E+01 a	2.78E+01 \pm 1.14E+01 a	2.42E+02 \pm 2.81E+02 b	7.61E+01 \pm 5.83E+01 b
	Aconitic acid		2	1.82E+01 \pm 8.76E+00 a	1.16E+04 \pm 1.29E+04 b	2.85E+02 \pm 2.37E+02 b	2.31E+02 \pm 2.81E+02 b
Amino acids	Alanine	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	2	2.83 \pm 3.60 a	3.14 \pm 2.54 a	2.30 \pm 3.80 a	2.00 \pm 2.34 a
	Arginine		2	0.70 \pm 0.88 a	0.51 \pm 0.58 a	0.44 \pm 0.52 a	0.18 \pm 0.13 a
	Asparagine		/	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Aspartic acid		2	0.77 \pm 0.81 ab	0.58 \pm 0.32 a	0.20 \pm 0.13 b	0.24 \pm 0.19 ab
	Cysteine		/	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Glutamic acid		2	0.52 \pm 0.5 a	0.56 \pm 0.46 a	0.66 \pm 0.53 a	0.67 \pm 0.80 a

Molecule		Test	Cd exposure			
			0 μM	10 μM	20 μM	40 μM
	Glutamine	/	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Glycine	1	1.44 \pm 1.47 a	1.80 \pm 1.29 a	0.66 \pm 0.75 a	0.72 \pm 0.32 a
	Histidine	1	1.01 \pm 0.92 a	0.64 \pm 0.39 a	0.37 \pm 0.37 a	0.43 \pm 0.44 a
	Leucine + Isoleucine	1	1.54 \pm 1.53 a	1.29 \pm 0.83 a	0.66 \pm 0.81 a	0.68 \pm 0.71 a
	Lysine	1	2.66 \pm 2.67 a	1.65 \pm 1.26 a	0.91 \pm 1.34 a	0.93 \pm 1.05 a
	Methionine	2	0.16 \pm 0.19 a	0.12 \pm 0.08 a	0.12 \pm 0.18 a	0.15 \pm 0.20 a
	Phenylalanine	2	0.89 \pm 1.17 a	0.48 \pm 0.35 a	0.43 \pm 0.62 a	0.44 \pm 0.57 a
	Proline	2	0.15 \pm 0.10 a	0.09 \pm 0.06 a	0.10 \pm 0.20 a	0.03 \pm 0.05 a
	Serine	2	1.52 \pm 1.80 a	0.95 \pm 0.72 a	0.71 \pm 0.86 a	0.65 \pm 0.74 a
	Threonine	1	4.71 \pm 5.73 a	5.06 \pm 3.51 a	2.02 \pm 2.71 a	2.73 \pm 1.83 a
	Tryptophan	2	0.26 \pm 0.32 a	0.15 \pm 0.11 a	0.08 \pm 0.12 a	0.11 \pm 0.13 a
	Tyrosine	2	1.13 \pm 1.53 a	0.64 \pm 0.49 a	0.41 \pm 0.55 a	0.46 \pm 0.58 a
	Valine	2	3.36 \pm 3.97 a	2.81 \pm 1.88 a	1.01 \pm 1.38 a	1.13 \pm 1.05 a

3.4. Impact of Cd on the composition of rhizospheric sand extracts

In the rhizospheric sand extracts, mono and di-saccharides were below the LD (Table 4). However, once the solution was hydrolyzed, glucose was found in large quantities, from 11 to 23 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, meaning that this solution contained polysaccharides. Glucose concentration tended to decrease with increasing Cd exposure.

With the GC-MS procedure, nine different molecules were found in the rhizospheric sand extracts. Two of them belonged to the monoglyceride family (monopalmitin and monostearin), two were fatty acids (palmitic acid and stearic acid), two molecules were derived from oleic acid (oleanitrile and oleamide). Glycerol, a polyol, was found, as well as glucosamine, which is an amino sugar and the diphenyl sulfone, an organo-sulfur compound. No statistical differences were observed between Cd exposure levels. However, the molecule contents tended to increase, except for stearic and palmitic acids and glycerol. For the other molecules, the lowest Cd exposure level seemed to have no effect on their secretion by the roots, whereas the 20 and 40 μM Cd levels did.

In the rhizospheric sand extracts, 13 amino acids were found above the quantification limit. Asparagine, cysteine and glutamine were below this limit, as well as glycine, serine and alanine which are the three smallest amino acids and are easily degradable by microorganisms. As for

the diffusate solution, increasing Cd exposure led to a decrease in the amino acid concentrations. All other amino acids followed the same trend with Cd exposure level. The three most represented amino acids were arginine, phenylalanine and tyrosine, which reached an average of 2.5 to 3.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, when all other amino acids were below 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. The control and the first exposure level contained more amino acids than the last two. Threonine, proline, aspartic acid and phenylalanine of the 20 and 40 μM Cd levels were under the quantification limit. In contrast to root exudates, very few studies have focused on mucilage and its composition in the presence of heavy metals, which explains why our analysis cannot be compared with any previous works.

Table 4 : Metabolite profiling (mean values ± standard deviation, related to root dry weight) in rhizospheric sand extracts of maize according to the Cd exposure level. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different (n = 5, p = 0.05).

Molecules			Test	Cd in nutrient solution				
				0 µM Cd	10 µM Cd	20 µM Cd	40 µM Cd	
Hydrolysed polysaccharide	Glucose	µg.g ⁻¹ ₁	1	23.00 ± 12.67 a	22.76 ± 9.04 a	11.02 ± 6.04 a	18.77 ± 3.71 a	
Monoglycerides	Monostearin	Pic area	2	9.4E+04 ± 5.8E+04 a	9.5E+04 ± 6.3E+04 a	2.1E+05 ± 2.4E+05 a	1.7E+05 ± 9.0E+04 a	
	Monopalmitin		2	2.3E+02 ± 1.2E+02 a	1.6E+02 ± 1.0E+02 a	3.4E+02 ± 3.2E+02 a	3.1E+02 ± 1.7E+02 a	
Fatty acids	Palmitic acid		2	2.6E+04 ± 1.3E+04 a	1.4E+04 ± 6.0E+03 a	6.7E+04 ± 8.2E+04 a	2.0E+04 ± 1.2E+04 a	
	Stearic acid		2	2.6E+04 ± 1.9E+04 a	1.0E+04 ± 6.4E+03 a	4.4E+04 ± 6.1E+04 a	1.6E+04 ± 1.3E+04 a	
Derived fatty acids	Oleanitrile		2	1.2E+04 ± 6.1E+03 a	8.5E+03 ± 5.2E+03 a	2.1E+04 ± 2.1E+04 a	1.8E+04 ± 9.4E+03 a	
	Oleamide		1	1.4E+04 ± 7.1E+03 a	1.1E+04 ± 5.2E+03 a	1.9E+04 ± 2.2E+04 a	2.0E+04 ± 1.5E+04 a	
Polyol	Glycerol		1	3.5E+04 ± 1.8E+04 a	1.0E+04 ± 1.0E+04 a	3.9E+04 ± 3.1E+04 a	1.2E+04 ± 1.6E+04 a	
Sulfur compound	Diphenyl sulfone		2	2.9E+04 ± 3.6E+04 a	1.4E+04 ± 8.5E+03 a	3.4E+04 ± 4.7E+04 a	4.6E+04 ± 6.5E+04 a	
Amino sugar	D-(+)-Glucosamine		1	1.3E+04 ± 1.1E+04 a	1.3E+04 ± 9.1E+03 a	1.0E+04 ± 5.9E+03 a	3.7E+04 ± 2.6E+04 a	
Amino acids	Glycine		µg.g ⁻¹	/	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Serine			/	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Alanine			/	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Threonine			2	0.10 ± 0.17 a	0.28 ± 0.33 a	< LQ b	< LQ b
	Asparagine			/	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Cysteine	/		< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	
	Aspartic acid	2		0.08 ± 0.12 a	0.34 ± 0.40 a	0.03 ± 0.03 a	0.02 ± 0.02 a	
	Proline	2		0.03 ± 0.03 a	0.08 ± 0.10 a	< LQ	< LQ	
	Histidine	2		0.48 ± 0.61 a	1.57 ± 1.70 a	0.17 ± 0.07 a	0.19 ± 0.10 a	
	Arginine	2		0.98 ± 0.31 ab	3.54 ± 3.56 a	0.95 ± 0.51 ab	0.59 ± 0.38 b	
	Phenylalanine	2		1.29 ± 1.22 a	3.16 ± 3.38 a	0.48 ± 0.53 a	< LQ	
	Tyrosine	2		0.99 ± 1.11 a	2.65 ± 2.93 a	0.33 ± 0.36 a	0.39 ± 0.39 a	
	Tryptophan	1		0.18 ± 0.16 a	0.39 ± 0.38 a	0.11 ± 0.13 a	0.13 ± 0.12 a	
	Glutamine	/		< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	
	Glutamic acid	2		0.62 ± 0.34 a	0.93 ± 0.93 a	0.35 ± 0.16 a	0.35 ± 0.10 a	
	Valine	2		0.46 ± 0.40 a	0.85 ± 0.88 a	0.16 ± 0.06 a	0.27 ± 0.27 a	
	Lysine	2		0.09 ± 0.12 a	0.20 ± 0.28 a	0.08 ± 0.04 a	0.06 ± 0.03 a	
Methionine	2	0.57 ± 0.34 a	1.49 ± 1.31 a	0.38 ± 0.24 a	0.55 ± 0.29 a			
Leucine + isoleucine	2	0.30 ± 0.13 a	0.45 ± 0.42 a	0.23 ± 0.25 a	0.18 ± 0.16 a			

3.5. Multivariate approach to the impact of Cd on rhizodeposition

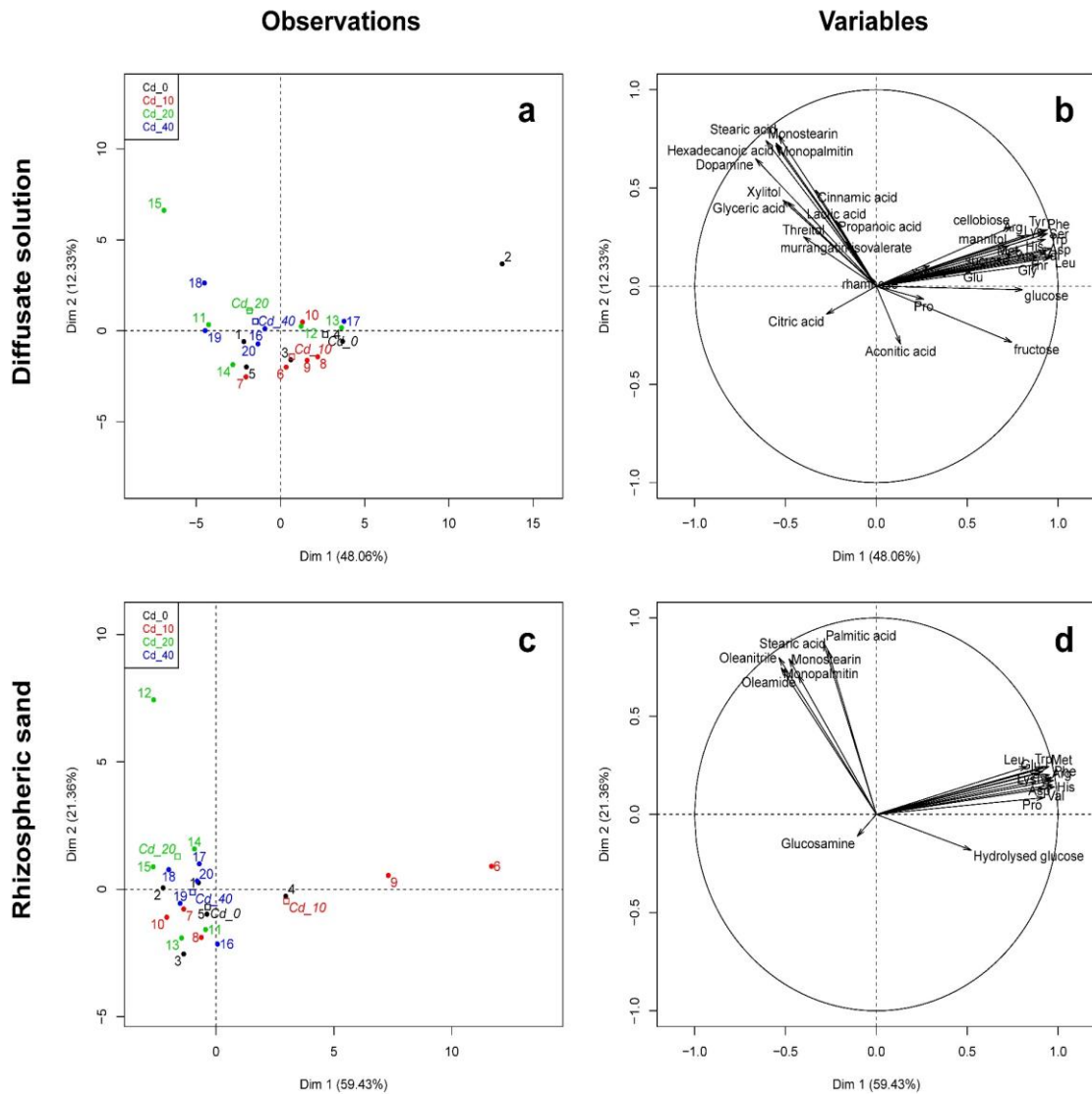


Figure 38 : Principal Component Analysis (PCA) generated from all molecules measured in diffusate solution (a,b) and in rhizospheric sand extract (c,d). Points represent the different samples according to Cd treatments (black: 0 μM Cd; red: 10 μM Cd; green: 20 μM Cd; blue: 40 μM Cd). Amino acids are designated according to their three-letters code

A multivariate approach using principal component analysis (PCA, Figure 38) was used to measure the impact of Cd on both rhizodeposits solutions. This showed that two groups of samples could be distinguished: those exposed to high Cd concentrations (20 et 40 μM Cd) and those not exposed or exposed to lower Cd concentrations (0 et 10 μM of Cd). The 0 et 10 μM treatments were associated to carbohydrate and amino acid exudation, when 20 et 40 μM treatments were associated with the deposition of the other compounds, like fatty and organic acids whose exudation augmented. This difference was more pronounced for the diffusate

solution than for the rhizospheric sand extract. This could be due to the fact that the diffusate solution was an instantaneous collection (6 h) after a five-week exposure to Cd, whereas rhizospheric sand extract resulted from 5 weeks of cultivation and an equilibrium between root secretion at different stages and its possible consumption by microorganisms. We can assume that these processes might have erased any differences between Cd treatments.

The presence of two sample groups highlights the limit of the tolerance of maize to Cd. This limit is located between 10 and 20 μM Cd in the nutrient solution, as beyond the 10 μM treatment, the effects of Cd on plant morphology, growth and biochemistry were visible. Beyond this limit, rhizodeposition was altered with a decrease in sugar, amino acid exudation and an increase in organic acid exudation.

3.6. Significance of the collected rhizodeposits

The composition of the two rhizodeposits fractions: diffusate solution and rhizospheric sand extract, was very different. The diffusate solution was mainly composed of low molecular weight molecules. Sugar was the most represented family of compounds, with especially high glucose levels. Organic acids and amino acids were also well represented. The qualitative and quantitative composition of the diffusate solution was close to that of root exudates usually described in the literature (Grayston *et al.*, 1997; Neumann & Röhmheld, 2000; Uren, 2007). For example, the amino acids in root exudates collected by Boeuf-Tremblay *et al.* (1995) reached $0.07 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, when we measured concentrations from 0.04 to $0.11 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. They measured $0.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ of total sugars, while our diffusate solution contained from 0.2 to $2.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. However, the method used to cultivate plants and collect these exudates in the previous work was different: their plants were grown under sterile and hydroponic conditions and root exudates were determined from the nutritive solution. However, the mechanisms by which the molecules were emitted in the rhizosphere were the same as in our work, diffusing passively from the cytoplasm to the external solution, according to a concentration gradient. In both cases, their flow and the type of the molecules depended on the permeability of the plasma membrane (Guern *et al.*, 1987; Sanders & Berthke, 2000).

The rhizospheric sand extract was mainly composed of molecules with a higher weight than those of the diffusate solution. No low molecular weight compounds like mono or disaccharides or organic acids were found in the rhizospheric sand extract, which mainly contained proteins, amino acids and polysaccharides. It also included fatty acids and derived fatty acids. This composition is similar to that of mucilage, being mostly composed of

polymerized sugars and proteins (Bacic *et al.*, 1987; Read *et al.*, 2003). Besides, at harvest, the rhizospheric sand extract was visibly a gelatinous layer covering the maize roots, corresponding to what has been designated as mucilage in previous works (Jones *et al.*, 2009; Morel *et al.*, 1986).

The rhizospheric sand extract, obtained after a five-week cultivation period, contained molecules resulting from an equilibrium between root secretion and consumption by microorganisms (Guckert *et al.*, 1975). It is therefore possible that most low molecular weight compounds produced by the root were not represented in the rhizospheric sand extract due to their microbial degradation. On the other hand, the diffusate solution was collected over 6 hours and the microorganisms did not have enough time to degrade root exudates. Moreover, this solution was collected from demineralized water whose composition was different from that of the soil solution. The osmotic pressure and the concentration gradient might have enhanced the exudation during the collection period, compared to an in-situ condition. Indeed, the collection of rhizodeposits might not be completely representative of what the root actually emits in the soil. It must keep in mind that, even if we determined more than 40 molecules, we probably missed several compounds emitted by roots at low concentrations. In addition, it must be noted that the concentration of the extracts, even after lyophilisation, might not be sufficient for certain compounds to be identified given the insufficient sensitivity of the determination methods.

3.7. Suspected role of collected rhizodeposits on Cd dynamics

Plants can use several strategies to protect themselves against toxic trace metals. One of these strategies is exclusion and consists in preventing metal ions from entering the root cells by secreting chelating metabolites into the rhizosphere. The role of amino acids in abiotic stress is well known. For instance, proline is known as ligands toward trace metals and can act as a hydroxyl radical scavenger in plants (Sharma & Dietz, 2006; Smirnov & Cumbes, 1989). Histidine is known as a central metabolite in metal sequestration, as well as many other amino acids (Bottari & Festa, 1996; Sharma & Dietz, 2006). Cysteine and methionine are sulfur-containing amino acids, known for their strong chelating ability due to their thiols group (Colovic *et al.*, 2018). Organic acids contribute to plant tolerance to trace metals due to their ability to bind them. Increased emissions of organic acids in the rhizosphere have already been described in the presence of Cd stress (Luo *et al.*, 2014). This has been demonstrated for oxalate secretion by tomatoes, which contributes to Cd exclusion and plant resistance (Zhu *et al.*, 2011). Citrate exudation, which was observed in our diffusate solution, can reduce significantly the

percentage of free Cd^{2+} in solution (Pinto *et al.*, 2008). We found no data concerning the reactivity of other organic acids measured here in the diffusate solution, like lactic acid, and further investigations are needed to understand their possible involvement in Cd tolerance. In the diffusate solution, organic acids seemed to be produced specifically in the higher Cd exposure, in response to this stress.

4. Conclusions

Cadmium toxicity was visible at three plant levels. At a morphological scale, Cd caused a modification in biomass allocation. It was measurable in the plant functioning with a decrease in photosynthetic activity, a decline in total carbon including carbohydrates and in proteins. Cadmium also modified rhizodeposition in both mucilage and root exsudates. Indeed, the rhizospheric sand extract was very close to the mucilage usually described in the literature, whose main components are high molecular weight compounds like polysaccharides and proteins. Total carbon and sugar tended to decrease in the presence of Cd, while this drop was significant for amino acid and total protein content. As expected, diffusate solution composition was very close to root exudate solutions described in previous works, mainly composed of low molecular weight compounds like mono and di-saccharides, amino and organic acids. In the presence of Cd, total carbon and amino acids tended to decrease, sugars decreasing significantly, while protein secretion was constant, and organic acid increased. Because of their ability to bind Cd, many of these molecules potentially contribute to plant tolerance to trace metals, by reducing Cd availability for root absorption. Our results concerned a larger number of molecules than most of the previous works. These results are consistent with those of past studies dealing with the composition of root exudates, but could not be compared for the mucilage composition, because of a lack of published studies.

Données complémentaires

Chapitre 3c.

1. Introduction

Les données présentées dans cette partie ne l'ont pas été dans l'article précédent mais apportent néanmoins des informations complémentaires. Il s'agit de l'impact du Cd sur le fonctionnement du maïs *via* : (i) des analyses biochimiques totales (acides aminés, protéines et glucides totaux) (ii) des teneurs en carbone et azote total dans trois organes (feuille, tige, racine) (iii) des teneurs en Cd dans ces mêmes organes.

D'autres part, les limites de la rhizosphère et le contenu des différents compartiments du sable que nous avons collectés seront discuté. Pour rappel, dans les dispositifs plantés, deux types de sable ont été récoltés : le sable rhizosphérique adhérant aux racines et le sable non-rhizosphérique qui constitue le reste du sable non-adhérent aux racines. Il existe un troisième type de sable dans les dispositifs expérimentaux : le sable non-planté, contenu dans les pots n'ayant pas reçu de plante. A partir de ces sables, des extractions sont réalisées pour solubiliser les molécules adhérentes au substrat. Des analyses de carbone organique total, d'acides aminés, de glucides et de protéines devraient nous permettre de dire si le sable collecté correspond bien au sable rhizosphérique ou si la rhizosphère s'étend plus largement autour du système racinaire.

2. Résultats

2.1. Impact du Cd sur le fonctionnement du maïs

La concentration en Cd dans les organes des plants de maïs augmente logiquement et de façon significative avec la concentration en Cd dans le substrat (Figure 39). C'est dans les racines que le Cd est le plus concentré, pouvant atteindre jusqu'à 250 mg.kg⁻¹ pour la dernière modalité.

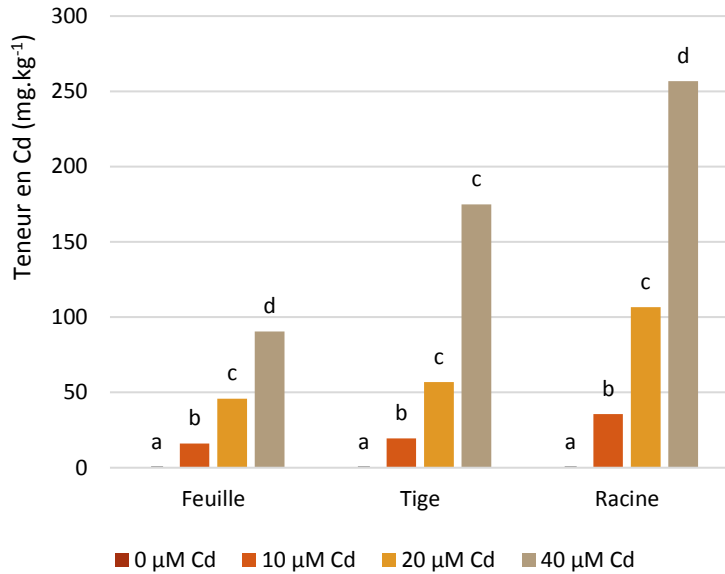


Figure 39 : Concentration en Cd (mg.kg^{-1}) dans les différents organes des plants de maïs séchés en fonction de la concentration en Cd dans le substrat.

Moyenne, $n = 5$. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes au seuil de 5 %. Une Anova à un facteur suivie du test post-hoc de Tukey est utilisée ou un test de Kruskal-Wallis suivi du post-hoc de Fisher pour chaque organe.

La concentration en azote total (Figure 40) dans les organes est comprise entre 10 g.kg^{-1} et 25 g.kg^{-1} et cette concentration tend à augmenter de façon non-significative avec l'exposition au Cd. Au contraire, la quantité de carbone total dans la plante (Figure 41) ne semble pas être affectée par l'exposition au Cd. De plus, ces valeurs varient très peu d'un organe à un autre, qu'il s'agisse du carbone ou de l'azote même si les teneurs en azote semblent être plus faibles dans les racines que dans les autres organes.

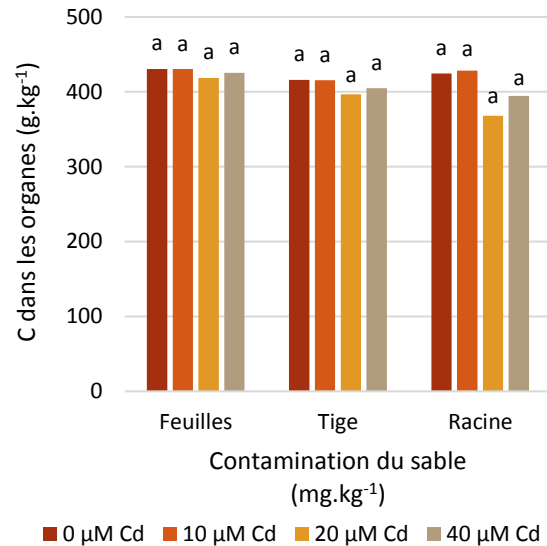
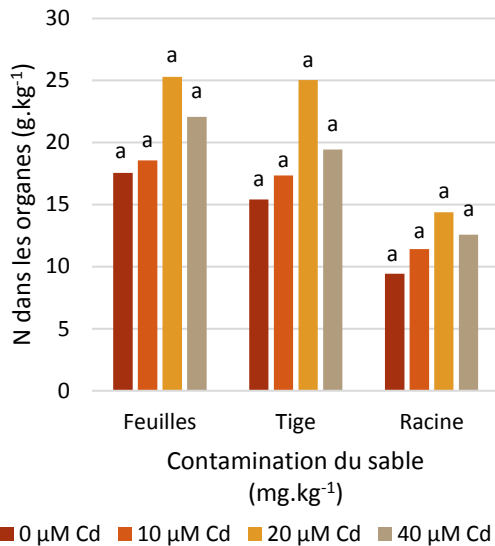


Figure 40 : Concentration en azote (g.kg⁻¹) dans les différents organes des plants de maïs séchés en fonction de la concentration en Cd dans le substrat.

Figure 41 : Concentration en carbone (g.kg⁻¹) dans les différents organes des plants de maïs séchés en fonction de la concentration en Cd dans le substrat.

Moyenne, n = 5. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes au seuil de 5 %. Une Anova à un facteur suivie du test post-hoc de Tukey est utilisée ou un test de Kruskal-Wallis suivi du post-hoc de Fisher pour chaque organe.

Dans le cas des teneurs en protéines, les tendances semblent différentes selon l'organe étudié (

Figure 42).

Dans les racines et les feuilles la teneur en protéines diminue en présence de Cd, alors qu'elle augmente dans les tiges. Pour l'exposition la plus basse (10 μM Cd), la concentration en protéines est très proche de celle du témoin quel que soit l'organe alors que les deux modalités les plus contaminées (20 et 40 μM) sont significativement différentes du témoin et de la modalité 10 μM.

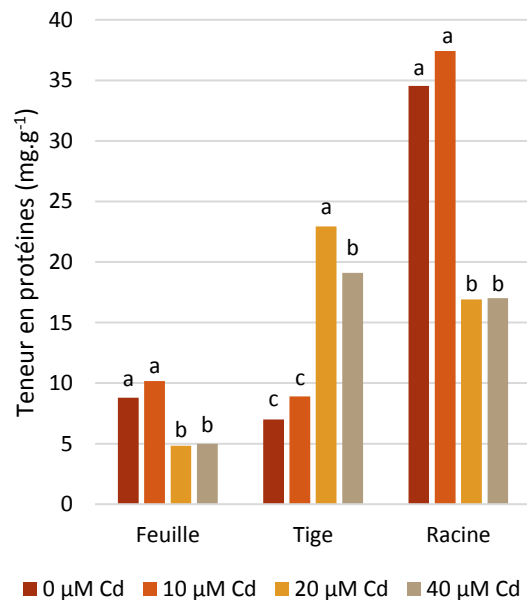


Figure 42 : Teneur en protéines (mg.g⁻¹) dans les différents organes des plants de maïs séchés en fonction de la concentration en Cd dans le substrat.

Moyenne, $n = 5$. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes au seuil de 5 %. Une Anova à un facteur suivie du test post-hoc de Tukey est utilisée ou un test de Kruskal-Wallis suivi du post-hoc de Fisher pour chaque organe.

Les teneurs en acides aminés totaux sont plus importantes dans le cas de plantes exposées à 20 et 40 μM de Cd avec, avec par exemple une concentration de l'ordre de 43-44 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pour les racines exposées et de 25 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pour les plantes non exposées. La même tendance apparaît quel que soit l'organe mais n'est significative que dans les tiges (Figure 44). Cette augmentation est d'ailleurs significative dans les tiges à partir de 10 μM mais pas dans les feuilles et les racines du fait d'une variabilité importante entre les individus. En revanche, la teneur en glucides dans les organes ne semble pas être liée aux concentrations en Cd du substrat même si des teneurs plus basses dans les racines ont été observées pour les plantes exposées à 20 et 40 μM de Cd (Figure 43).

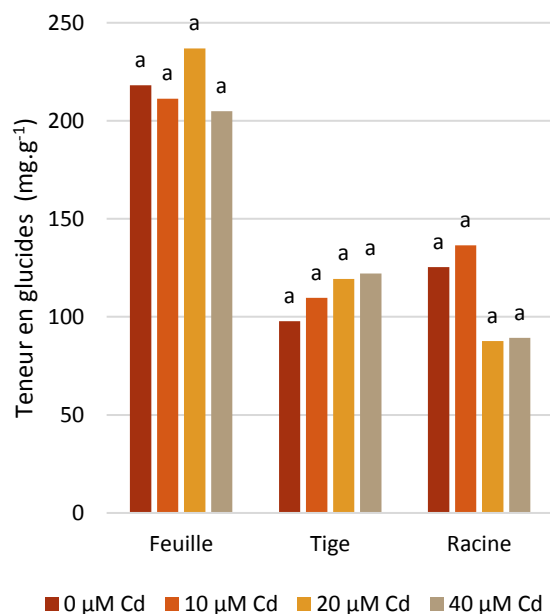


Figure 43 : Teneur en protéines ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) dans les différents organes des plants de maïs séchés en fonction de la concentration en Cd dans le substrat.

Moyenne, $n = 5$. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes au seuil de 5 %. Une Anova à un facteur suivie du test post-hoc de Tukey est utilisée ou un test de Kruskal-Wallis suivi du post-hoc de Fisher pour chaque organe.

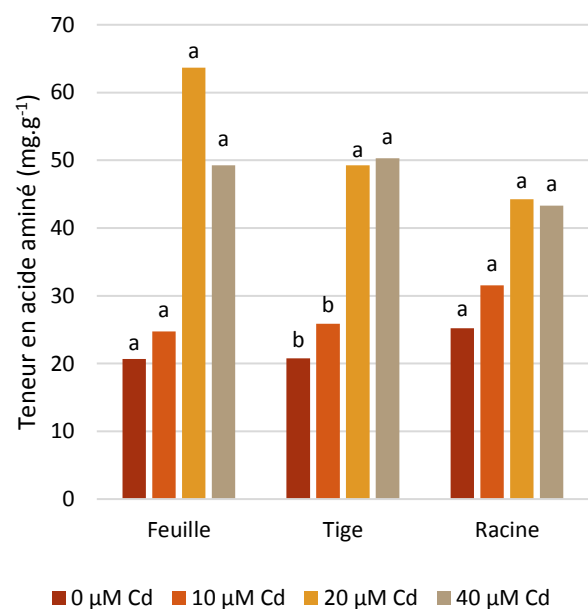


Figure 44 : Teneur en acides aminés ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) dans les différents organes des plants de maïs séchés en fonction de la concentration en Cd dans le substrat.

2.2. Les limites de la rhizosphère

Des différences significatives ont été observées entre le sable rhizosphérique et le sable non-rhizosphérique (Figure 45), et ce dernier est assez proche du sable non-planté. Ainsi, la teneur en carbone organique est deux à trois fois plus importante dans le sable rhizosphérique que dans les deux autres types de sable. En ce qui concerne la teneur en acides aminés (Figure 46), comme pour le dosage du carbone organique, la teneur en acides aminés dans les sables non-

rhizosphérique et non-planté est faible par rapport au sable rhizosphérique. Ce dernier contient entre 0.005 et 0.014 mg.g⁻¹ d'acides aminés alors que les autres sables en contiennent moins de 0.001 mg.g⁻¹.

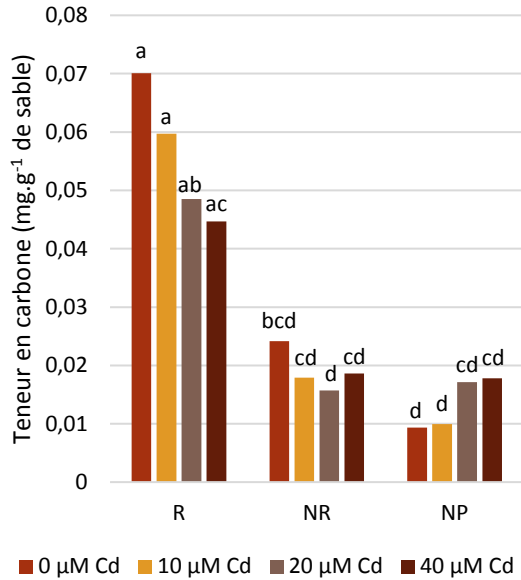


Figure 45 : Teneur en carbone organique dans les solutions d'extraction de sable (mg.g⁻¹ de sable).

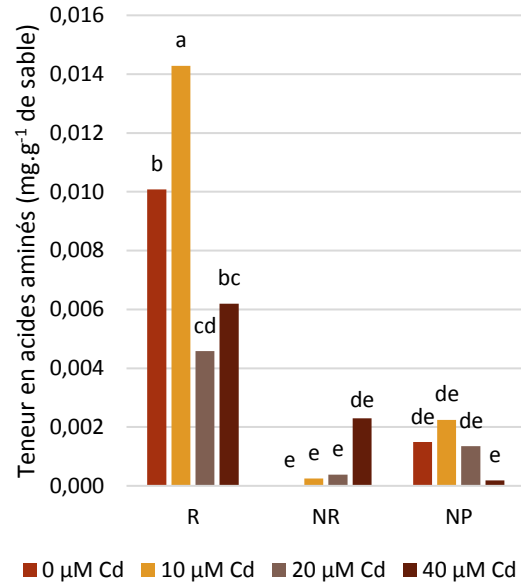


Figure 46 : Teneur en acides aminés dans les solutions d'extraction de sable (mg.g⁻¹ de sable).

R : Rhizosphérique, NR : Non-Rhizosphérique, NP : Non-Planté

Moyenne, n = 5. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes pour chaque traitement au seuil de 5 % en utilisant une Anova à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey de comparaisons multiples des traitements et d'un test de comparaison de rang

La teneur en protéines dans les sables non-plantés et non-rhizosphérique (Figure 47) est inférieure à la limite de quantification pour la plupart des modalités ou quasiment nulle, tandis que dans le sable rhizosphérique, elle atteint des concentrations allant de 2.6 à 3.5 mg.g⁻¹ selon les traitements. En ce qui concerne les glucides, leur teneur dans le sable non-rhizosphérique et non-planté est moindre par rapport à la quantité de glucides dans la rhizosphère (Figure 48).

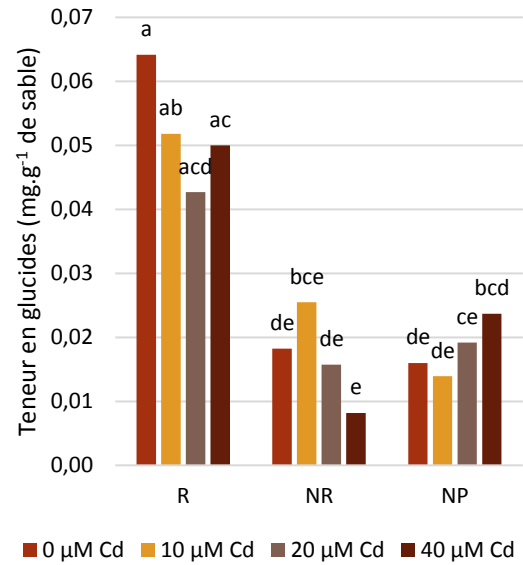
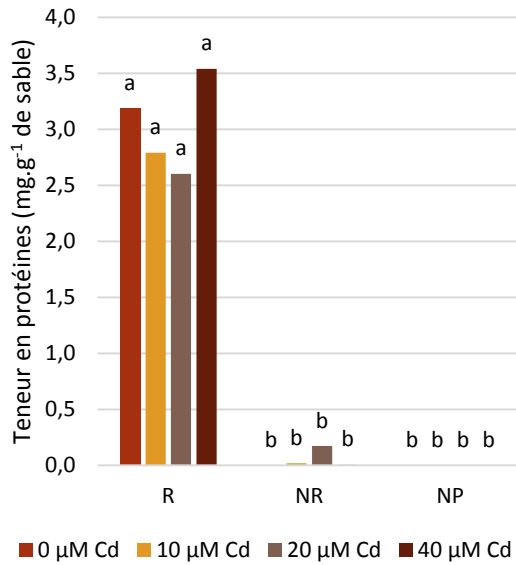


Figure 47 : Teneur en protéines dans les solutions d'extraction de sable (mg.g⁻¹ de sable).
 Figure 48 : Teneur en glucides dans les solutions d'extraction de sable (mg.g⁻¹ de sable).

R : Rhizosphérique, NR : Non-Rhizosphérique, NP : Non-Planté

Moyenne, n = 5. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes pour chaque traitement au seuil de 5 % en utilisant une Anova à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey de comparaisons multiples des traitements et d'un test de comparaison de rang.

Conclusion et discussion

Impact du Cd sur le fonctionnement du maïs

La quantité d'acides aminés dans la plante, peu importe l'organe, tend à augmenter avec celle du Cd. Cette augmentation concorde avec les teneurs en azote. Ce phénomène a déjà été observé chez d'autres plantes. Dans le système aérien et racinaire de *Lupinus albus*, la concentration en acides aminés comme la cystéine, la glycine, l'acide glutamique, l'asparagine et la proline augmente lorsque la plante est exposée à des concentrations inférieures à 1 μM de Cd. Au-delà, leur concentration tend à décroître (Costa & Spitz, 1997). Le riz soumis à des concentrations inférieures à 500 μM de Cd accroît sa teneur en proline aussi bien dans le système aérien que racinaire (Shah & Dubey, 1997). Ces modifications peuvent être dues à la mise en place du système ROS qui induit la production de molécules antioxydantes comme certaines enzymes mais également de certains acides aminés (proline, bétaïne), sucres et polyols. Ces molécules vont permettre à la plante de tolérer ce stress oxydatif (Hare & Cress, 1997; Zhang *et al.*, 2007). Ainsi, les plantes mettent en place des mécanismes de tolérance en privilégiant la production de certaines molécules par rapport à d'autres. Ainsi, si les acides aminés tendent à augmenter dans la plante, les protéines quant à elles baissent tandis que les teneurs en azote sont constantes. Cependant, lorsque le niveau d'exposition au Cd est trop élevé, le métabolisme de la plante commence globalement à décroître. Chez le lupin blanc, à des concentrations de Cd inférieures à 0,1 μM , les niveaux de glucides et d'acides aminés mesurés dans les plantes augmentent alors qu'à des concentrations supérieures à 0,1 μM , la quantité de tous les métabolites primaires mesurés diminue (Costa & Spitz, 1997). Dans notre cas, le maïs soumis à des concentrations inférieures à 40 μM ne semble pas avoir atteint un tel seuil.

Impact du Cd sur la rhizodéposition

Le Cd affecte de façon globale la rhizodéposition mais de manière différente selon les molécules considérées. En effet, la quantité d'acides aminés diminue dans les deux solutions de rhizodépôts en présence de Cd et plus particulièrement dans les extraits de sable rhizosphérique. Cette tendance est visible aussi sur le carbone organique et les sucres totaux, notamment dans les solutions de diffusat issues de plantes exposées au Cd. Une diminution des monosaccharides diffusés tels que le fructose, le glucose ou le mannitol a déjà été décrite par Luo *et al.* (2014) et ce même à des basses concentrations, dès une exposition à 5 μM de Cd. La production de protéines par rhizodéposition reste stable malgré une exposition au Cd, ce qui

nous laisse penser qu'elles pourraient être impliquées dans des mécanismes actifs de tolérance du maïs à l'exposition au Cd. De la même façon, la concentration en acides organiques dans les solutions de diffusat tend à augmenter avec l'exposition au Cd, et ce de manière significative pour certains acides. Ce phénomène a déjà été observé à plusieurs reprises dans d'autres études en dosant les exsudats racinaires de la tomate maïs aussi du maïs (Pinto *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011). Les autres molécules dosées par GC-MS tendent aussi à augmenter, les acides gras, les monoglycérides et les alcools et ce dans les deux solutions de rhizodépôts. Les principaux composés émis dans la rhizosphère et leur interactions avec le Cd sont résumés dans la Figure 49.

Liens entre fonctionnement de la plante et rhizodéposition

Dans les deux solutions de rhizodéposition, la teneur en carbone total ainsi que la teneur en sucre diminuent avec l'exposition au Cd du maïs. Cette baisse est également visible pour les mono ou disaccharides individuels et peut être expliquée par une diminution de l'activité photosynthétique et une diminution du sucre dans les racines. En effet, plus de 17 % du carbone net fixé par la photosynthèse est émis par les racines (Nguyen, 2003). Par conséquent, comme la quantité de carbone et de sucre dans les racines diminue, tout comme leur rhizodéposition, il est probable que la quantité de carbone rhizodéposée dépende de la photosynthèse. Concernant les protéines, l'exposition des plantes au Cd ne semble pas avoir d'impact sur leur teneur dans les solutions de rhizodéposition, contrairement à leur contenu dans les racines qui diminue de façon significative. Enfin, les acides aminés dosés dans les racines tendent à augmenter alors que la tendance inverse est visible aussi bien dans les solutions de diffusat que dans les extraits de sable rhizosphérique, et ce de façon significative pour cette dernière. En dépit de l'existence de phénomènes passifs de diffusion à travers les racines, le flux de rhizodépôts n'est pas proportionnel à la concentration dans la racine et semble donc régulé. La rhizodéposition a très longtemps été considérée comme une perte pour la plante alors qu'elle résulte en fait de mécanismes actifs ayant une certaine autonomie parmi tous les processus au sein du système racinaire.

Les limites de la rhizosphère

Secouer la plante pour différencier le sol rhizosphérique du reste du sol est le protocole classiquement employé et est souvent critiqué puisqu'il ne peut être précisément standardisé (Pinton *et al.*, 2007). En effet cette méthode dépend beaucoup de l'architecture du système racinaire et de l'opérateur lui-même. Mais on voit ici que pour toutes les analyses biochimiques,

il y a des différences significatives entre le sable dit rhizosphérique et les autres sables. Ce premier est plus concentré en carbone, en acides aminés, protéines et glucides. Ces mesures confirment que la plupart des molécules émises par les racines restent à proximité immédiate de celles-ci. De plus, il n'y a pas de différence significative entre le sable non-rhizosphérique et le sable non-planté, ce qui montre que les molécules retrouvées dans ces sables ne sont pas d'origine végétale mais probablement d'origine microbienne. Nous pouvons donc en conclure que le sable collecté correspond bien au sable rhizosphérique et même s'il y a des risques de collecter un volume de sable supérieur ou inférieur à la rhizosphère, cette erreur reste négligeable dans notre dispositif expérimental.

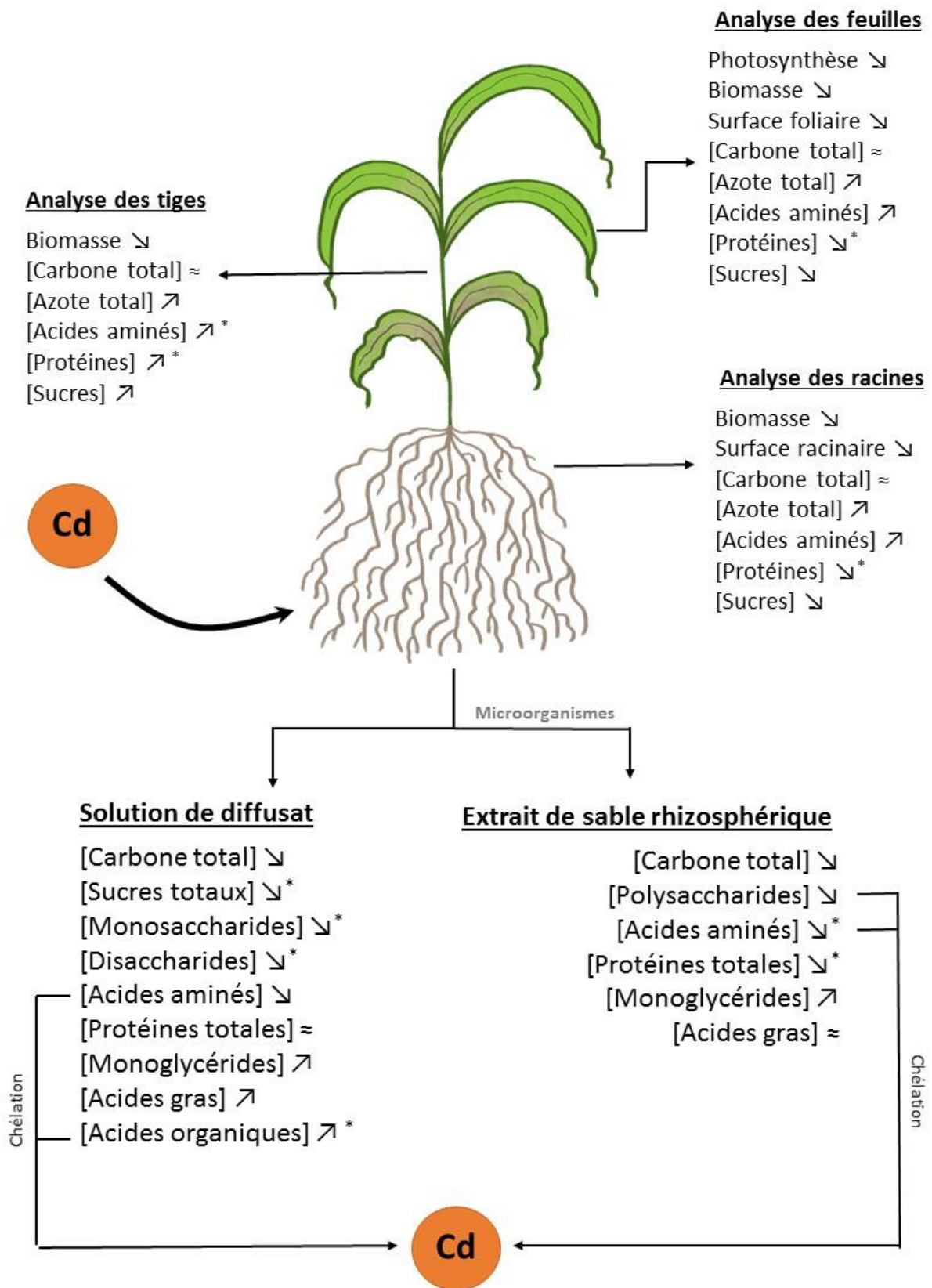


Figure 49 : Schéma récapitulatif de l'impact du Cd sur le fonctionnement de la plante, de la rhizodéposition et ses effets connus sur le Cd. Lorsque la modification est statistiquement significative, un * est apposé.

Chapitre IV

Profil métabolique des rhizodépôts de haut et bas poids moléculaire du maïs exposé à des concentrations croissantes de phénanthrène

Ce chapitre vise à évaluer l'impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques, représentés ici par le PHE, sur la composition qualitative et quantitative des rhizodépôts du maïs. En effet, comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, la présence de stress abiotique tel que l'exposition à un polluant peut modifier la composition des exsudats racinaires et du mucilage. A l'inverse, la présence de ces rhizodépôts peut changer la dynamique du polluant dans le sol en augmentant ou en diminuant la biodisponibilité de celui-ci. Le rôle connu des molécules identifiées sera alors discuté.

En nous appuyant sur la thèse de Joan Dupuy (2014) qui a travaillé sur l'impact des HAP sur le maïs, nous avons défini quatre niveaux d'exposition au PHE. Cette étude, réalisée dans des conditions similaires à la nôtre a montré une forte baisse de la biomasse entre le contrôle et les plants exposés à 50 mg PHE.kg⁻¹ (-78%) et une baisse de -89% pour ceux exposés à 150 mg PHE.kg⁻¹. A des concentrations supérieures (250, 500 et 750 mg PHE.kg⁻¹), l'impact du PHE est équivalent à celui observé sur les plantes soumises à 150 mg PHE.kg⁻¹. C'est pourquoi nous avons choisi des concentrations comprises entre 0 et 100 mg PHE.kg⁻¹.

Ainsi, lors de notre expérimentation, des plants de maïs ont été cultivés sur du sable dans des conditions contrôlées et soumis à des concentrations croissantes en PHE (0,25, 50 et 100 mg de PHE.kg⁻¹ de sable sec). Après six semaines, les plantes ont été récoltées et deux types de solutions de rhizodéposition ont été collectés, l'extrait de sable rhizosphérique et la solution de diffusate. La première résultait de l'extraction du sable adhérent aux racines, pour recueillir le mucilage et les composés associés. La seconde a été collectée par diffusion d'exsudats de racines trempées dans de l'eau. L'impact du PHE sur la morphologie et le fonctionnement du maïs a été mesuré puis les solutions de rhizodépôts ont été analysées en mesurant le carbone total, les protéines, les acides aminés et les sucres totaux et en déterminant environ 40 composés *via* deux techniques, la GC-MS et la LC-MS. L'impact du PHE sur le fonctionnement des plantes était peu marqué mais nous avons pu observer une légère diminution de la biomasse des plantes ainsi qu'une augmentation de l'activité photosynthétique et de la production d'acides aminés. Des tendances différentes ont été observées dans les deux solutions de rhizodéposition. En effet, dans la solution de diffusat, la teneur en carbone total a augmenté ainsi que les protéines totales, les glucides totaux et individuels, les acides aminés totaux et la plupart des acides aminés individuels, à l'exception de la lysine et de la glutamine. En revanche, dans l'extrait de sable rhizosphérique, la teneur en carbone total a diminué avec l'exposition au PHE, ainsi que celle des acides aminés totaux et individuels et des polysaccharides sécrétés par la racine. Enfin, de nombreux composés mesurés tels que les acides organiques, les glucides, les

acides aminés ou les acides gras pourraient directement ou indirectement influencer sur la dynamique des HAP dans les sols, et en particulier sur leur dégradation.

Impact of phenanthrene on primary metabolites profiling in root exudates and mucilage of maize

Chapitre 4a.

Clémentine Lapie¹, Thibault Sterckeman¹, Cédric Paris^{2,3}, Pierre Leglize¹

¹Université de Lorraine, Inra, Laboratoire Sols et Environnement, F-54000 Nancy, France

²Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, F-54000 Nancy, France

³Plateau d'Analyse Structurale et Métabolomique, SF4242, EFABA, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Soumis dans **Environmental Science and Pollution Research**

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitous, and toxic to humans. They are of great concern due to their long-term health effect. Sixteen of them have been identified for their mutagenicity, including phenanthrene which is one of the most frequent PAHs (EFSA, 2008; Lerda, 2011; US EPA, 1984). PAHs are generated during the incomplete combustion of organic matter (e.g. coal, oil, wood), mainly due to anthropogenic activities like traffic, petroleum refineries or coke production (Abdel-Shafy & Mansour, 2016; Conte *et al.*, 2001; Fabiańska *et al.*, 2016; Keyte *et al.*, 2013). The major vector of PAH exposure for human populations is air, due to the high volatility of these compounds. However, PAH exposure can also occur through the ingestion of contaminated foods or soil. Indeed, PAHs can be absorbed by crops *via* roots or leaves, although the uptake mechanisms remain unclear (Abdel-Shafy & Mansour, 2016; Dupuy *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2012). PAHs uptake depends on the nature of the compounds and on their affinity with the root plasma membrane, but also on their concentration in soils, which can vary substantially. Their concentration is generally less than 1 mg.kg⁻¹ in arable, grassland and forest soils, but can easily reach 4 mg.kg⁻¹ in urban soils especially next to roads and can exceed 700 mg.kg⁻¹ in industrial wasteland soils (Barnier *et al.*, 2014; Wilcke, 2000).

PAH dissipation in soil could be improved through a phytoremediation process (Binet *et al.*, 2000; Ouvrard *et al.*, 2014). Indeed, in the presence of plants, soil PAH content declines, although plant uptake is negligible (less than 0.01% for phenanthrene (PHE) and 0.24% for pyrene (PYR) (Gao & Zhu, 2004). PAH remediation takes place in the rhizosphere, being directly or indirectly, enhanced by rhizodeposition (Binet *et al.*, 2000; Corgié *et al.*, 2003).

Major rhizodeposits can be classified in four groups (Grayston *et al.*, 1997; Nguyen, 2003): (1) water soluble root exudates comprising low molecular weight substances, lost passively by the roots through plasma membrane according to a concentration gradient (amino acids, organic acids, sugars, phenolics, phytosiderophores and many secondary metabolites); (2) secretions comprising high molecular weight substances and mucilage, depending on active metabolic processes for their release, which can take place against the electrochemical potential gradient. Mucilage is mainly composed of polysaccharides, phospholipids and polygalacturonic acids of high molecular weight; (3) excretions emitted actively into the rhizosphere with ATP consumption (ethylene, carbon dioxide, electrons); (4) lysates released from autolyzed and sloughed-off cells.

Rhizodeposits can modify PAH dynamics in soil/plant systems by modifying the rhizosphere characteristics, physically, chemically and biologically, leading to reduced PAH concentrations and/or modified bioavailability. Reilley *et al.* (1996) showed that PAHs' degradation increases from 30 to 44% on a vegetated soil compared to a bare soil. This phenomenon is mainly attributed to the capacity of rhizodeposits to enhance microbial activity (Joner *et al.*, 2002; Joner & Leyval, 2003). Indeed, the massive production of rhizodeposits by plants and especially sugar (e.g. glucose, fructose, sucrose) and organic acids (e.g. malate, citrate, oxalate or aspartate), which are easily degradable, induces a significant increase in bacterial biomass in the rhizosphere because of their chemoattractant characteristics (Grayston *et al.*, 1997; Heinrich & Hess, 1985; Reinhold *et al.*, 1985). In addition to increased microbial biomass and activity, rhizodeposition also modifies the diversity of bacterial community in the root's vicinity (Benizri *et al.*, 2002; Grayston *et al.*, 1997; Rovira, 1959). This statement is observable in the case of PAH pollution, the total number of cultivable heterotrophic microorganisms able to degrade PHE increases as the distance from the plant root decreases (Muratova *et al.*, 2009). The PAH biodegradation by microorganisms is possible in both aerobic and anaerobic conditions, through the oxidation of PAH aromatic rings (Cerniglia, 1993). However, plants can also produce oxidative enzymes including peroxidase in particular, which are directly involved in PAH degradation. These enzymes are located on the root surface and in the rhizospheric soil solution (Adler *et al.*, 1994; Liste & Alexander, 1999).

Nevertheless, the main obstacle to phytoremediation of PAH-contaminated soils is the bioavailability of these molecules (Ouvrard *et al.*, 2014). They are easily sorbed on soil solid phase especially on organic matter, which make them inaccessible to biodegradation (Ockenden *et al.*, 2003; Wilcke, 2000). Some rhizodeposits are able to modify this availability by

increasing the soil organic matter content, resulting either in a greater PAH partitioning to soil, or contrarily, by emitting surfactant or chelating compounds (Ouvrard *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2016). Rhizodeposition can modify rhizospheric pH, depending on plant species and soil conditions (Hinsinger *et al.*, 2003; Paterson, 2003; Sas *et al.*, 2001). The pH is an important factor in PAH desorption. At low pH levels, comprised between 2 and 3, the release of PAHs is minimal, while it is maximal at pH 7-8 and diminishes after that (Yang *et al.*, 2001). Therefore, an optimal pH combined with an increase in microbial activity leads to a higher and faster PAH degradation (Pawar, 2015). Root-emission of organic acids would particularly increase the PAHs availability in the rhizosphere. Injections of sodium citrate into soils significantly increased PAH desorption, as did malic, malonic, citric and oxalic acid (Ling *et al.*, 2009; Ouvrard *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2001). Amino acids, like serine and alanine and saccharides, including fructose also gave significant results in PAH desorption, but were less effective than organic acids. The former compounds, especially alanine, are more efficient at lower concentrations (0.42 to 5.03 g.kg⁻¹) (Sun *et al.*, 2012). Effects of rhizodeposits were visible when adding compounds individually, but also as a mixture. Joner *et al.* (2002) added to a contaminated soil a mixture of saccharides, amino and organic acids, representing the main families of rhizodeposits. The experiment resulted in an increase in the Soxhlet extractible five and six-ring PAHs, attributed to the desorption of initially non-extractable molecules. Gao *et al.* (2010), as well as Liste and Alexander (1999) also observed an increased desorption of PHE and PYR by adding root exudates. In the previous works, artificial root exudates were added, but mucilage and high molecular rhizodeposits were not considered, nor was the feedback effect of PAH exposure on the quality and quantity of the rhizodeposits.

Indeed, we know that abiotic stress can modify rhizodeposition (Neumann & Röhmheld, 2000). This is the case, for example, for nutritional deficiencies. A plant submitted to phosphorus deficiency emits specific amino or organic acids to facilitate phosphorus intake by chelation mechanisms (Hinsinger, 2001; Shen *et al.*, 2002, 2005; Tang *et al.*, 2009; Wittenmayer & Merbach, 2005). In case of iron deficiency, phenols, malate and other acids are secreted to facilitate iron bioavailability and absorption (Vranova *et al.*, 2013). Water stress also induces changes in root exudates. Song *et al.* (2012) showed that maize grown in hydroponic conditions and exposed to water stress exuded more organic acids (malic, lactic, citric or maleic) than non-exposed plants. Preece and Peñuelas (2016) reported an increase in root exudation of sugar per gram of plant biomass under moderate drought. Plants may up-regulate rhizodeposition under moderate drought and release more mucilage in order to ease the movement of roots through

dry soil (Ahmed *et al.*, 2014). The presence of toxic compounds like Cd can modify rhizodeposition through the release of larger amounts of acetic, oxalic, glutamic, citric, aconitic and succinic acid or amino acids like proline (Fan *et al.*, 2001; Lapie *et al.*, 2019). Organic pollutants may also modify rhizodeposition. For instance, *Plantago lanceolata* submitted to a herbicide increased the carbon flow emitted from its roots (Porteous *et al.*, 2000). Despite this quite extensive knowledge, modifications to the rhizodeposition submitted to PAH in both mucilage and root exudates has as yet, been very little studied.

This is why in this experiment, we aimed at 1) characterizing as exhaustively as possible the compounds in mucilage and root exudates and 2) evaluating qualitatively and quantitatively the impact of plant exposure to PAH on these compounds (mainly carbohydrates, amino acids, organic acids, polysaccharides and proteins) in order to discuss their role in PAH availability, tolerance and degradation. Phenanthrene was chosen as a model pollutant and maize (*Zea mays* L.) as a model plant.

2. Materials and methods

2.1. Plant cultivation

The experiment was conducted in a growth chamber (photoperiod 16 h, 23/18 °C day/night temperatures, relative humidity 70%, photosynthetic photon flux density (PPFD) 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Maize (*Zea mays* L., MB862, INRA) was cultivated in sand (particle size of 0.4-0.8 mm, Sibelco, France) in polyvinyl chloride cylindrical pots (diameter 7.3 cm, height 30 cm, 1 725 g dry sand per pot). The sand was washed with 12% hydrochloric acid to remove any carbonates and contaminants, rinsed with deionized water, and then dried in an oven (70 °C, 48 h, then 200 °C, 2 h). There were four phenanthrene (PHE) levels (0, 25, 50, 100 mg PHE (kg sand)⁻¹) in five replicates randomly distributed in the growth chamber. Sand was contaminated following the Dupuy *et al.* protocol (2016). A PHE stock solution was prepared in HPLC grade dichloromethane. Then, a sub-sample of dry sand, representing 10% of the required total mass was spiked at 16% v/w by a PHE solution diluted from the stock solution to achieve concentrations of 250, 500 and 1000 mg kg⁻¹. The solvent was evaporated under a fume hood and the spiked sand was homogeneously mixed with the remaining fraction (90%) of non-contaminated sand in order to obtain the final concentrations (25, 50 and 100 mg PHE kg⁻¹). The control treatment was spiked with the same volume of pure dichloromethane and treated similarly. The sand was contaminated just before the beginning of the experiment.

Nutrients were added in a single dose at the very beginning of the cultivation in a 250 mL nutritive solution adapted from Hoagland and Arnon (1938), 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mM KH_2PO_4 , 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 90 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 460 μM H_3BO_3 , 1 μM MoO_3 , 10 μM Fe-EDTA, pH 5.4-5.5. The nutrient solution volume corresponded to 80% of the water holding capacity and humidity was maintained at 80% with deionized water (18 M Ω) every two days. Maize seeds were sterilized (H_2SO_4 95% 30 sec, ethanol 95% 5 min, H_2O_2 10% 30 min) before planting and pre-germinated in petri dishes with growth medium (4 g.L⁻¹ Tryptic Soy Agar, 12 g.L⁻¹ agar/agar, Sigma Aldrich). After two days, only non-contaminated germinated seeds were planted in our systems. After two weeks, a 10 mL solution of 100 μM Fe-EDTA was added to each pot.

2.2. Photosynthesis and respiration measurement

The photosynthesis and respiration rates were measured after six weeks with the gas exchange open system Li-Cor 6400 xt (Li-Cor, USA) on the 7th leaf. Each leaf was placed inside the Li-Cor chamber, in the following conditions of air temperature, CO_2 concentration and PPFD: 23 °C, 400 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.3. Collection of rhizodeposits

After six weeks of cultivation, the plants were harvested, and two rhizodeposit solutions were collected. The first resulted from the sand extraction. Sand adhering to roots is known as rhizospheric sand (Pinton *et al.*, 2007). Mucilage was collected by washing the root system with a phosphate-buffered saline (150 mL PBS, 8 g.L⁻¹ NaCl, 1.44 g.L⁻¹ Na_2HPO_4 , 0.24 g.L⁻¹ KH_2PO_4 , 0.11 g.L⁻¹ KCl). PBS is commonly used for washing procedures because of its isotonicity with cells and its capacity to avoid protein denaturation (Borg *et al.*, 2019; Šamaj *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1999; Vaughn & Campbell, 1988; Willats *et al.*, 2001). It prevents or at least reduces, the release of root exudates, contrarily to water or other non-isotonic solutes and permits mainly mucilage to be collected. The sand in the buffer solution was agitated for two hours in an overhead shaker (Reax 20, Heidolph, 15 RPM) and then removed by filtration on Whatman paper. The resulting solution is referred to as rhizospheric sand extract.

The second rhizodeposit solution was collected according to Luo *et al.*, 2014. After sand removal, roots were washed with deionized water and plunged into 150 mL of deionized water for 6 hours, to collect the root exudates. This second solution is called diffusate solution.

Both rhizodeposit solutions were kept at -20 °C. A 50 mL volume of each rhizodeposit solution was freeze-dried until all the water was completely sublimated (alpha 1-4 LDplus, Martin Christ, Germany). The freeze-dried residue obtained was re-suspended in 3 mL of deionized

water and the concentrated solution was filtered with 0.45 µm filters (Syringe filters, Acrodisc) to remove any dead cells and root parts before chemical analyses. The concentrated solution was used for protein, carbohydrates and amino acids analysis. For GCMS analysis, 50 mL of non-concentrated rhizodeposit solution were also freeze-dried and re-suspended with 3 mL of acetonitrile (ACN, HPLC-S Gradient Grade) and filtered with 0.45 µm filters.

Two different solvents were used, either water or ACN, because organic acids are more soluble in organic solvents like ACN, while sugars, amino acids and most proteins are preferably dissolved in water. In order to maximize solubilisation and homogenization, concentrated solutions were submitted to ultrasound for 45 minutes (Bransonic ultrasonic bath, Branson 5210, USA). Even after these steps, there is a possibility that some compounds could remain insoluble and were lost with filtration.

2.4. Plant morphological measurements

After both solutions had been collected, foliar symptoms were noted and root and shoot lengths were measured. Leaves, stems and roots were separated and weighed. Leaves were scanned using a portable leaf area meter and the transparent conveyor belt accessory (LICOR LI-3000C and LI-3050C, USA). The roots were scanned and the images obtained were analysed using WinRhizo® software (WhinRhizo, 2005, Regent Instruments Inc., Canada) in order to determine the root surface area of each plant. The fresh material was stored at – 20 °C until being manually cryogenically ground, using a pestle and mortar together with liquid nitrogen.

2.5. Plant biochemical measurements

Hydro-alcoholic extractions were performed in order to extract carbohydrates and amino acids from plant matter, according to Harrison et al. (2003). 100 mg of fresh material was added to 1 mL ethanol 80% (v:v) and agitated (17 RPM, 1 hour, 4 °C). The extract was centrifuged (10 min, 14 000 g) and the supernatant was sampled and kept to one side. The pellet was submitted to a second and a third extraction similar to the first one with 60% ethanol and then with water. The three supernatants were merged to constitute a solution designated as hydro-alcoholic extract.

The anthrone-sulfuric acid assay described by Leyva et al. (2008) was used to quantify the carbohydrate content in the hydro-alcoholic root extract. The anthrone reagent was prepared immediately prior to analysis by dissolving anthrone (0.1%, w:v) in a concentrated sulphuric acid (96%) solution. Standard solutions were prepared by diluting glucose (1.0 g.L⁻¹ in demineralized water). 150 mL of anthrone reagent and 50 µL of the standard or sample were added to each well of a microplate. The latter was kept at 4 °C for 10 min, then incubated at

100 °C for 20 min. Microplates were then cooled at room temperature and the absorbance was read at 620 nm with a microplate spectrophotometer (Synergy HT, Biotek Instruments, USA). Total soluble amino acids were determined with ninhydrine according to Rosen (1957) and glutamine was used as a standard. 100 µL of the standard or sample (hydro-alcoholic extract or rhizodeposit solution) was added to the deep well microplate. Then, 50 µL of KCN (10 mM, in 2.6 M acetate buffer, pH 5.2) and 50 µL of ninhydrine solution (3% w:v in ethyl glycol monomethyl ether) were added before incubating the microplate at 100 °C for 15 min. At the end of the incubation, the reaction was stopped by adding 500 µL of a isopropanol/water mix (50:50, v:v). The deep-well microplate was cooled at room temperature and 200 µL were transferred into a classic microplate before reading the absorbance at 570 nm with a microplate spectrophotometer.

Plant proteins were extracted from 100 mg of plant fresh material, using 400 µL of extraction buffer (100 mM tricine, 40 mM CaCl₂, 0.5% (w:v) polyvinylpyrrolidone, 0.5 % (v:v) triton 100 X, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 10 mM β-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl, pH 8). The suspension was agitated for 3 min. The supernatant was collected after centrifugation (15 000 g, 15 min, 4 °C) to constitute the soluble protein extract. Proteins were determined following the Bio-Rad Protein Assay instructions according to Bradford, 1976. The standard was bovine serum albumin (1.37 mg/mL, Bio-rad). 10 µL of each standard or protein extract from plants and 200 µL of five times diluted dye reagent was mixed into each well. The absorbance was read at 595 nm after 5 min of incubation at room temperature.

2.6. Analyses of rhizodeposits

Total carbon in non-concentrated rhizodeposit solutions was measured using a total organic carbon analyzer TOC-VSCN (Shimadzu, Japan). Rhizodeposit solutions were previously filtered with 0.45 µm syringe-filters (Acrodisc). A TOC standard solution (TOC Standard, SCP Science, France) was used both as standard and control sample.

Total carbohydrate, amino acid and protein contents of concentrated rhizodeposit solutions were measured using the same protocol as for plant material. Thus (1) carbohydrate content was quantified using the anthrone-sulphuric acid assay used for plant extract (Leyva *et al.*, 2008); (2) total soluble amino acids and ammonium were determined according to Rosen (1957); (3) protein content was determined following the Bio-Rad Protein Assay protocol for microplates, according to (Bradford, 1976).

Molecular analyses were performed on the concentrated solutions. Mono and di-saccharides were quantified following the protocol described by Ricochon et al. (2011). Compounds of interest were quantitatively analysed on a LC-MS system (Thermo Scientific, USA) including a binary solvent delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ mass spectrometer equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in atmospheric pressure chemical ionization negative mode (APCI⁻). Chromatographic analysis was performed on a Polyamine II HILIC column (250 × 4.6 mm, 5 µm, YMC, Germany) fitted with a guard column (7.5 × 4.6 mm, 5 µm, YMC, Germany). Mobile phases consisted in a mix of ultrapure water (phase A) and 1% of chloroform in acetonitrile (phase B). 20 µL of extracts were injected into the system and sugars were separated at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ through the isocratic mode (A/B: 25/75). Sugars were analysed in SIM mode, thanks to chlorinated adducts [M+35]⁻ and [M+37]⁻ which correspond to stable chlorine isotopes. The m/z windows used for the specific screening were set as follows: 167-188 m/z for xylose; 198-202 m/z for rhamnose; 214-232 m/z for fructose, glucose, mannose and mannitol; 376-382 m/z for sucrose and cellobiose. Mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage was set at 6 kV; source gases were set (in arbitrary units min⁻¹) for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 40, 10 and 10, respectively; capillary temperature was set at 225 °C; capillary voltage was set at -10 V; tube lens, split lens and front lens voltages at -47 V, 78 V and 5.25 V, respectively. Ion optics parameters were optimized in APCI⁻ mode by automatic tuning, using a standard solution of glucose at 0.1 g.L⁻¹ infused in mobile phase (A/B: 25/75) at a flow rate of 5 µL.min⁻¹. Furthermore, in order to determine the polysaccharide content of the rhizospheric sand extracts, a volume of 1 mL of concentrated rhizodeposit was hydrolysed in acidic conditions according to a protocol adapted from Happi Emaga et al. 2012 (15 min, 105 °C, 7.7% HCl, 45 min temperature ramp) before LC-MS analysis. The external calibration curves of sugars were plotted from 0.001 to 0.1 mg.L⁻¹ for diffusate solutions and from 0.001 to 0.5 mg.L⁻¹ for rhizospheric sand extracts.

Native amino acids were quantitatively analysed using the same LC-MS system, but operating in electrospray positive mode (ESI⁺). A porous graphitic column (Hypercarb, 100 × 2.1 mm, 5 µm, Thermo Hypersil-Keystone), fitted with a guard column (7.5 mm × 4.6 mm cartridge, YMC, Germany) was used to separate 19 amino acids according to the protocol described by Chaimbault et al. (2000). Thus, glycine, serine, alanine, threonine, asparagine, cysteine, aspartic acid, proline, histidine, arginine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, glutamine, glutamic acid, valine, lysine, methionine and leucine/isoleucine isomers (impossible to differentiate due to their identical retention time and MS² fragmentation patterns). Mobile phases consisted in a

mix of water modified with nonafluoropentanoic acid (20 mM) (Phase A) and pure acetonitrile (HPLC-S Gradient Grade) (Phase B). Separation of compounds of interest was achieved, with a first linear gradient from 0% to 70% of B for 50 min and then a second linear gradient from 70% to 100% of B for 6 min. The flow rate was set at $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and the injection volume was set at $16 \mu\text{L}$. The retention times of amino acids in complex mixtures were first validated thanks to MS2 screening and then the quantitative analyses were routinely performed in MS full scan mode (from 70 to 300 m/z), thereby allowing the screening of parent ions corresponding to mono-protonated form $[\text{M}+\text{H}]^+$. Mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage was set at 4.5 kV; source gases were set (in arbitrary units min^{-1}) for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 20, 5 and 5, respectively; capillary temperature was set at $250 \text{ }^\circ\text{C}$; capillary voltage at -16 V; tube lens, split lens and front lens voltages at 50 V, -60 V and -5.75 V, respectively. Ion optics parameters were optimized in ESI⁺ mode by automatic tuning using a standard solution of norleucine at $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ infused in mobile phase (A/B: 50/50) at a flow rate of $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. External calibration curves were plotted from 0.0003 to $0.03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for both rhizodeposit solutions.

An additional semi-quantitative analysis of rhizodeposit was performed using GC-MS system following a protocol adapted from Luo et al. (2014). A 1 mL volume of the concentrated solution in ACN was added to a GC-MS-compatible-vial, then blown to dryness under a nitrogen flow; after which the dry residue was suspended in 1 mL of n-hexane ($\geq 95 \%$). Samples were derivatized with 40 mL of methoxyamine hydrochloride ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in pyridine 99+%, 2 h, $37 \text{ }^\circ\text{C}$) and 70 mL N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA, 30 min, $37 \text{ }^\circ\text{C}$). The GC-MS system consisted of gas chromatography (7890A, Agilent Technologies, USA) coupled with a mass spectrometer (5975C, Agilent Technologies, USA) equipped with an electron ionization source (EI) and a Gerstel MPS autosampler. A DB-5MS capillary column ($25 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.251 \text{ m}$) from Agilent J&W (Agilent Technologies, USA) was used. The injection was performed in splitless mode with $1 \mu\text{L}$ of samples at $230 \text{ }^\circ\text{C}$. The carrier gas (helium) flow rate was $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The column temperature was held for 2 min at $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 13 min ramp to $180 \text{ }^\circ\text{C}$ and held for 5 min, 14 min ramp to $250 \text{ }^\circ\text{C}$ and 10 min at $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Interface and ion-source temperatures were respectively adjusted to 250 and $220 \text{ }^\circ\text{C}$. Mass spectra were recorded at $2.66 \text{ scans}\cdot\text{s}^{-1}$ with a m/z 50–600 scanning range.

2.7. Data processing

Raw GCMS signals were processed on MassHunter Workstation software (Qualitative Analysis, v. B.06.00, Agilent Technologies) after chromatogram deconvolution. Spectra were

compared with two search unit mass libraries: NIST 14 (NIST Mass Spectral Library) and Wiley 275 (Wiley Online Library). Compounds were identified when similarities were greater than 70%. Then, chromatograms were integrated using MassHunter Workstation software (Quantitative Analysis, v. B.07.00, Agilent Technologies). LCMS signals were processed using XCALIBUR software program (v. 2.1). All biochemical or compound contents were expressed per gram of dry root.

For statistical analyses, data were tested for the normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett test) for $p < 0.05$. In case of normality and homoscedasticity, a one-way ANOVA and the Tukey's HSD (Honestly Significant Difference) test were used to compare means (Test 1). Alternatively, the Kruskal-Wallis' method followed by the Fisher's LSD (Least Significant Difference) test was used (Test 2). The principal component analysis (PCA) was performed using the FactomineR package (v.1.34) and the graphic as well as the confidence ellipses with a confidence interval of 95% were edited using the Factoshiny package (v1.0). Data were analysed using R Studio (v. 3.4.4).

3. Results and discussion

3.1. Plant response to phenanthrene

All the plants survived until the end of the experiment and visually, they did not show any toxic foliar symptoms. However, dry leaf biomass decreased with PHE exposure as well as dry stem biomass (Table 6). Leaf biomass tended to decrease from the first level of PHE, but this reduction became significant at 100 mg PHE.kg⁻¹ (-32%). Stem biomass followed the same gradual trend with a decrease of -27%, -40% and -42% respectively for the modalities 25, 50 and 100 mg PHE.kg⁻¹ compared to the control. On the other hand, dry root biomass did not seem impacted by the presence of PHE. These trends were confirmed by an increasing root to shoot ratio, which was significant from the 50 mg PHE.kg⁻¹ treatment. This trend has already been witnessed in the case of equivalent PHE exposure (Dupuy *et al.*, 2016). These symptoms appeared as water-stress type response for PAH and/or fuel oil hydrocarbon exposure (Adam & Duncan, 2002; Langer *et al.*, 2010; Merkl *et al.*, 2005). Metallic stress could also affect plant biomass allocation (Dupuy *et al.*, 2016; Lapie *et al.*, 2019; Rellán-Álvarez *et al.*, 2006a). In the same way, PHE exposure at low concentration (10 mg.kg⁻¹) on sorghum, corn and red beans did not cause any significant effects on plant survival and growth while a higher level of exposure (100 mg PHE.kg⁻¹) inhibited accumulation of shoot and root biomass (Baek *et al.*,

2004; Muratova *et al.*, 2009). The biomass of rice submitted to PHE and PYR also showed no significant decrease below 200 mg.kg⁻¹ (Li *et al.*, 2008).

Root surface area seemed to slightly and non-significantly decrease in contrast to leaf area. The latter decreased gradually with PHE exposure and the reduction was significant from 50 mg PHE.kg⁻¹. The decrease in root surface was more visible in other species like *Sorghum bicolor*, whose root surface decreased significantly at 100 mg PHE.kg⁻¹ (Muratova *et al.*, 2009).

Photosynthesis, measured by CO₂ exchange on the 7th leaf, increased from the first PHE exposure concentration and this increase reached +155% of the control for the highest exposure. Generally, PHE exposure induces a decrease in photosynthesis (Clijsters & Van Assche, 1985; Küpper *et al.*, 2002, 2007; Liu *et al.*, 2009b; Oguntimehin *et al.*, 2008), but at low PAH concentrations, chlorophyll content could be enhanced. Li *et al.* (2008) already observed this phenomenon on rice submitted to PHE and PYR at concentrations below 200 mg.kg⁻¹. This could be explained by an increasing SOD activity, which has a role in protecting photosynthetic apparatus, such as chloroplast. Chloroplast are usually exposed to various reactions producing oxygen free radicals (Halliwell, 1984; Li *et al.*, 2008; Monk *et al.*, 1989).

Total biochemical analysis measured on roots gave the concentration in amino acids, proteins and carbohydrates, expressed per gram of dried tissues (Table 6). Amino acid content in roots increased with PHE exposure and this increase was significant for the 100 mg PHE.kg⁻¹ modality, whose concentration in amino acids was twice that of the control. Proline is a well-known example of amino acid increase. Indeed, in the presence of abiotic stress like drought, salinity, heavy metal or PAH presence, proline as well as amino acid contents generally increase in plant tissue, resulting in a better tolerance of these stresses (Ashraf & Foolad, 2007; Costa & Spitz, 1997; Gargallo-Garriga *et al.*, 2018). Exposure to PYR induced a significant increase of proline content in leaves and roots of *Kandelia candel* from 13 mg PYR.kg⁻¹ (Song *et al.*, 2011). Concerning proteins, their content in our samples was stable except for the 50 mg PHE.kg⁻¹ modality, where their presence decreased significantly. Carbohydrate content in roots was also stable in spite of PHE exposure. Li *et al.* (2008) observed the same trend on rice, for which no significant impact of PHE and PYR was visible, even at high concentrations (400 mg.kg⁻¹).

In this experiment, even if no foliar symptoms were visible, plants appeared to be affected by PHE exposure at a biochemical and physiological level, thereby confirming that plant function

modifications always appear before morphological alterations (Alkio *et al.*, 2005; Muratova *et al.*, 2009; Radetski *et al.*, 2000).

Table 6. Maize plant characteristics (mean values \pm standard deviation) according to the different level of phenanthrene (PHE) exposure. R/S: root to shoot biomass ratio. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different ($n = 5$, $p = 0.05$).

PHE level (mg.kg ⁻¹)	Organ	Test	0	25	50	100
Biomass (g FW)	Leaf	1	2.57 \pm 0.37 a	2.46 \pm 0.30 ab	1.91 \pm 0.57 ab	1.76 \pm 0.30 b
	Stem	1	1.86 \pm 0.26 a	1.36 \pm 0.20 ab	1.11 \pm 0.43 b	1.08 \pm 0.33 b
	Root	1	1.80 \pm 0.40 a	1.98 \pm 0.43 a	2.36 \pm 1.09 a	1.71 \pm 0.71 a
R/S ratio		2	0.40 \pm 0.05 c	0.51 \pm 0.06 bc	0.78 \pm 0.30 a	0.62 \pm 0.25 ab
Surface area (cm ²)	Leaf	2	718 \pm 27 a	698 \pm 48 a	549 \pm 155 b	518 \pm 83 b
	Root	1	1109 \pm 143 a	1090 \pm 222 a	1160 \pm 274 a	840 \pm 151 a
Photosynthetic activity ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	7 th leaf	1	3.71 \pm 0.45 b	5.74 \pm 1.86 ab	5.44 \pm 1.95 ab	7.06 \pm 1.58 a
Amino acids (mg.g ⁻¹ DW)	Root	1	2.66 \pm 1.02 b	2.79 \pm 1.49 ab	4.65 \pm 2.55 ab	5.78 \pm 1.33 a
Proteins (mg.g ⁻¹ DW)		1	3.85 \pm 1.26 a	4.28 \pm 0.63 a	1.94 \pm 0.67 b	3.99 \pm 1.38 a
Carbohydrates (mg.g ⁻¹ DW)		1	161.72 \pm 45.08 a	149.84 \pm 23.87 a	130.73 \pm 42.53 a	144.61 \pm 53.81 a

3.2. Influence of PHE on total carbon, carbohydrate, amino acid and protein in rhizodeposit solutions

Total carbon in rhizodeposit solutions corresponded to organic carbon because inorganic carbon was negligible in our samples. Carbon content was not significantly affected by PHE in either rhizodeposit solution, even if its content seemed to increase in the diffusate solution and to decrease in the rhizospheric sand extract (Table 7). The average concentration of organic carbon was respectively 1.99 mg.g⁻¹ and 2.76 mg.g⁻¹ for the diffusate solution and the rhizospheric sand extract (values are expressed per gram of dry root). In the same way, carbohydrate emission in both diffusate solution (0.64 mg.g⁻¹ on average) and rhizospheric sand extract (6.79 mg.g⁻¹) was not significantly modified by PHE exposure. Even if results were not significant, carbohydrates tended to increase in the diffusate solution as well as in the rhizospheric sand extract. These results could be correlated with the increase in photosynthesis activity. In fact, about 17% of net carbon fixed by photosynthesis is emitted by the roots as rhizodeposits

(Nguyen, 2003). Therefore, it is likely that the amount of carbon lost by rhizodeposition is dependent on photosynthesis.

Reflecting the nitrogen metabolism, proteins and amino acids in the diffusate solution also increased (respectively +60% and +50% for the 100 mg PHE.kg⁻¹ exposure) with PHE exposure in a non-significant way. Yet, opposing trends were visible in the rhizospheric sand extract. Indeed, amino acid decreased significantly from the 50 mg PHE.kg⁻¹ modality and proteins did not seem to be impacted by PHE exposure. Proteins are mostly composed of enzymes like peroxidase or oxidoreductase (Uren, 2007). Mucilage proteomes of maize have already been identified; being involved in cell wall metabolism, nutrient acquisition, scavenging of reactive oxygen species or stress response (Ma *et al.*, 2010). Even when the plant is not submitted to abiotic stress, it emits heat shock proteins in the rhizosphere, and their quantity can be modified in presence of PHE, thereby affecting the total protein emission.

Table 7. Total carbon, carbohydrate, amino acid and protein mean content in the two rhizodeposit solutions of maize according to the phenanthrene (PHE) exposure level (\pm standard deviation). Expressed in mg of metabolite per g of dry root. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different ($n = 5, p = 0.05$).

Compound nature		Test	Diffusate solution				Test	Rhizospheric sand extract			
			(per hour)					0	25	50	100
PHE level	mg. kg ⁻¹		0	25	50	100		0	25	50	100
Total carbon	mg. g ⁻¹	1	1.66 \pm 0.50 a	2.02 \pm 0.27 a	2.06 \pm 0.66 a	2.23 \pm 0.83 a	1	2.91 \pm 0.77 a	3.57 \pm 0.66 a	2.18 \pm 0.75 a	2.23 \pm 1.06 a
Carbohydrate	mg. g ⁻¹	2	0.28 \pm 0.05 a	0.79 \pm 0.52 a	0.60 \pm 0.19 a	0.90 \pm 0.58 a	1	4.41 \pm 1.93 a	8.93 \pm 4.64 a	7.56 \pm 3.00 a	6.25 \pm 5.72 a
Amino acid	mg. g ⁻¹	1	0.016 \pm 0.008 a	0.015 \pm 0.008 a	0.020 \pm 0.016 a	0.024 \pm 0.008 a	1	0.176 \pm 0.065 ab	0.261 \pm 0.050 a	0.079 \pm 0.034 b	0.135 \pm 0.074 ab
Protein	mg. g ⁻¹	2	0.005 \pm 0.002 a	0.007 \pm 0.003 a	0.008 \pm 0.008 a	0.009 \pm 0.003 a	1	0.068 \pm 0.010 a	0.052 \pm 0.010 a	0.058 \pm 0.033 a	0.074 \pm 0.031 a

The composition of the rhizodeposit solutions match those cited in previous works. Indeed, the main families of compounds found in exudates are sugars, amino and organic acids, but also lower quantities of proteins and alcohols, which correspond to compounds determined in our diffusate solution (Grayston *et al.*, 1997; Neumann & Röhmheld, 2000; Nguyen, 2003; Uren, 2007). Indeed, Boeuf-Tremblay *et al.* (1995) measured total carbohydrates from root exudates of maize and obtained an average concentration of 0.20 mg.g⁻¹.h⁻¹ while in our experiment, these values were comprised between 0.28 to 0.90 mg.g⁻¹.h⁻¹. They also measured a 0.070 mg.g⁻¹.h⁻¹ average concentration of amino acids, while in our study, these values lay between 0.015 and 0.024 mg.g⁻¹.h⁻¹. Concerning proteins, Muratova *et al.* (2009) measured total proteins in root exudates from plants exposed to 10 and 100 mg PHE.kg⁻¹. However, contrarily to our experiment, they observed a decrease in protein secretion, even if enzymatic activities like

oxidoreductases tended to increase. In their experiment, they used sorghum and it is well-known that plant exudation can vary from one species or a variety to another (Aulakh *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2001). Regarding the mucilage matrix, this is composed of 95% (w/w) polysaccharides and 5% (w/w) protein (Bacic *et al.*, 1986; Harris & Northcote, 1970). Accordingly, in our rhizospheric sand extracts, the main compound family was carbohydrates, which includes mono and polysaccharides, representing almost 95% (w/w) of total biochemical compounds measured. Proteins and amino acids represented respectively 1.5% and 3.8% (w/w) of the measured compounds.

3.3. Influence of PHE on diffusate solution composition

In the diffusate solution, we were able to determine three saccharides: fructose, glucose, and cellobiose (Table 8). Xylose and sucrose were detected below the limit of quantification (LOQ) and rhamnose, mannose and mannitol were below the limit of detection (LOD). The most abundant saccharide in the diffusate solution was fructose, with concentrations from 44 to 129 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, followed by glucose (from 5 to 10 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and by cellobiose, whose concentrations were below 1 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Values were expressed per hour and per gram of dry root. Glucose was not significantly impacted by PHE presence, while fructose and cellobiose content increased significantly even at the lowest PHE exposure level. Fructose was almost three times more concentrated in the highest exposure level than in the control. Cellobiose also gradually increased from 0.171 for the control to 0.564 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ for the highest PHE exposure. To our knowledge, only one other study was dedicated to the impact of PAHs on rhizodeposit composition and especially on root exudates (Muratova *et al.*, 2009). They witnessed a rise in sugar content (fructose, glucose, maltose and galactose) on sorghum, significant for maltose, but only at low PHE exposure (10 $\text{mg PHE}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Twelve amino acids were above the LOQ: glycine, serine, alanine, threonine, histidine, arginine, phenylalanine, tyrosine, glutamic acid, valine, lysine, and leucine (Table 8). Cysteine was not detected and asparagine, aspartic acid, proline, tryptophan, glutamine and methionine were below the LOQ. Lysine and leucine were the most abundant amino acids in the diffusate solution with an average concentration of, respectively, 1.05 and 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Most amino acids, including alanine, threonine, arginine, phenylalanine, tyrosine, glycine, serine and leucine gradually and significantly increased with PHE exposure. For example, threonine was six times more concentrated for the highest PHE exposure (0.67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) than for the control (0.11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Histidine content remained stable over PHE exposure, with a mean concentration of 0.11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, while glutamic acid and lysine decreased with increasing PHE

exposure. This is not in line with the study of Muratova et al. (2009), in which amino acid contents were not significantly affected by PHE exposure.

In the diffusate solution, 16 compounds were analyzed by GCMS. Their contents are shown, in Table 8, as a logarithm of the peak area measured in arbitrary unit per gram of dry root. Half of these were organic acids like pyruvic, lactic, caproic, oxalic, 3- hydroxybutanoic, malonic, succinic and nonanoic acid (Table 8). Four were alcoholic compounds: heptanol, glycerol, dodecanol and ethanolamine, which is an alcohol amine. Two fatty acids were also found, namely palmitic and stearic acid, as well as two monoglycerides, i.e. 1-monopalmitin and 1-monostearin. The emission of almost half of these compounds was not significantly affected by the presence of PHE. On the contrary, the exudation of oxalic, pyruvic, lactic, 3-hydroxybutanoic, succinic acid and 1-monopalmitin decreased significantly as PHE exposure increased, from the 50 mg PHE.kg⁻¹ treatment, while the 25 mg PHE.kg⁻¹ treatment did not seem to differ from the control. Ethanolamine, malonic and nonanoic acid emission decreased significantly until 50 mg PHE.kg⁻¹ exposure but increased in the highest PHE treatment. In their experiment, Muratova et al. (2009) did not observe any significant differences in organic acid exudation of Sorghum (expressed per unit of root surface) between PHE treatments. Nevertheless, increasing sugar and organic acids exudations as a response to abiotic stress was observed for other stresses. In the hydroponic experimentation, Song et al. (2012) showed that maize exuded more organic acids (malic, lactic, citric or maleic acid) under water-stress conditions. Likewise, Preece and Peñuelas (2016) showed an increased sugar root exudation per gram of plant biomass under moderate drought. The increase in these soluble compounds could be related to osmotic regulation, triggered to support survival in such water-stress conditions. Indeed, as with hydrophobic compounds, PAHs could alter the water dynamics and transportation due to their hydrophobic characteristics and therefore act as a drought agent.

Table 8. Metabolite profiling (mean values, related to root dry weight \pm standard deviation) in diffusate solution of maize according to the phenanthrene (PHE) exposure level. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different ($n = 5, p = 0.05$).

Compounds		Unit	Test	PHE per kg of dry sang (mg.kg ⁻¹)			
				0	25	50	100
Monosaccharide	Fructose	$\mu\text{g.g}^{-1}$ (per hour)	2	43.75 \pm 12.67 b	115.42 \pm 50.56 a	92.74 \pm 12.95 a	128.97 \pm 79.60 a
	Glucose		2	7.06 \pm 1.14 a	10.25 \pm 7.64 a	4.96 \pm 2.86 a	8.92 \pm 6.13 a
Disaccharide	Cellobiose		2	0.17 \pm 0.07 b	0.33 \pm 0.18 ab	0.29 \pm 0.06 ab	0.56 \pm 0.40 a
Amino acid	Glycine		2	0.33 \pm 0.12 b	0.56 \pm 0.23 ab	0.40 \pm 0.11 b	0.99 \pm 0.50 a
	Serine		2	0.23 \pm 0.09 b	0.41 \pm 0.13 ab	0.39 \pm 0.15 ab	1.07 \pm 0.96 a
	Alanine		2	0.29 \pm 0.11 b	0.48 \pm 0.10 ab	0.45 \pm 0.19 ab	1.15 \pm 0.93 a
	Threonine		2	0.11 \pm 0.04 c	0.30 \pm 0.15 b	0.21 \pm 0.08 b	0.67 \pm 0.33 a
	Histidine		2	0.11 \pm 0.02 a	0.08 \pm 0.01 a	0.11 \pm 0.08 a	0.12 \pm 0.09 a
	Arginine		2	0.26 \pm 0.09 b	0.35 \pm 0.10 ab	0.40 \pm 0.10 ab	0.98 \pm 0.76 a
	Phenylalanine		2	0.30 \pm 0.09 b	0.41 \pm 0.26 ab	0.41 \pm 0.33 ab	0.83 \pm 0.49 a
	Tyrosine		2	0.19 \pm 0.06 b	0.27 \pm 0.17 ab	0.26 \pm 0.20 ab	0.49 \pm 0.29 a
	Glutamic acid		2	1.30 \pm 0.39 a	0.24 \pm 0.07 c	0.41 \pm 0.15 b	0.58 \pm 0.41 b
	Valine		2	0.69 \pm 0.21 a	0.29 \pm 0.10 b	0.43 \pm 0.32 ab	0.87 \pm 0.80 ab
	Lysine		1	1.29 \pm 0.22 ab	1.42 \pm 0.46 a	0.75 \pm 0.17 bc	0.65 \pm 0.48 c
	Leucine	2	0.69 \pm 0.17 b	0.86 \pm 0.15 ab	0.84 \pm 0.27 ab	2.33 \pm 1.89 a	
Monoglyceride	1-Monopalmitin	$\text{Log(pic area.g}^{-1}\text{)}$	2	5.86 \pm 5.48 a	5.79 \pm 5.58 a	5.05 \pm 4.80 b	5.38 \pm 5.12 b
	1-Monostearin		1	5.49 \pm 4.77 a	5.45 \pm 4.89 a	5.39 \pm 5.31 a	5.46 \pm 5.15 a
Fatty acid	Palmitic Acid		1	5.53 \pm 5.13 a	5.58 \pm 5.01 a	5.42 \pm 5.12 a	5.48 \pm 5.11 a
	Stearic acid		1	5.64 \pm 5.03 a	5.75 \pm 5.04 a	5.59 \pm 5.36 a	5.71 \pm 5.32 a
Organic acid	Pyruvic acid		2	5.44 \pm 4.41 b	5.72 \pm 5.40 a	4.28 \pm 4.17 c	4.82 \pm 4.64 c
	Lactic acid		2	5.72 \pm 5.73 ab	5.71 \pm 5.48 a	4.95 \pm 4.47 b	5.44 \pm 5.07 ab
	Caproic acid		1	5.67 \pm 5.50 a	5.67 \pm 5.56 a	5.19 \pm 5.23 a	5.68 \pm 5.60 a
	Oxalic acid		2	6.50 \pm 6.18 a	6.64 \pm 6.34 a	4.48 \pm 3.71 c	4.79 \pm 4.28 b

Compounds		Unit	Test	PHE per kg of dry sang (mg.kg ⁻¹)			
				0	25	50	100
	3-hydroxybutanoic acid		2	4.98 ± 4.83 a	4.88 ± 4.42 a	4.25 ± 4.11 b	4.33 ± 3.93 b
	Malonic acid		2	5.63 ± 5.32 ab	5.51 ± 4.89 b	5.36 ± 4.64 c	5.73 ± 4.48 a
	Succinic acid		2	6.52 ± 5.81 a	6.44 ± 6.10 a	4.88 ± 4.11 c	5.22 ± 4.37 b
	Nonanoic acid		1	4.69 ± 4.33 ab	4.69 ± 4.28 ab	4.44 ± 4.26 b	4.85 ± 4.57 a
Alcohol	Heptanol		2	5.42 ± 5.33 a	5.48 ± 5.33 a	4.84 ± 4.15 a	5.32 ± 4.98 a
	Glycerol		1	6.52 ± 5.81 a	6.44 ± 6.10 a	6.30 ± 5.87 a	6.47 ± 6.00 a
	1-Dodecanol		2	4.82 ± 4.71 a	4.68 ± 4.53 a	4.49 ± 4.08 a	4.79 ± 4.28 a
Alcohol amine	Ethanolamine		2	5.58 ± 5.50 ab	5.15 ± 5.08 b	5.36 ± 4.63 ab	5.73 ± 4.48 a

Several compounds found in our diffusate solutions have already been studied for their involvement in PAH dynamic, whether directly or indirectly. Organic acids including acetic, oxalic, tartaric and citric acids measured in our samples, associated to surfactants, were found to enhance the desorption of PHE from soil into aqueous phase. Combining a surfactant with organic acids enabled a higher desorption of this PAH than that of the surfactant alone (An *et al.*, 2011). Moreover, some microorganisms could produce biosurfactants like glycolipids or rhamnolipids, which are able to improve the bioavailability of PAHs and consequently, render them more easily degraded (Deziel *et al.*, 1996). We did not measure the number of microorganisms present in the rhizosphere and in the rest of the sand, but in many studies, the number of microorganisms in the rhizosphere was higher than that of the bulk soil (Gray & Williams, 1971; Osorio Vega, 2007a). Indeed, root exudates are known to be chemoattractant. Moreover, most of them, like sugars (glucose, fructose, sucrose, trehalose), amino acids (arginine) organic acids (malate, citrate, oxalate, aspartate), are easily-degradable compounds which are used as nutritive substrate for microflora (Grayston *et al.*, 1997; Heinrich & Hess, 1985; Reinhold *et al.*, 1985; Tian *et al.*, 2017). In the diffusate solution, glucose and fructose are respectively present at concentrations of approximately 8 and 31 µg.g⁻¹.h⁻¹ and could have strong chemoattractive abilities. Indeed, *Escherichia coli* is able to respond to a chemotactic signal < 10 nM of glucose (Lux *et al.*, 1999).

3.4. Influence of PHE on composition of rhizospheric sand extracts

The rhizospheric sand extract contained no mono or disaccharides but only polysaccharides (Table 9). They were analyzed after acid hydrolysis and only glucose monomers were found. Their content decreased significantly with increasing PHE exposure, from 0.043 mg.g⁻¹ for the control to 0.012 mg.g⁻¹ for the highest PHE exposure.

In addition, 11 amino acids were measured in quantities superior to the LOQ: histidine, arginine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, glutamine, glutamic acid, valine, lysine, leucine and methionine (Table 9). Cysteine, glycine, serine, alanine, asparagine, aspartic acid, proline and glutamine were below the LOD and threonine below the LOQ. Arginine and leucine were the most concentrated compounds with a respective average concentration of 0.97 µg.g⁻¹ and 0.94 µg.g⁻¹. Amino acids content in rhizospheric sand extracts decreased significantly with increasing PHE even at the first level of exposure. For example, the tryptophan content decreased by 58% between the control and the 100 mg PHE.kg⁻¹ treatment.

Using GCMS, 20 different molecules were determined in rhizospheric sand extracts. Most of them, precisely seven, were organic acids: sebacic, nonanoic, benzoic, 3- and 4-hydroxybutanoic, lactic and glycolic acid (Table 9). Five alcohols were found (dodecanol, glycerol, 2-ethylhexanol, propanediol and xylitol) as well as five fatty acids, including palmitic, stearic, octanoic, palmitoleic and pentadecanoic acids. Other molecules like monoglyceride (1-monostearin and monopalmitin) and catecholamine were also found. Most of these compounds did not seem significantly impacted by PHE. However, compound contents like 1-monopalmitin decreased significantly in the modalities 25 mg PHE.kg⁻¹ and 50 mg PHE.kg⁻¹, while increasing to the control level in the 100 mg PHE.kg⁻¹ modality. Stearic acid content in rhizospheric sand extract increased gradually and significantly with PHE exposure as did as 4-hydroxybutanoic acid and dopamine. Pentadecanoic acid concentration increased significantly in the 25 mg PHE.kg⁻¹, but was similar to the control for the higher PHE exposures. In contrast, 3-hydroxybutanoic acid content decreased significantly for the two highest PHE exposures.

Table 9. Metabolite profiling (mean values, related to root dry weight \pm standard deviation) in rhizospheric sand extract of maize according to the phenanthrene (PHE) exposure level. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different ($n = 5, p = 0.05$).

Compounds		Unit	Test	Phe per kg of dry sang (mg.kg ⁻¹)			
				0	25	50	100
Hydrolysed polysaccharide	Glucose		2	43 \pm 28 a	22 \pm 9 ab	19 \pm 8 ab	12 \pm 6 b
				Amino acid	$\mu\text{g.g}^{-1}$	1	0.26 \pm 0.07 a
1	0.48 \pm 0.17 a	0.19 \pm 0.10 b	0.12 \pm 0.06 b			0.18 \pm 0.11 b	
1	1.89 \pm 0.52 a	0.68 \pm 0.32 b	0.43 \pm 0.25 b			0.89 \pm 0.65 b	
1	1.39 \pm 0.31 a	0.35 \pm 0.15 b	0.25 \pm 0.16 b			0.69 \pm 0.48 b	
1	0.86 \pm 0.20 a	0.31 \pm 0.17 b	0.18 \pm 0.08 b			0.66 \pm 0.23 a	
1	0.25 \pm 0.06 a	0.07 \pm 0.04 b	0.04 \pm 0.03 b			0.10 \pm 0.08 b	
1	0.14 \pm 0.05 a	0.04 \pm 0.03 b	0.07 \pm 0.04 ab			0.08 \pm 0.07 ab	
1	0.09 \pm 0.02 a	0.06 \pm 0.01 b	0.03 \pm 0.01 b			0.05 \pm 0.02 b	
2	0.44 \pm 0.22 a	0.11 \pm 0.04 b	0.08 \pm 0.05 b			0.07 \pm 0.06 b	
2	1.69 \pm 0.94 a	0.41 \pm 0.11 b	0.40 \pm 0.23 b			1.21 \pm 0.53 a	
2	0.22 \pm 0.04 a	0.06 \pm 0.03 b	0.05 \pm 0.02 b			0.09 \pm 0.07 b	
Monoglyceride	1-Monostearin		1			5.81 \pm 5.64 a	4.87 \pm 4.51 a
	1-Monopalmitin		2	5.72 \pm 5.26 ab	4.36 \pm 3.99 c	4.78 \pm 4.42 bc	5.84 \pm 5.63 a
Fatty acid	Palmitic acid		1	6.19 \pm 5.61 a	6.25 \pm 5.59 a	6.28 \pm 6.04 a	6.44 \pm 5.61 a
	Stearic acid		1	5.86 \pm 5.40 b	5.98 \pm 5.13 ab	6.06 \pm 5.90 ab	6.30 \pm 5.61 a
	Octanoic acid		1	6.01 \pm 5.22 a	5.99 \pm 5.27 a	5.81 \pm 5.26 a	6.07 \pm 5.86 a
	Palmitoleic acid		1	5.05 \pm 4.88 a	5.36 \pm 4.66 a	5.12 \pm 5.07 a	4.84 \pm 4.38 a
	Pentadecanoic acid		1	4.60 \pm 3.98 b	5.09 \pm 4.65 a	4.54 \pm 4.06 b	4.69 \pm 4.36 b
Alcohol	Dodecanol		1	5.35 \pm 4.90 a	5.17 \pm 4.89 a	5.00 \pm 4.81 a	5.21 \pm 4.57 a
	Glycerol		1	6.39 \pm 5.77 a	6.37 \pm 6.21 a	6.50 \pm 6.41 a	6.62 \pm 6.10 a
	Ethylhexanol		2	5.45 \pm 5.43 a	5.20 \pm 4.45 a	5.20 \pm 5.01 a	5.56 \pm 5.05 a
	Propanediol		2	5.37 \pm 5.27 a	5.03 \pm 3.81 a	4.87 \pm 4.17 a	5.10 \pm 5.06 a
	Xylitol		1	4.01 \pm 3.64b a	5.09 \pm 4.95 a	4.85 \pm 4.83 a	4.55 \pm 4.49 a
Organic acid	Sebacic acid		1	5.19 \pm 4.89 a	5.65 \pm 5.47 a	5.61 \pm 5.49 a	5.31 \pm 5.40 a
	Nonanoic acid		2	5.25 \pm 4.73 a	5.34 \pm 4.69 a	5.32 \pm 4.72 a	5.51 \pm 5.52 a
	Benzoic acid		2	5.34 \pm 4.63 a	5.34 \pm 4.89 a	5.26 \pm 5.04 a	6.25 \pm 6.19 a
	4 -Hydroxybutanoic acid		2	5.36 \pm 4.93 b	5.54 \pm 4.89 ab	5.44 \pm 5.12 ab	6.78 \pm 6.53 a
	3-Hydroxybutanoic acid		2	6.65 \pm	6.93 \pm	6.58 \pm	6.45 \pm

Compounds		Unit	Test	Phe per kg of dry sang (mg.kg ⁻¹)			
				0	25	50	100
				6.45 ab	6.37 a	6.17 b	6.27 b
	Lactic acid		1	5.99 ± 5.40 a	6.08 ± 5.56 a	6.08 ± 5.94 a	5.97 ± 5.78 a
	Glycolic acid		2	5.74 ± 5.31 a	5.45 ± 4.96 a	5.63 ± 5.38 a	6.11 ± 6.11 a
Catecholamine	Dopamine		2	5.75 ± 5.42 b	5.88 ± 5.20 ab	5.68 ± 5.44 b	6.82 ± 6.55 a

To our knowledge, there is no other publication relating the influence of PAHs on root mucilage. However, the composition of mucilage is well-known and principally composed of polysaccharides, phospholipids and proteins (Bacic *et al.*, 1987; Chaboud, 1983; Read *et al.*, 2003). Chaboud (1983) found that polysaccharides from maize were mostly composed of galactose, fucose and glucose, while the rhizospheric sand extract analyzed here contained high amounts of polysaccharides mainly composed of glucose chains. The difference might be due to our method, which did not differentiate the glucose from its epimer, the galactose. Moreover, the conditions of Chaboud’s experiment were very different from ours, as they grew the plant and collected the mucilage in sterile conditions on seedlings aged less than a week, while our collection was conducted on non-sterile six-week old plants. Both age and sterility are factors which can modify rhizodeposition (Aulakh *et al.*, 2001; Hodge *et al.*, 1996).

The lipidic composition of the rhizospheric sand extract in our experiment is in agreement with fatty acids measured by Read *et al.* (2003) in maize, lupin and wheat. In their experiment, saturated fatty acids were predominant, especially C16 and C18, while in our study, four out of five fatty acids were saturated (palmitic, stearic, octanoic and pentadecanoic acids) and also three were C16 or C18: palmitic acid (C18), stearic acid (C18) and palmitoleic acid (C16). Fatty acids and glycerol are components of phospholipids, major constituents of mucilage. Phospholipids are also surfactant, i.e. organic compounds consisting of both hydrophobic and hydrophilic components. Those amphipathic molecules are known to affect the behaviours and dynamics of organic pollutants such as PAHs by enhancing their solubilization in water and consequently improving their bioavailability for both plant and microorganisms (Deziel *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2006; Tiehm *et al.*, 1997). However, if small amount of surfactant increases absorption and accumulation of PAH by a plant, higher amounts seem to reduce them (Gao *et al.*, 2006).

3.5. Multivariate approach to the impact of PHE on rhizodeposition

A principal component analysis (PCA, Figure 50) was used to synoptically evaluate the impact of PHE on both rhizodeposit solutions, including the determination of individual compounds performed with LC-MS and GC-MS. When performed with 31 compounds of the diffusate solution (Figure 50 a, b), the PCA first plane explained 53% of the variability (31.8 % for the first component and 21.5% for the second one). The variables which most contributed to the first component were amino acids, fructose and cellobiose, while the second component mostly resulted from the organic and fatty acids (palmitic, caproic, nonanoic, lactic acid, ...) (Figure 50 a). Control replicates and replicates exposed to 25 mg PHE.kg⁻¹ seemed to exude in the same way, with their confidence ellipses being almost superimposed. Replicates exposed to the two highest PHE exposures formed two groups apart from the previous one. Diffusate solutions obtained from plants exposed to 100 mg PHE.kg⁻¹ were positively correlated with fructose, cellobiose and amino acid contents, except glutamic acid and lysine (Figure 50 b). Gargallo-Garriga et al. (2018) observed the same trends with drought stress for amino acids and fructose. They also shown an increase in the abscisic acid (ABA), a phytohormon which mediates an up-regulation of the biosynthesis of amino and organic acids (Li *et al.*, 2017; Ollas *et al.*, 2015). PHE or its downstream products may induce ABA production, or interact with ABA receptors in maize, leading to water-stress responses (Váňová *et al.*, 2009). Conversely, the control or 25 mg PHE.kg⁻¹ treatment were positively correlated with the diffusion of glucose, many organic acids like oxalic or succinic acid, monopalmitin and some alcohols (dodecanol and heptanol), which could be regarded as exudates of an unperturbed plant. In opposition, the 50 mg PHE.kg⁻¹ exposure reduced the content of organic acid, fatty acid and alcohol, testifying to a perturbation of the plant functioning, which might be different to that at 100 mg PHE.kg⁻¹ exposure.

The second PCA (Figure 50 c, d) was performed with 31 compounds of the rhizospheric sand extract. The first plane explained about 56% of the variability, with 34.9% for the first component and 21.2% for the second. The variables most contributing to the first component were amino acids (positively), while some organic acids (lactic, sebacic and 3-hydroxybutanoic acid), fatty acids (pentadecanoic and palmitoleic acid) and xylitol were negatively correlated to this. Other organic acids (benzoic, nonanoic and glycolic acid), fatty acids (octanoic, palmitic and stearic acid), dopamine and glycerol contributed positively to the second component. The pattern in the rhizospheric sand extract compared to the diffusate solution was slightly different. The intermediate exposure concentrations (25 mg PHE.kg⁻¹ et 50 mg PHE.kg⁻¹) had

superimposed ellipses, indicating a similar composition and rhizosphere functioning, while compounds emitted from the control and the 100 mg PHE.kg⁻¹ treatments were distinct both from each other and from those of the two other treatments. This suggests that the highest exposure level favoured the production of monoglycerides and most of the fatty acids, while reducing that of amino acids and hydrolyzed glucose. On the other hand, a small group of compounds like sebacic, lactic, 3-hydroxybutanoic, palmitoleic and pentadecanoic acid and xylitol were more specific to samples exposed to intermediate PHE exposure concentrations.

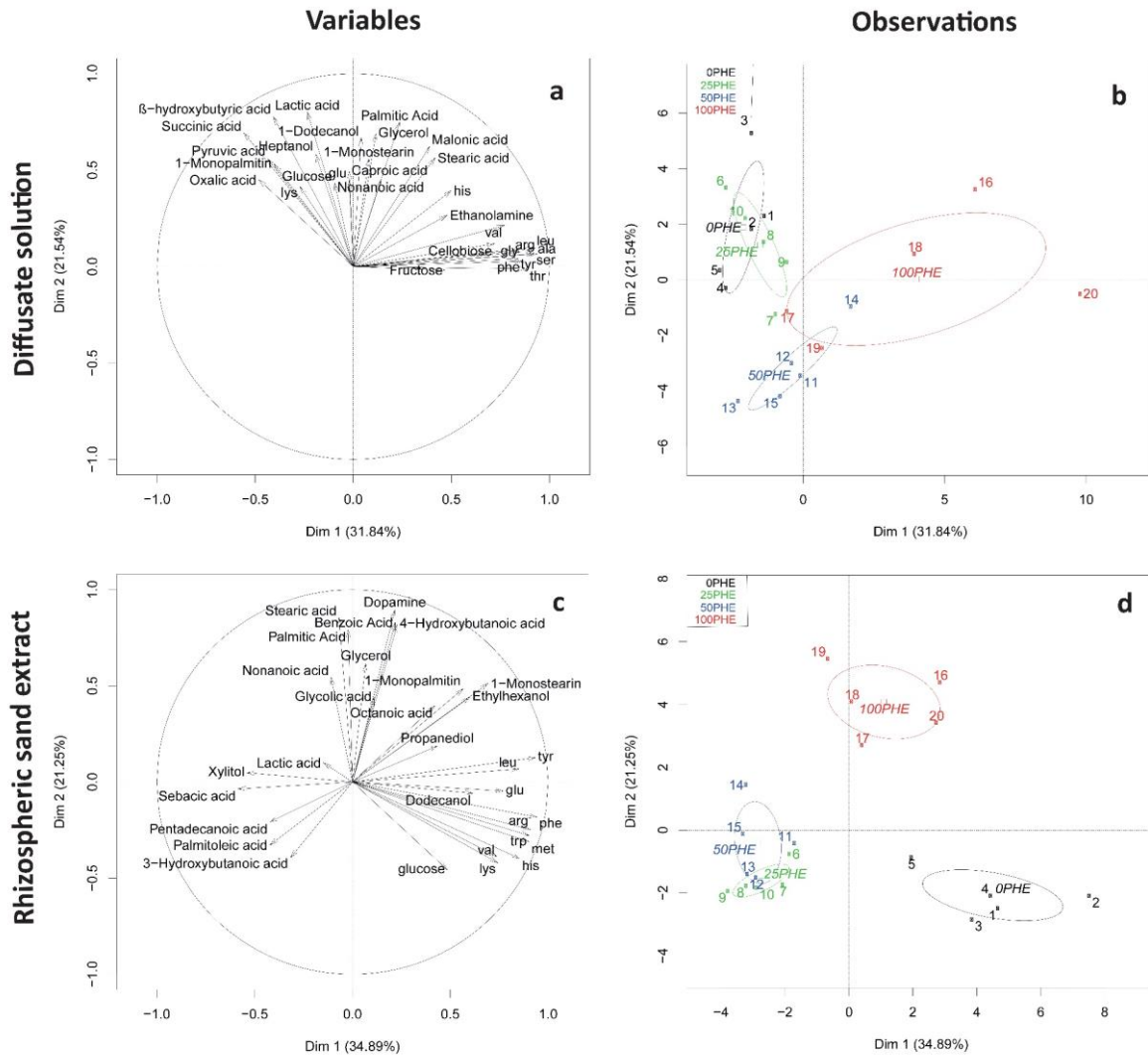


Figure 50. Principal Component Analysis (PCA) generated from all measured compounds in diffusate solution (a, b) and in rhizospheric sand extract (c, d). Points represent the different replicates according to PHE treatments: 0PHE (0 mg PHE.kg⁻¹) correspond to replicates 1, 2, 3, 4 and 5; 25PHE (25 mg phe.kg⁻¹) correspond to 6, 7, 8, 9 and 10; 50PHE (50 mg PHE.kg⁻¹) correspond to replicates 11, 12, 13, 14 and 15; 100PHE (100 mg PHE.kg⁻¹) correspond to replicates 16, 17, 18, 19 and 20. Amino acids are designated according to their three-letter code.

This PCA highlights two levels of response of the rhizodeposition towards PHE. From 0 to 50 mg PHE.kg⁻¹, rhizodeposition seems to be slightly and progressively modified with increasing PHE exposure, but between 50 and 100 mg PHE.kg⁻¹, plants passed a threshold concentration beyond which the plant deeply and significantly modifies its rhizodeposition. Indeed, in the diffusate solution, control plants and plants submitted to concentrations below 50 mg PHE.kg⁻¹ are located in the same axis of the PCA, while plants exposed to the highest PHE concentrations are positioned orthogonally to them. In the same way in the rhizospheric sand extract, the 100 mg PHE.kg⁻¹ modality is placed on an opposite axis compared to the other treatments. The existence of a threshold concentration has already been witnessed in *Sorghum bicolor* submitted to 100 mg PAH.kg⁻¹ with a substantial decrease in the plant biomass and a modification of the rhizodeposits composition. Additionally, this response could also be variable between the diffusate solution and the rhizospheric sand extract, which are emitted and collected differently. The variability between the two rhizodeposit solutions could be explained by the differences in compound transportation in rhizospheres and by the differences between the two collection methods. Indeed, compounds of low molecular weight composing the diffusate solution are generally exuded in the rhizosphere *via* passive diffusion process through plasma membrane while compounds of high molecular weight generally resulting from the rhizospheric sand extract, result in active transportation *via* Golgi vesicles or ATP transporters (Badri & Vivanco, 2009). Moreover, the diffusate solution and the rhizospheric sand extract are collected differently; the first one resulting from a diffusion of six hours, while the second one resulting from five weeks of cultivation. In the first case, the microorganisms did not have the time to consume root exudates while the second solution reflects an equilibrium between root secretion and microorganism consumption during all the cultivation period.

4. Conclusion

Plant functioning was impacted by PHE presence in the substrate, with a decrease in plant biomass and a modification of its allocation, preferably to the root. Molecular composition in tissues was modified as well, essentially with an increase in amino acid content. Rhizodeposition was also affected by PHE exposure. This study brings new information on the metabolic profiling of root exudates and especially on mucilage, which previously had rarely been studied, in the context of organic pollution. The diffusate solution was mainly composed of low molecular weight compounds, such as sugars, amino acids and organic acids while the rhizospheric sand extract principally contained higher molecular weight compounds like polysaccharides or components of phospholipids, but also amino acids. Most compounds of the

diffusate solution tended to increase in presence of PHE and this rise was statistically significant for sugars and amino acids. In the rhizospheric sand extract, most compounds also seemed to be impacted by PHE exposure, except proteins. Amino acid contents decreased significantly in the total and individual analyses, as did the hydrolysed glucose, while most organic and fatty acids increased. Plant functioning under PAH stress has already been compared to its functioning under drought stress, as water stress induces the production of organic acid and amino acid in root exudates as in our diffusate solutions submitted to PHE. These similarities could be explained by the similarity between ABA which accumulates in case of drought stress and PHE downstream products which can act as an ABA-like hormone disruptor.

Données complémentaires

Chapitre 4b.

1. Introduction

En complément de l'article, nous présentons ici des données relatives au fonctionnement du maïs exposé au PHE, en particulier les teneurs en carbone, en azote, en protéines, en acides aminés et en glucides dans les feuilles, les tiges et les racines. Les teneurs données dans l'article correspondent uniquement aux mesures réalisées dans les racines.

Nous présentons également les teneurs de ces mêmes composés retrouvés dans les extraits de sable rhizosphérique, non-rhizosphérique et non-planté, afin d'en déduire des informations sur l'étendue de la rhizosphère et l'action des microorganismes.

2. Résultats

2.1. Impact du phénanthrène sur la physiologie du maïs

La teneur en azote (Figure 51) dans les racines et les tiges tend à augmenter avec l'exposition au PHE, les différences entre traitements n'étant pas significativement différentes. En revanche, dans les feuilles la teneur en azote augmente de façon graduelle et significative dès 25 mg PHE.kg⁻¹. En tenant compte la concentration en azote dans chaque organe et leur biomasse, les quantités d'azotes dans la plante entière varient peu et sont comprises 0.43 et 0.45 g, tous niveaux de pollution confondus. En effet même si la concentration en azote augmente en présence de PHE, comme la biomasse diminue, la quantité d'azote total dans la plante reste stable. L'exposition au PHE ne semble donc pas impacter cette teneur totale en azote. En ce qui concerne les teneurs en carbone dans les organes, ces dernières tendent à diminuer dans les racines et les feuilles avec l'augmentation de l'exposition au PHE et ce de façon significative dans les feuilles. La teneur en carbone (Figure 52) dans les tiges est quant à elle constante. En appliquant le même calcul que pour l'azote, l'exposition au PHE induit une diminution significative du carbone total par plante, de 19.4 à 12.9 g.

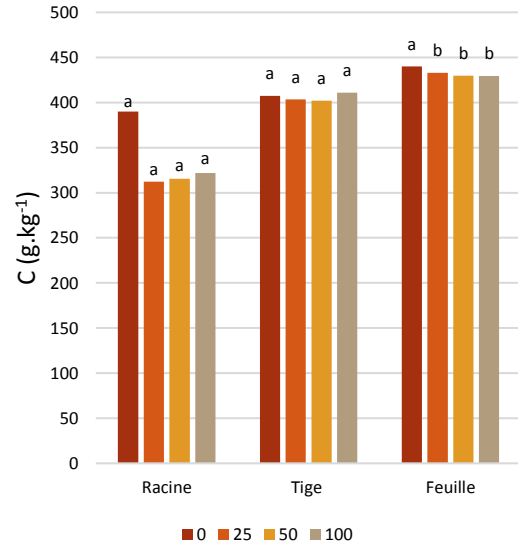
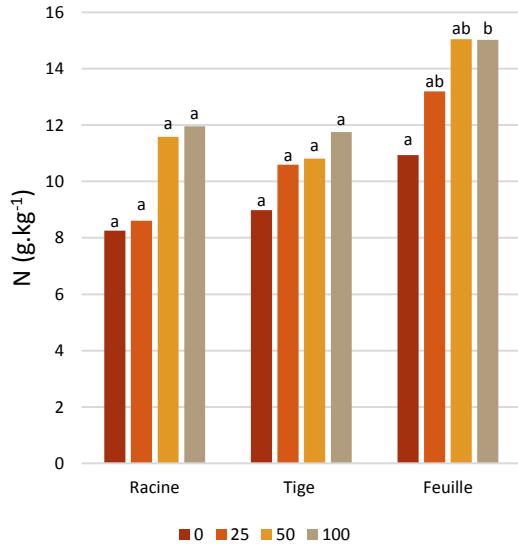


Figure 51 : Teneur en azote dans les différents organes des plants de maïs séchés en fonction de la concentration en PHE dans le substrat.

Figure 52 : Teneur en carbone dans les différents organes des plants de maïs séchés en fonction de la concentration en PHE dans le substrat.

Moyenne, n = 5. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes au seuil de 5 %. Une Anova à un facteur suivie du test post-hoc de Tukey est utilisée ou un test de Kruskal-Wallis suivi du post-hoc de Fisher pour chaque organe.

De même que pour la teneur en azote dans les organes, la teneur en acides aminés totaux (Figure 53) augmente graduellement avec l'exposition croissante en PHE, de façon significative dans les racines et les feuilles. Dans les racines, cette teneur est de 3.6 mg.g⁻¹ pour le contrôle et atteint 7.9 mg.g⁻¹ pour la dernière modalité d'exposition (100 mg.g⁻¹). De même dans les feuilles dont la teneur est de 2.2 mg.g⁻¹ pour le contrôle et de 3.7 mg.g⁻¹ pour la modalité 100 mg.g⁻¹. Les teneurs en protéines (Figure 54) quant à elles diminuent lorsque les plantes sont exposées à des concentrations modérées en PHE (25 et 50 mg PHE.g⁻¹) et sont de niveau équivalente au témoin à une concentration plus importante (100 mg.g⁻¹).

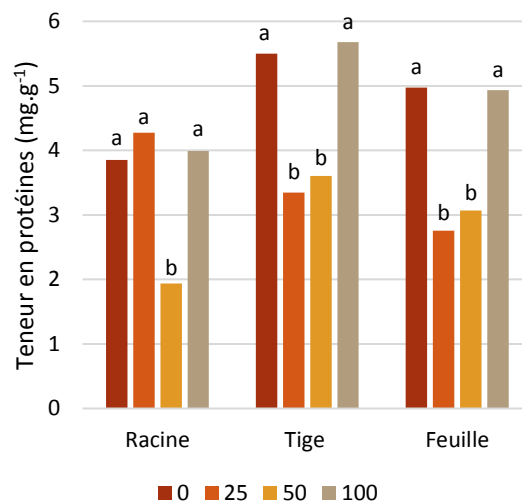
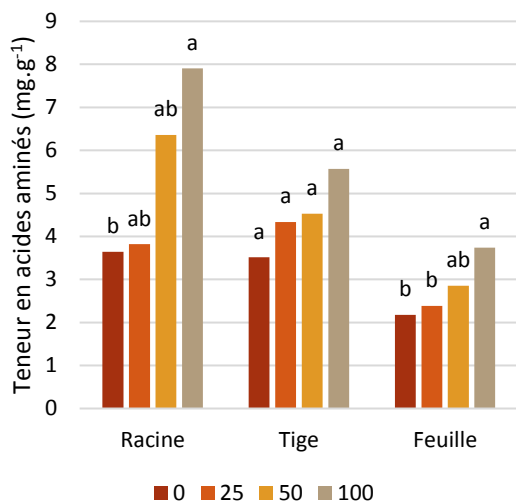
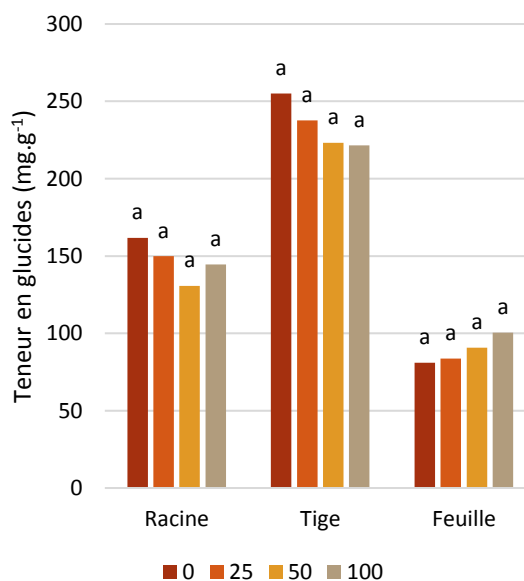


Figure 53 : Teneur en acides aminés (mg.g⁻¹) dans les différents organes des plants de maïs séchés en fonction de la concentration en PHE dans le substrat.

Figure 54 : Teneur en protéines (mg.g⁻¹) dans les différents organes des plants de maïs séchés en fonction de la concentration en PHE dans le substrat.

En revanche, la teneur en glucides (Figure 55) dans les différents organes ne semble pas être affectée par la présence de PHE. Les teneurs moyennes dans les racines, les tiges et les feuilles sont de 147, 234 et 89 mg.g⁻¹.

Figure 55 : Teneur en glucides (mg.g⁻¹) dans les différents organes des plants de maïs séchés en fonction de la concentration en PHE dans le substrat.



Moyenne, n = 5. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes au seuil de 5 %. Une Anova à un facteur suivie du test post-hoc de Tukey est utilisée ou un test de Kruskal-Wallis suivi du post-hoc de Fisher pour chaque organe.

2.2. Les limites de la rhizosphère

Les teneurs en carbone organique (Figure 56) dans les extraits sont équivalentes, qu’il s’agisse du sable rhizosphérique, non-rhizosphérique ou non-planté et sont comprises entre 0.03 et 0.06 mg.g⁻¹. En revanche, lorsqu’on dose les glucides dans les différents extraits (Figure 57), il y a une différence significative entre le sable rhizosphérique et les autres sables quel que soit le traitement. Le premier est très riche en sucre avec une concentration moyenne de 0.11 mg.g⁻¹ contre 0.01 mg.g⁻¹ pour les sables non-plantés et non-rhizosphériques.

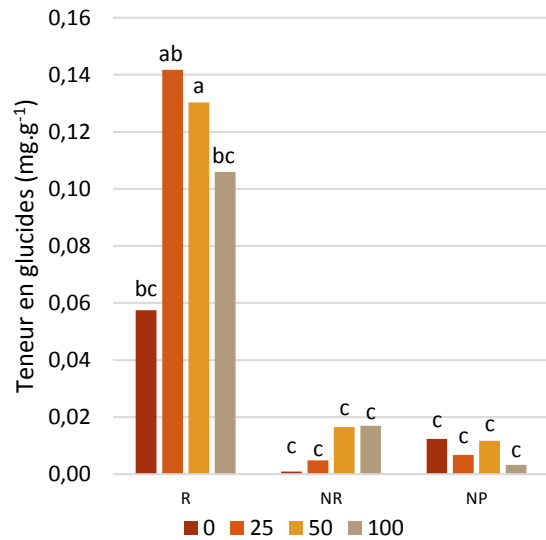
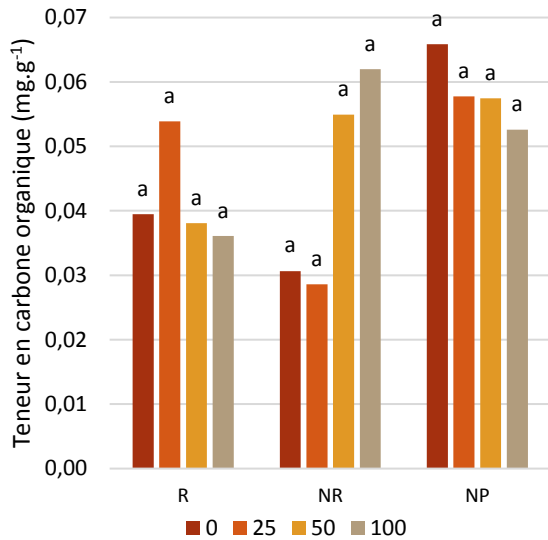


Figure 56 : Teneur en carbone organique dans les solutions d'extraction de sable (mg.g^{-1} de sable) issues de plantes soumises à une exposition croissante en PHE.

Figure 57 : Teneur en glucides dans les solutions d'extraction de sable (mg.g^{-1} de sable) issues de plantes soumises à une exposition croissante en PHE.

R : Rhizosphérique, NR : Non-Rhizosphérique, NP : Non-Planté. Moyenne, $n = 5$. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes pour chaque traitement au seuil de 5 % en utilisant une Anova à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey de comparaisons multiples des traitements et d'un test de comparaison de rang.

De même, pour les acides aminés (Figure 58), le sable rhizosphérique est beaucoup plus concentré que le sable non-rhizosphérique et non-planté. Le premier contient environ $2.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ d'acides aminés tandis que les deux autres en contiennent en moyenne 0.1 et $0.7 \mu\text{g.g}^{-1}$ d'acides aminés, respectivement pour la sable non-rhizosphérique et non-planté. Ces tendances ne sont en revanche pas retrouvées lors du dosage des protéines dans les extraits de sable (Figure 59). Au contraire, la teneur en protéines est inférieure dans le sable rhizosphérique (0.97mg.g^{-1}) par rapport au sable non-rhizosphérique (2.03mg.g^{-1}) ou non-planté (1.88mg.g^{-1}).

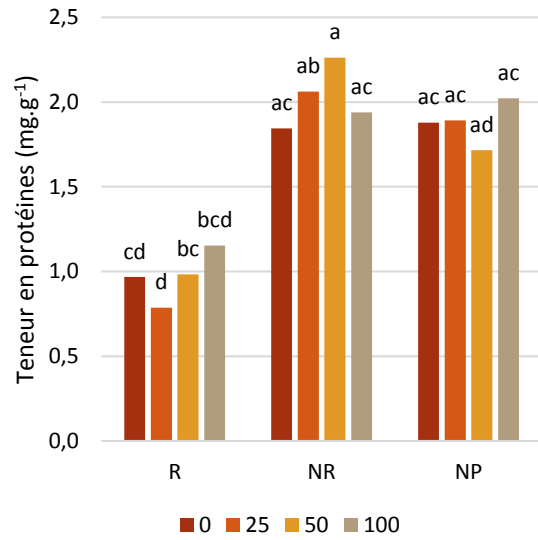
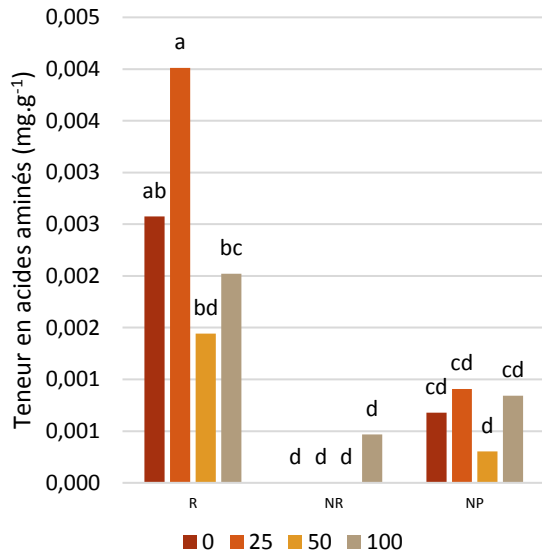


Figure 58 : Teneur en acides aminés dans les solutions d'extraction de sable (mg.g^{-1} de sable) issues de plantes soumises à une exposition croissante en PHE.

Figure 59 : Teneur en protéines dans les solutions d'extraction de sable (mg.g^{-1} de sable) issues de plantes soumises à une exposition croissante en PHE.

R : Rhizosphérique, NR : Non-Rhizosphérique, NP : Non-Planté. Moyenne, $n = 5$. Les différences statistiques significatives sont représentées par des lettres différentes pour chaque traitement au seuil de 5 % en utilisant une Anova à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey de comparaisons multiples des traitements et d'un test de comparaison de rang.

Conclusion et discussion

Impact du PHE sur le fonctionnement du maïs

La teneur en acides aminés augmente dans tous les organes avec l'exposition au PHE. Lors d'un stress comme celui lié à la présence de HAP, la plante produit en quantité plus importante des molécules anti-oxydantes telles que certaines enzymes (peroxydase, catalase, etc.) mais également d'autres composés. Ainsi la production de proline augmente significativement en présence de PYR pour atteindre des concentrations comprises entre 13 et 39 mg proline.kg⁻¹ dans les feuilles et dans les racines (Song *et al.*, 2011). C'est également le cas de la bêtaïne, certains sucres et certains polyalcools qui jouent un rôle dans la tolérance de la plante en cas de stress mais pas uniquement lors d'une pollution organique (Hare & Cress, 1997; Zhang *et al.*, 2007). Chez le riz, soumis à une pollution mixte de PHE et de PYR comprise entre 100 et 400 mg.g⁻¹, les glucides totaux ne sont pas significativement impactés par l'exposition en polluant (Li *et al.*, 2008). De même dans nos échantillons, aucun effet significatif du PHE n'est observé sur la teneur en glucides totaux des plants de maïs. En ce qui concerne la teneur en protéines, celle-ci diminue en présence de faibles concentrations en PHE (25 et 50 mg.kg⁻¹) avant d'augmenter pour la dernière concentration en PHE (100 mg.kg⁻¹). Li *et al.* (2008) ont montré que la teneur en protéines totales du riz tendait à augmenter dès 100 mg HAP.kg⁻¹ et que cette augmentation était significative à 200 mg HAP.kg⁻¹. Le fonctionnement de la plante en présence de HAP est donc sensiblement modifié dès 25 mg PHE.kg⁻¹.

Impact du PHE sur la rhizodéposition du maïs

L'impact du PHE sur la rhizodéposition est résumé dans un schéma, Figure 60. Le PHE ne semble pas affecter de la même manière les exsudats racinaires et les mucilages. En effet, dans la solution de diffusat, la concentration de la plupart des composés semble augmenter : tous les glucides, les acides aminés, le carbone total et les protéines totales. En revanche, les acides organiques et les monoglycérides diminuent significativement. Dans l'extrait de sable rhizosphérique, on observe des tendances antagonistes. Les polysaccharides sécrétés et les acides aminés diminuent significativement tout comme le carbone total tandis que les acides gras et les acides organiques augmentent. Il est difficile de dire si cette hétérogénéité entre les deux solutions vient du mode de collecte des rhizodépôts ou de leur mode de transport. En effet, ces derniers sont issus de deux protocoles distincts de récolte. Les exsudats racinaires de la solution de diffusat proviennent d'une récolte sur un temps très court (6h) et les

microorganismes ne peuvent alors pas dégrader cette solution. En revanche, le mucilage contenu dans l'extrait de sable rhizosphérique résulte de six semaines de culture et a donc été largement soumis aux microorganismes. Dans cette solution, nous obtenons un équilibre entre les émissions de rhizodépôts et leur métabolisation par les microorganismes. Cette différence dans la collecte des molécules pourrait donc en partie expliquer les dissemblances entre les deux solutions. La deuxième hypothèse serait la mise en place par la plante de deux processus distincts d'émissions de rhizodépôts portant sur les molécules rhizodéposées et leur mode de transport à travers la membrane plasmique racinaire. Il serait possible de valider l'une ou l'autre hypothèse en cultivant les plantes dans des conditions stériles.

Du fait du manque de publication sur le sujet, il est difficile de comparer notre étude à celles de la littérature. A notre connaissance, la seule publication traitant de l'effet des HAP sur la rhizodéposition et plus spécifiquement sur l'exsudation est la publication de Muratova et al. (2009). Contrairement à notre étude, ils ont observé une diminution de l'exsudation de protéines par gramme de racine et ce dès 10 mg PHE.kg⁻¹ alors qu'ici les protéines diffusées augmentent lorsque les plantes sont exposées à des concentrations similaires en PHE. Dans leur étude, *Sorghum bicolor* est soumis au PHE, ce qui n'affecte pas les concentrations en acides aminés et en acides organiques exsudés alors que dans notre étude, *Zea mays* exposé au PHE produit plus d'acides aminés et significativement moins d'acides organiques. En revanche, des tendances similaires aux nôtres ont été observées concernant les sucres avec une diminution des monosaccharides tels que le fructose ou le glucose. La différence d'exsudation entre les deux études, pourrait s'expliquer par l'utilisation de deux espèces différentes. En effet, l'espèce influe beaucoup sur la composition des rhizodépôts ainsi que leur quantité (Aulakh *et al.*, 2001; Vranova *et al.*, 2013).

Liens entre fonctionnement de la plante et rhizodéposition

L'activité photosynthétique augmente de façon significative en présence de PHE tandis que le carbone total dans les différents organes stagne dans les tiges voir diminue dans les racines et les feuilles. De même pour la teneur en sucre totaux qui tend à diminuer dans les tiges et les racines exposées au PHE même si elle augmente dans les feuilles. En revanche, l'exsudation de composés carbonés semble plutôt positivement corrélée avec la photosynthèse puisque la quantité de carbone total, de sucres totaux, de mono et de diglycérides augmente de façon significative. Ce n'est en revanche pas le cas des polysaccharides et du carbone total secrété dans les extraits de sable rhizosphérique puisque ceux-ci diminuent significativement.

Concernant les composés azotés, en présence de PHE, la concentration en azote total augmente dans tous les organes. Cette tendance n'est pas forcément corrélée à la teneur en acides aminés et en protéines dans ces mêmes organes. En effet, la teneur en acides aminés augmente dans les tiges et les racines mais pas dans les feuilles tandis que les protéines diminuent en présence d'une faible exposition au PHE avant d'augmenter significativement en présence d'une plus forte exposition au polluant et ce quel que soit l'organe. Cette augmentation de l'azote total dans les organes en présence de PHE coïncide avec une émission plus importante d'acides aminés et de protéines diffusées dans les solutions de diffusat. A l'inverse, dans les extraits de sable rhizosphérique, en présence de PHE on assiste à une diminution significative de la teneur en acides aminés tandis que la sécrétion de protéines est constante.

Nous avons déjà relevé dans le chapitre précédent, une composition biochimique différente entre les rhizodépôts et les organes de la plante. Ces observations nous confortent dans l'idée que la rhizodéposition n'est pas une simple extension du fonctionnement de la plante mais a bien son fonctionnement propre, indépendant des composés dosés dans les différents organes.

Les limites de la rhizosphère

Comme discuté dans le chapitre précédent, les mesures effectuées sur les extraits de sable nous permettent de valider que le sable récolté correspond bien au sable rhizosphérique. Ce dernier contient des teneurs en glucides et en acides aminés nettement supérieures au sable non-rhizosphérique ou non-plantés. Ces derniers ont d'ailleurs des teneurs significativement équivalentes peu importe le composé analysé montrant ainsi que le sable non-planté est très proche du sable non-rhizosphérique. Nous pouvons donc en conclure que dans cette expérience également, le sable adhérent aux racines correspond bien au sable rhizosphérique.

Cependant, nous observons des teneurs en carbone et en protéines plus importantes dans le sable non-rhizosphérique ou non-planté que dans le sable rhizosphérique quelle que soit l'exposition au PHE. Ces teneurs en éléments pourraient être dues à la présence de microorganismes dans la totalité des dispositifs. Cette observation va à l'encontre de ce que nous avons pu observer dans le chapitre précédent où les concentrations en protéines étaient bien plus faibles dans le sable non-rhizosphérique et non-planté que dans le sable rhizosphérique. Pour mieux comprendre ce phénomène il aurait été intéressant d'analyser la biomasse bactérienne dans chacun des dispositifs, dans la rhizosphère mais aussi dans le reste du sable.

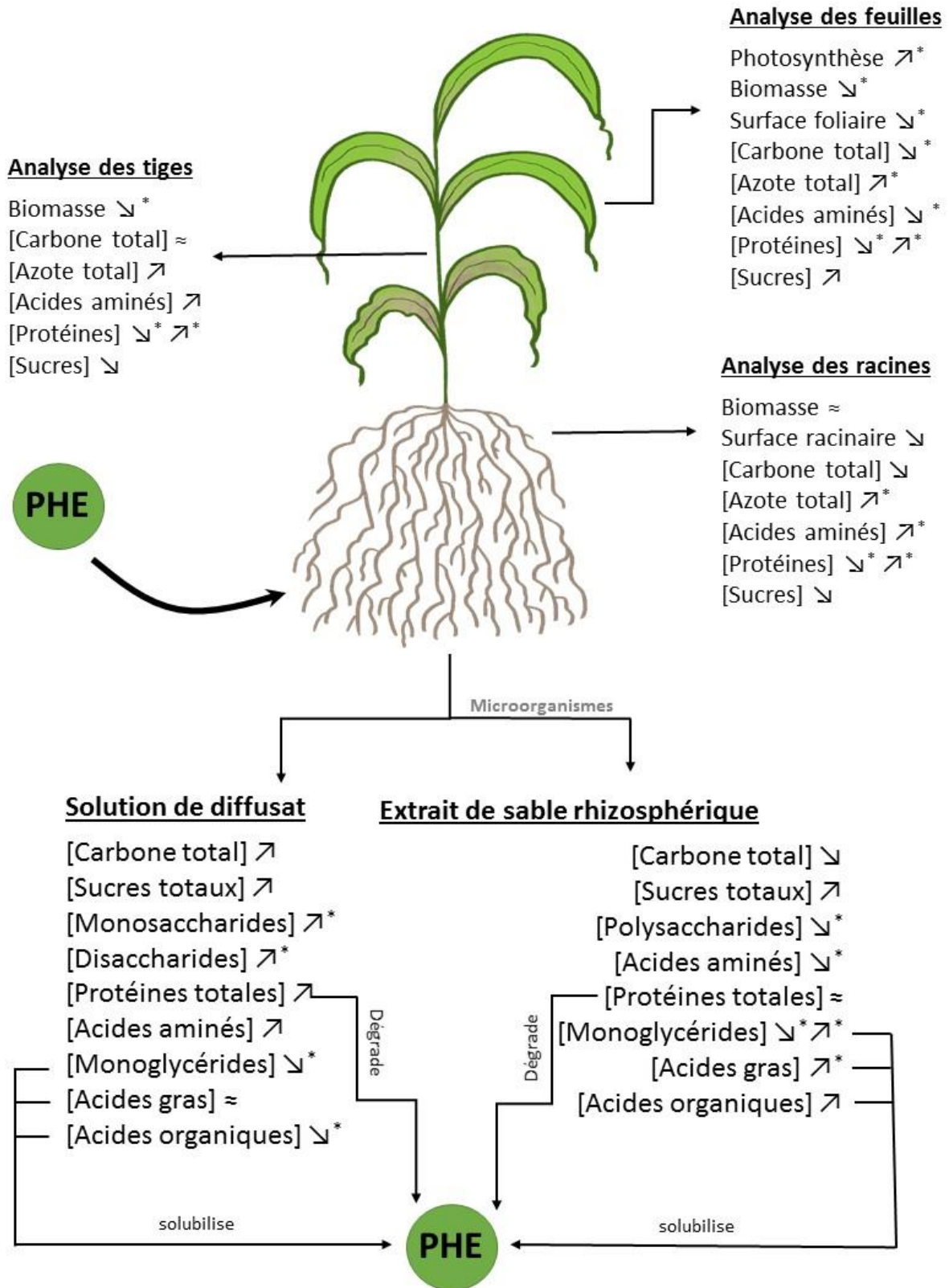


Figure 60 : Schéma récapitulatif de l'impact du PHE sur le fonctionnement de la plante, de la rhizodéposition et ses effets connus sur le PHE. Lorsque la modification est statistiquement significative, un * est apposé.

Chapitre V

Variation de la rhizodéposition selon le stade de développement du maïs soumis à une pollution organique ou métallique

Lors des deux derniers chapitres, nous avons mis en évidence l'impact de polluants organiques ou métalliques sur le fonctionnement rhizosphérique du maïs. La rhizodéposition évolue de manière progressive avec la concentration croissante en polluants avant d'atteindre un seuil au-delà duquel elle est modifiée en profondeur. C'est pourquoi le but premier de la présente expérience est d'évaluer l'impact du PHE et du Cd sur les rhizodépôts mais à des concentrations plus importantes que celles utilisées auparavant afin de mieux analyser la rhizodéposition au-delà du seuil de concentration précédemment observé. De plus, cette évaluation sera faite au cours du temps, durant les premiers stades de développement de la plante, pour mieux comprendre la mise en place de la rhizodéposition dès les premiers jours de l'autotrophie.

Pendant notre expérience, des plants de maïs ont été cultivés en conditions contrôlées sur du sable. Une partie des plants a été soumise à de fortes concentrations en PHE (100 ou 250 mg PHE.kg⁻¹) tandis qu'une autre partie a été exposée à du Cd (40 et 100 µM Cd), enfin une dernière partie est restée non contaminée. Un tiers des plants a été récolté au stade 4 feuilles, un autre tiers au stade 6-feuilles et le dernier au stade 8-feuilles à respectivement 20, 33 et 47 jours après le semis. Le maïs change progressivement de statut nutritionnel en passant de l'hétérotrophie à l'autotrophie entre les stades 3 à 5-feuilles. Comme précédemment, deux types de solutions de rhizodéposition ont été collectées à chaque stade de développement : l'extrait de sable rhizosphérique et la solution de diffusat. L'impact de ces polluants sur le fonctionnement de la plante en général a été mesuré au moyen des analyses morphologiques, des mesures de photosynthèse et des dosages biochimiques d'acides aminés, de glucides et de protéines. Ces mêmes dosages biochimiques ont également été réalisés sur les solutions de rhizodépôts ainsi que des analyses pour quantifier individuellement les acides aminés, les sucres par LC-MS et d'autres molécules organiques de type acides gras ou acides organiques par GC-MS.

Les résultats ont montré un fort impact des deux polluants sur la morphologie et le fonctionnement de la plante avec des fortes diminutions de biomasse et des modifications dans l'allocation de cette biomasse dépendante à la fois de la croissance de la plante et de l'exposition à des polluants. Comme montré dans les chapitres précédents, la présence de Cd ou de PHE influe sur la composition des rhizodépôts et notamment sur les concentrations en sucres, en acides organiques et en acides aminés. De plus, la composition des rhizodépôts change au cours du temps et ses modifications semblent être accentuées par la présence de polluants. C'est

essentiellement la composition en acides organiques et en acides gras qui évolue lorsque les plantes sont exposées à du Cd ou du PHE.

Variation of rhizodeposition according to the development stage of maize submitted to organic or metallic pollution

Clémentine Lapie¹, Thibault Sterckeman¹, Cédric Paris^{2,3}, Pierre Leglize¹

¹Université de Lorraine, Inra, Laboratoire Sols et Environnement, F-54000 Nancy, France

²Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, F-54000 Nancy, France

³Plateau d'Analyse Structurale et Métabolomique, SF4242, EFABA, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

1. Introduction

Pollution is identified as the third biggest threat to soil functioning and affects more than 22 million hectares around the world (FAO & ITPS, 2015; Oldeman, 1991). The majority of soil pollutants are heavy metals (in 35% of the cases), followed by mineral oils (24%) and hydrocarbons (21%) including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in 11% of the polluted soils (EEA, 2014). These compounds, whether organic or metallic, are mostly resulting of anthropogenic sources like industrial or agricultural activities (Abdel-Shafy & Mansour, 2016; Alloway, 2013). Their ubiquity and toxicity for plants and animals is concerning. The most known heavy metals for their dangerousness are lead (Pb), mercury (Hg), chromium (Cr), copper (Cu), nickel (Ni), zinc (Zn) and cadmium (Cd). The last is one of the most dangerous trace metals for all kinds of living beings and is not necessary for any biological function, except for a marine diatom enzyme (Lane *et al.*, 2005; Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999). For humans, it provokes kidney failure and increased risks of cancer (EFSA, 2012). Organic pollutants like PAHs are also well-known for their hazardousness and particularly 16 of them which have been identified due to their mutagenicity including phenanthrene (PHE), pyrene (PYR), naphthalene (NAPH) or benzo(a) anthracene (BaA) (EFSA, 2008; Lerda, 2011; US EPA, 1984). Human absorption of these compounds is partly due to ingestion of contaminated food. Both organic or metallic pollutants can be absorbed by crops *via* their roots and sometimes by their leaves (Clemens *et al.*, 2002; Gao & Zhu, 2004; Zhan *et al.*, 2010). It is necessary to

better understand these mechanisms in order to protect population from chronic exposure. The root uptake of organic compounds like PAHs depends on their affinity for the root plasma membrane and of their bioavailable concentrations in soil (Zhan *et al.*, 2012, 2010). Their bioavailability is mainly governed by sorption and diffusion into organic and inorganic matter (Semple *et al.*, 2003). In the same way, trace metals uptake depends on their sorption on the soil solid phase, and on their concentration and speciation in the aqueous phase, considering that plants only absorb free hydrated metal cations (Lin *et al.*, 2016). For both organic or metallic pollutant dynamics, pH is an important parameter. In case of soil acidification, Cd and other cations uptake is favoured by an increase of Cd^{2+} in the soil solution after its desorption from the solid phase, where it is replaced by protons. Concerning PAHs, their desorption is maximal at a pH around 7-8 and minimal in acidic conditions (Yang *et al.*, 2001). Presence of organic ligands could also modify pollutant bioavailability. Humic compounds, organic acids such as citric, oxalic or malonic acid as well as some amino acids like histidine can chelate trace metals such as Pb, Ni or Cd in soil solution, resulting in a reduction of their uptake into plant tissues (Liao & Xie, 2004; Rauser, 1999; Salt *et al.*, 1999; Schwab *et al.*, 2005). Organic acids can also significantly increase PAHs desorption (Ling *et al.*, 2009; Ouvreard *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2001). In a less effective way than organic acids, some sugars like fructose and amino acids like serine and alanine also desorb PAHs (Sun *et al.*, 2012).

These organic compounds can originate either from the soil (i.e. more or less humified organic matter) or from the roots, as rhizodeposits. Indeed, roots emit a large range of molecules which could physically, chemically and biologically modify soil properties. Most of rhizodeposits are (1) low molecular weight compounds (sugar, amino acid or organic acid) emitted passively across the plasma membrane and called root exudates and (2) compounds of higher molecular weight like polysaccharides, phospholipids and proteins, mostly secreted in a gelatinous layer surrounding roots and called mucilage (Bacic *et al.*, 1986; Grayston *et al.*, 1997; Uren, 2007). Rhizodeposits could play a role in pollutant dynamic in soils, consisting in exclusion mechanisms (limiting the transport of pollutant into the tissues by modifying their bioavailability in soils) or by making them more bioavailable and degradable by microorganisms. Additionally, rhizodeposits as attractive molecules or energetic substrates favour the presence of microflora, in particular the one which can degrade organic pollutants such as PAHs. For instance, their degradation was increased by 30 to 44% in rhizospheric soil compared to bare soil due to rhizodeposits (Reilley *et al.*, 1996).

Rhizodeposition evolves throughout the life of the plant according to its age and development stage. In rice, total organic carbon (TOC) exuded by the roots increased significantly from seedling to flowering, while it decreased after this stage (Aulakh *et al.*, 2001). Bobille *et al.* (2016) also witnessed a substantial increase in total content of amino acids in soil resulting from rhizodeposition of legume during plant growth. Furthermore, the qualitative and quantitative composition of rhizodeposits could be modified by many factors like nutrient deficiency and pollutant toxicity and varied according to plant species (Alkio *et al.*, 2005; Aulakh *et al.*, 2001; Ghanem *et al.*, 2010; Hale *et al.*, 1971 et Lapie 2019). In case of nutrient deficiency (Fe, P, Al), plant could specifically produce compounds to improve nutrient acquisition like phytosiderophore, amino or organic acids (Hinsinger, 2001; Murata *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2002, 2005; Tang *et al.*, 2009). Carboxylic acids emission such as that of acetic, oxalic, citric, succinic and glutamic acids increases in presence of Cd as well as that of some amino acids (proline) or proteins (peroxidase, superoxide dismutase) (Chen *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2001; Lapie *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2008, p. 200; Zhu *et al.*, 2011). In contrary, PAHs induce a decrease in carbohydrates, carboxylic acid and amino acid content (Muratova *et al.*, 2009).

Yet in general, very little studies focused on the composition of root exudates emitted by plant and submitted to trace metal stress (Lapie *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2008) and even less studies interested in the composition of mucilage in this context (Morel *et al.*, 1986). Analogous investigations with organic pollutants are rare, and to our knowledge, only one experiment dealt with this topic, focussing on root exudates (Muratova *et al.*, 2009). Moreover, very few studies are done over time. That is why in this study, we assessed the impact of two model pollutant, Cd representing the trace elements and PHE the organic pollutants, at very high concentrations, on maize rhizodeposition (exudates and mucilage) at three early development stages. The main molecule families present in the rhizosphere were determined (i.e. carbohydrates, amino acids, organic acids, proteins) in order to discuss their role in pollutant dynamic and tolerance by the plant, the latter being assessed by different morphological and biochemical parameters.

2. Materials and methods

2.1. Plant cultivation

The experiment was conducted in a growth chamber (photoperiod 16 h, 23/18°C day/night temperatures, relative humidity 70%, photosynthetic photon flux density (PPFD) 350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Maize (*Zea mays L.*, MB862, INRA) was cultivated in sand (particle size of 0.4-0.8 mm,

Sibelco, France) in polyvinyl chloride cylindrical pots (diameter 7.3 cm, height 30 cm, 1 725 g dry sand per pot). The sand was washed with 12% hydrochloric acid to remove carbonates and contaminants, rinsed with deionized water, and then dried in an oven (70°C, 48 h, then 200°C, 2 h).

There were two PHE levels expressed per gram of sand (100 and 250 mg PHE (kg sand)⁻¹), two Cd levels in the nutritive solution (40 and 100 µM Cd), and a non-contaminated control. The latter corresponded to 652 and 1630 µg Cd (kg sand)⁻¹. For all treatments, there were 15 replicates, resulting in 75 pots placed randomly in the growth chamber.

Phenanthrene was added to the sand following the protocol of Dupuy et al. (2016). A PHE stock solution was prepared in HPLC grade dichloromethane. Then, a sub-sample of dry sand, representing 10% of the required total mass was spiked at 16% v/w by a PHE solution diluted from the stock solution so as to achieve the concentrations of 1000 and 2500 mg kg⁻¹. The solvent was evaporated under a fume hood and the spiked sand was homogeneously mixed with the remaining fraction (90%) of non-contaminated sand in order to obtain the final concentrations (100 and 250 mg PHE kg⁻¹). The sand was contaminated just before the beginning of the experiment. Nutrients were brought in one time at the very beginning of the cultivation in a 250 mL nutritive solution adapted from Hoagland and Arnon (1938), 5 mM Ca(NO₃)₂.4H₂O, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄.7H₂O, 90 µM MnCl₂.4H₂O, 10 µM ZnSO₄.7H₂O, 3 µM CuSO₄.5H₂O, 460 µM H₃BO₃, 1 µM MoO₃, 10 µM Fe-EDTA, pH 5.4-5.5. The volume of nutrient solution corresponded to 80% of the water holding capacity and humidity was maintained to 80% with deionized water (18 MΩ) every two days

Cadmium (CdNO₃.4H₂O) was brought with nutrients in one time at the very beginning of the cultivation in the same 250 mL nutritive solution as described above. The watering conditions were similar to PHE treatments.

Maize seeds were sterilized (H₂SO₄ 95% 30 sec, ethanol 95% 5 min, H₂O₂ 10% 30 min) before planting and pre-germinated in petri dishes with growth medium (4 g.L⁻¹ Tryptic Soy Agar, 12 g.L⁻¹ agar/agar, Sigma Aldrich). After two days, only non-contaminated germinated seeds were planted in our systems. After two weeks a 10 mL solution of 100 µM Fe-EDTA was added in each pot.

2.2. Collection of rhizodeposits

Plants were collected at three development stages corresponding to the two, four and six leave stages. For each harvest, a third of the plants was collected (i.e. five pots per treatment). After

each of the three harvests, two rhizodeposit solutions were collected. The first one resulted of the extraction of sand adhering to the roots, designated as rhizospheric sand (Pinton *et al.*, 2007). In the rhizosphere, water released by roots during the night induces a swelling of the mucilage which dries and adheres to the surrounding sand particles during transpiration (McCully, 1995). To collect this rhizodeposit fraction, roots were gently extracted from their cultivation medium and washed with a phosphate buffered saline solution (150 mL PBS, 8 g.L⁻¹ NaCl, 1.44 g.L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.24 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 0.11 g.L⁻¹ KCl) in order to collect the adhering sand. PBS is commonly used for washing procedures because of its isotonicity with cells and its capacity to avoid protein denaturation (Borg *et al.*, 2019; Šamaj *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1999; Vaughn & Campbell, 1988; Willats *et al.*, 2001). It prevents or decreases the release of root exudates, contrarily to water of other non-isotonic solutes, and enables to mainly collect mucilage. The resulting sand in the buffer wash solution was agitated for two hours on an overhead shaker (Reax 20, Heidolph, 15 RPM) and then removed by filtration on Whatman paper. The resulting solution is termed rhizospheric sand extract. The second rhizodeposit solution was collected according to Luo *et al.*, 2014. After sand removal, roots were washed with deionized water and plunged into 150 mL of deionized water for 6 hours, to collect the root exudates. This second solution is termed diffusate solution.

Both rhizodeposit solutions were kept at -20 °C. A 50 mL volume of each rhizodeposit solution was freeze-dried until all water is completely sublimated (alpha 1-4 LDplus, Martin Christ, Germany). The powder obtained was resuspended in 4 mL of deionized water and the concentrated solution was filtered with 0.45 µm filters (Syringe filters, Acrodisc) to remove dead cells and root parts before chemical analyses. The concentrated solution was used for the determination of protein, carbohydrates and amino acids. For GCMS analysis, 50 mL of non-concentrated rhizodeposit solution were freeze dried and re-suspended with 4 mL of acetonitrile (ACN, HPLC-S Gradient Grade) and filtered with 0.45 µm filters.

Two different solvents were used, either water or ACN, because organic acids are more soluble in organic solvent like ACN while sugars, amino acids and most of proteins are preferably dissolved in water. In order to maximize solubilisation and homogenization, concentrated solutions were submitted to ultrasounds for 45 minutes. Even after those steps, there is a possibility that some compounds could remain insoluble and were lost with filtration.

2.3. Plant morphological measurements

After both solutions have been collected, foliar symptoms were noted, root and shoot length were measured. Leaves, stems and roots were separated and weighted. Leaves were scanned

using the leaf portable area meter and the transparent belt conveyer accessory (LICOR LI-3000C and LI-3050C, USA). Roots were also scanned and images obtained were analysed using the WinRhizo® software (WhinRhizo, 2005, Regent Instruments Inc., Canada) in order to determine root surface area of each plant. The fresh material was stored at – 20 °C until manual cryogenic grinding, using a mortar and pestle together with liquid nitrogen.

2.4. Plant biochemical measurements

Hydroalcoholic extractions were performed in order to extract carbohydrates and amino acids from plant according to Harrison et al. (2003). 100 mg of fresh material was added to 1 mL ethanol 80% (v:v) and agitated (17 RPM, 1 hour, 4 °C). The extract was centrifuged (10 min, 14 000 g) and the supernatant was sampled and kept aside. The pellet was submitted to a second and a third extraction similar to the first one with 60% ethanol and then with water. The three supernatants were merged to constitute a solution designated as hydroalcoholic extract.

The anthrone-sulfuric acid assay described by Leyva et al. (2008) was used to quantify the carbohydrate content in hydroalcoholic extract of roots. The anthrone reagent was prepared right before analysis by dissolving anthrone (0.1%, w:v) in a concentrated sulfuric acid (96%) solution. Standard solutions were prepared by diluting glucose (1.0 g.L⁻¹ in demineralized water). 150 mL of anthrone reagent and 50 µL of standard or sample were added to each well of a microplate. The later was kept at 4 °C for 10 min, then incubated at 100 °C for 20 min. Microplates were then cooled at room temperature and the absorbance was read at 620 nm with a microplate spectrophotometer (Synergy HT, Biotek Instruments, USA).

Total soluble amino acids were determined with ninhydrine according to Rosen (1957) and glutamine was used as standard. 100 µL of the standard or sample (hydroalcoholic extract or rhizodeposit solution) was added in the deep well microplate. Then, 50 µL of KCN (10 mM, in 2.6 M acetate buffer, pH 5.2) and 50 µL of ninhydrine solution (3% w:v in ethyl glycol monomethyl ether) were added before incubating the microplate at 100 °C for 15 min. At the end of the incubation, the reaction was stopped by adding 500 µL of a isopropanol/water mix (50:50, v:v) and the absorbance was read at 570 nm with a microplate spectrophotometer.

Plant proteins were extracted using 100 mg of plant fresh material and 400 µL of extraction buffer (100 mM tricine, 40 mM CaCl₂, 0.5% (w:v) polyvinylpyrrolidone, 0.5 % (v:v) triton 100 X, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 10 mM β-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl, pH 8). The suspension was agitated for 3 min. The supernatant was collected after centrifugation (15 000 g, 15 min, 4 °C) to constitute the soluble protein extract.

Proteins were determined following the Bio-Rad Protein Assay instructions according to Bradford, 1976. The standard was bovine serum albumin (1.37 mg/mL, Bio-rad). 10 μ L of each standard or protein extract from plants and 200 μ L of five times diluted dye reagent was mixed in each well. The absorbance was read at 595 nm after 5 min of incubation at room temperature.

2.5. Analyses of rhizodeposits

Total carbon in non-concentrated rhizodeposit solutions was measured using a total organic carbon analyser TOC-VSCN (Shimadzu, Japan). Rhizodeposit solutions were previously filtered with 0.45 μ m syringe-filters (Acrodisc). A TOC standard solution (TOC Standard, SCP Science, France) was used as standard and control sample.

Total carbohydrate, amino acid and protein contents of concentrated rhizodeposit solutions were measured using the same protocol as for plant material: (1) carbohydrate content was quantified using the anthrone-sulfuric acid assay used for plant extract (Leyva et al., 2008); (2) total soluble amino acids was determined according to Rosen (1957); (3) protein content was determined following the Bio-Rad Protein Assay protocol for microplate according to (Bradford, 1976).

Molecular analyses were performed on concentrated solutions. Mono and disaccharides were quantified following the protocol of Ricochon et al. (2011). Compounds of interest were quantitatively analysed on a LC-MS system (Thermo Scientific, USA) including a binary solvent delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ mass spectrometer equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in atmospheric pressure chemical ionization negative mode (APCI). Chromatographic analysis was performed on a Polyamine II HILIC column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m, YMC, Germany) fitted with a guard column (7.5 \times 4.6 mm, 5 μ m, YMC, Germany). Mobile phases consisted in a mix of ultrapure water (phase A) and 1% of chloroform in acetonitrile (phase B). 20 μ L of extracts were injected on the system and sugars were separated at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ through isocratic mode (A/B: 25/75). Sugars were analysed in SIM mode thanks to chlorinated adducts [M+35]⁻ and [M+37]⁻ which correspond to the stable isotopes of chlorine. The m/z windows used for the specific screening were set as follows: 167-188 m/z for xylose; 198-202 m/z for rhamnose; 214-232 m/z for fructose, glucose, mannose and mannitol; 376-382 m/z for sucrose and cellobiose. Mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage was set at 6 kV; source gases were set (in arbitrary units min⁻¹) for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 40, 10 and 10, respectively; capillary temperature was set at 225 °C; capillary voltage was set at -10 V; tube lens, split lens and front lens voltages at -47 V, 78 V and 5.25 V, respectively.

Ion optic parameters were optimized in APCI⁻ mode by automatic tuning using a standard solution of glucose at 0.1 g.L⁻¹ infused in mobile phase (A/B: 25/75) at a flow rate of 5 µL.min⁻¹. Furthermore, in order to determine polysaccharides content of rhizospheric sand extract, a volume of 1 mL of concentrated rhizodeposit was hydrolysed in acidic conditions according to a protocol adapted from Happi Emaga et al. 2012 (15 min, 105 °C, 7.7% HCl, 45 min temperature ramp) before LC-MS analysis. External calibration curves of sugars were plotted from 0.001 to 0.1 mg.L⁻¹ for diffusate solutions and from 0.001 to 0.5 mg.L⁻¹ for rhizospheric sand extracts.

Native amino acids were quantitatively analysed using the same LC-MS system but operating in electrospray positive mode (ESI⁺). A porous graphitic column (Hypercarb, 100 × 2.1 mm, 5 µm, Thermo Hypersil-Keystone) fitted with a guard column (7.5 mm × 4.6 mm cartridge, YMC, Germany) was used to separate 19 amino acids according to the protocol of Chaimbault et al. (2000): glycine, serine, alanine, threonine, asparagine, cysteine, aspartic acid, proline, histidine, arginine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, glutamine, glutamic acid, valine, lysine, methionine and leucine/isoleucine isomers (impossible to differentiate due to the same retention time and the same MS² fragmentation pattern). Mobile phases consisted in a mix of water modified with nonafluoropentanoïc acid (20 mM) (Phase A) and pure acetonitrile (HPLC-S Gradient Grade) (Phase B). Separation of compounds of interest was achieved with a first linear gradient from 0% to 70% of B for 50 min and then a second linear gradient from 70% to 100% of B for 6 min. The flow rate was set at 200 µL.min⁻¹ and the injection volume was set at 16 µL. Retention times of amino acids in complex mixtures were first validated thanks to MS² screening and then the quantitative analyses were routinely performed in MS full scan mode (from 70 to 300 m/z) allowing the screening of parent ions corresponding to monoprotonated form [M+H]⁺. Mass spectrometric conditions were as followed: spray voltage was set at 4.5 kV; source gases were set (in arbitrary units min⁻¹) for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 20, 5 and 5, respectively; capillary temperature was set at 250 °C; capillary voltage at -16 V; tube lens, split lens and front lens voltages at 50 V, -60 V and -5.75 V, respectively. Ion optics parameters were optimized in ESI⁺ mode by automatic tuning using a standard solution of norleucine at 0.1 g.L⁻¹ infused in mobile phase (A/B: 50/50) at a flow rate of 5 µL.min⁻¹. External calibration curves were plotted from 0.0003 to 0.03 mg.L⁻¹ for both rhizodeposit solutions.

An additional semi-quantitative analysis of rhizodeposit was performed using GC-MS system following a protocol adapted from Luo et al. (2014). A 500 µL volume of the concentrated solution in ACN was added in a GC-MS-compatible-vial and blown to dryness under a nitrogen

flow; the dry residue was suspended in 500 μL of n-hexane ($\geq 95\%$). Samples were derivatized with 40 mL of methoxyamine hydrochloride (20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in pyridine 99+%, 2 h, 37 °C) and 70 mL N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA, 30 min, 37 °C). GC-MS system consisted of a gas chromatography (GC-2010 Plus, Shimadzu, Japan) coupled with mass spectrometer (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu, Japan) equipped with an electron ionization source (EI) and an autoinjector (AOC-5000, Shimadzu, Japan). A DB-5MS capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) from Agilent J&W (Agilent Technologies, USA) was used. The injection was performed in splitless mode with 1 μL of samples at 230 °C. The carrier gas (helium) flow rate was 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The column temperature was held for 2 min at 50 °C, 13 min ramp to 180 °C and held for 5 min, 14 min ramp to 250 °C and 10 min at 250 °C. Interface and ion-source temperatures were respectively adjusted to 250 and 220 °C. Mass spectra were recorded at 2.66 scans. $\cdot\text{s}^{-1}$ with a m/z 50–600 scanning range.

2.6. Data processing

Raw GCMS signals were treated on MassHunter Workstation software (Qualitative Analysis, v. B.06.00, Agilent Technologies) after chromatogram deconvolution. Spectra were compared with two search unit mass libraries: NIST 14 (NIST Mass Spectral Library) and Wiley 275 (Wiley Online Library). Compounds were identified when similarities were greater than 70%. Then, chromatograms were integrated using MassHunter Workstation software (Quantitative Analysis, v. B.07.00, Agilent Technologies). LCMS signals were treated using XCALIBUR software program (v. 2.1). All biochemical or compounds content were expressed per gram of dry root.

For all analysis, data were tested for normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett test) for distribution and residuals with $p < 0.05$. In case of normality, a three ways ANOVA and the Student test was used to compare means, Bonferroni correction was applied on the data. Alternatively, the two ways ANOVA was completed with a Wilcoxon test, adjusted with the Benjamini-Hochberg correction. The principal component analysis (PCA) was performed using the FactomineR package and the graph as well as the confidence ellipses with a confidence interval of 95% were realised with the Factoshiny package. Data were analysed using R Studio (v. 3.4.4).

3. Results and discussion

3.1. Plant response to pollutants according to its development stage

In this experiment, all plants survived despite the presence of high concentrations of organic or metallic pollutant but only plants exposed to Cd showed visual foliar symptoms. Plant exposed to 40 and 100 μM of Cd showed chlorosis and necrosis since the four-leaf stage. During the growth, the dry weight biomass (DW g) logically increased in all organs (Figure 61). Indeed, for the control plants, the total biomass was almost multiplied by five between the first and the third stage, from 1.29 to 6.21 g (DW). Plants submitted to high amount of pollutant also continued to grow, from 0.81 to 6.21 g (DW) for plant exposed to the highest PHE level and from 0.36 to 1.47 g (DW) for plant exposed to the highest Cd level. However, the presence of pollutant impacted significantly the biomass, Cd having a greater impact than PHE (Figure 61). For the last stage, root biomass were 3.26 g, 2.09 g and 2.45 g respectively for the control, the 100 and 250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ modality of PHE exposure and were 1.32 g and 0.58 g for the 40 and 100 μM of Cd. R/S ratio was modified by the presence of pollutants compared to the control (Supplementary material

Table S 1, supplementary material). The ratio increased in presence of PHE or Cd at the beginning of the cultivation, at a four-leaf stage, indicating that plant exposed to pollutant first favoured its roots rather than its shoot whether the pollutant is organic or metallic. Then, at the second stage of development, the trend started to reverse: even if no significant differences were observable compared to the control, R/S ratio seem to decrease for plants exposed to PHE. In contrary, plants exposed to Cd and especially to high concentrations continued to privilege root biomass allocation rather than shoot. Finally, for the last stage, all R/S ratio decreased in presence of Cd or PHE compared to the control. During the 20 first days after sowing, plants exposed to pollutants seemed to privilege their root biomass rather than their shoot but after about 30 days, they started to change their strategy and allocate preferably the biomass to their shoot. An increase of the R/S ratio at the first stages of development of plants is usually described for both organic or metallic pollution of equivalent concentrations as well as for other abiotic stress (Dupuy *et al.*, 2016; Lapie *et al.*, 2019; Rellán-Álvarez *et al.*, 2006a).

Chlorophyll content in leaves was also significantly affected by the age of the plant. Its content decreased as the plant grew, from 1.12 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ for the first stage of the control treatment to 0.37 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ for the last one (Supplementary material

Table S 1, supplementary material). The chlorophyll content did not tend to decrease with PHE or Cd exposure. Yet, in general, abiotic stress induces a decrease in photosynthesis activity. In the same way, in our experiment, total amino acids, proteins and carbohydrates were not significantly affected by the stage of development or by the presence of pollutant. However, even if no significant differences were observed, amino acid, protein and carbohydrate contents tended to increase in presence of Cd or PHE. This is consistent with the increase in amino acid production observed in case of various abiotic stress like drought, salinity or pollutant exposure (Ashraf & Foolad, 2007; Costa & Spitz, 1997; Gargallo-Garriga *et al.*, 2018; Lapie *et al.*, 2019).

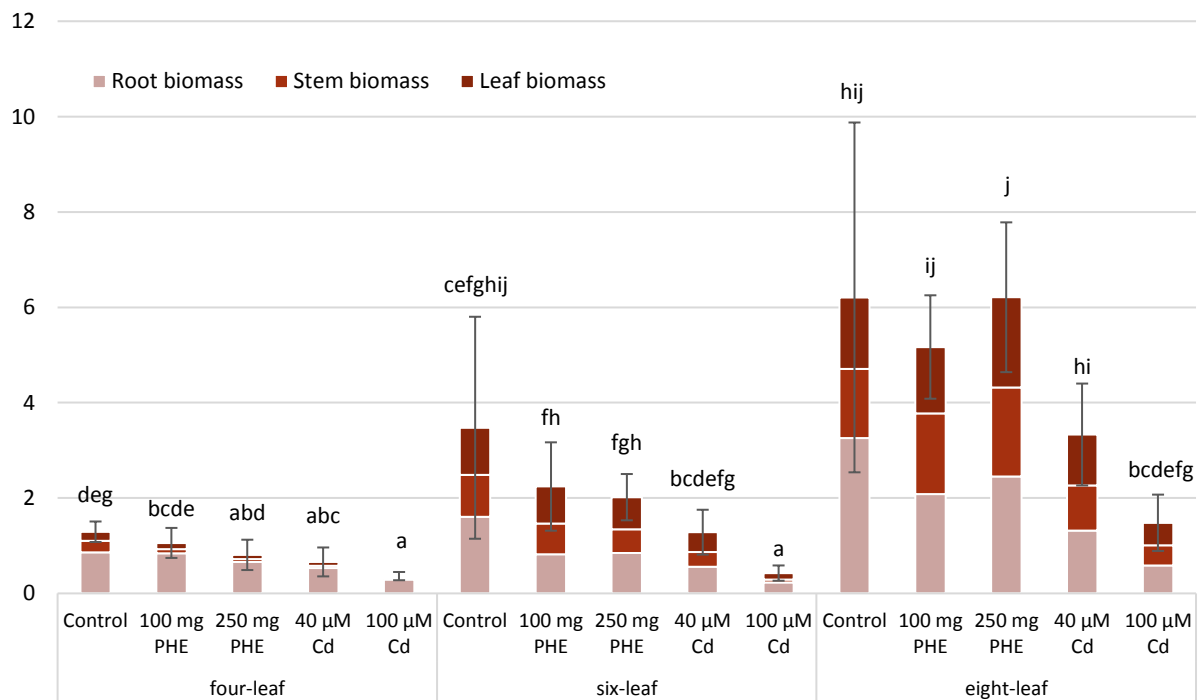


Figure 61: Root, stem and leaf biomass of maize at three stages (four, six and eight-leaf), submitted to Cd or PHE (100 and 250 mg.kg⁻¹ PHE; 40 and 100 µM Cd). Mean ± standard deviation, n = 5. Different letters mean significant differences, after a three ways ANOVA and Wilcoxon test (p < 0.05).

3.2. The diffusate solution

3.2.1. Biochemical analysis of the diffusate solution

The diffusate solution contains mostly carbohydrates. This solution collected from control plants at the eight-leaf stage contained about 0.16 mg.g⁻¹.h⁻¹ of carbohydrates, 0.10 mg.g⁻¹.h⁻¹ amino acids and 0.004 mg.g⁻¹.h⁻¹ of proteins (Table S 2). The composition of the non-exposed samples was close to those of other works. An equivalent concentration of carbohydrates (0.20 mg.g⁻¹.h⁻¹) have been determined by Boeuf-Tremblay *et al.* (1995) in root exudates of maize at

a 3-4 leaf stage. These authors also measured a concentration of $0.074 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ of amino acids, very close to ours. Concerning proteins, Muratova et al. (2009) measured an higher proteins content ($0.036 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) on 4 weeks old *Sorghum bicolor*. Values of the same magnitude have also been described by Lapie et al. (2019) with $2.2 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ of carbohydrates, $0.11 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ of amino acids and $0.033 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ of proteins.

Exudation of total organic carbon (TOC) expressed per gram of dry root increased gradually and significantly until the six-leaf stage (Figure 62). Indeed, in the diffusate solution (Figure 62), $0.217 \text{ mg C.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ was emitted by the control plant at the two-leaf stage while it quadruple at the six-leaf stage ($0.842 \text{ mg C.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). However, the presence of PHE or Cd did not seem to impact significantly the carbon emission into the diffusate solution. Variations in exudation of total organic carbon during plant growth have already been witnessed by Aulakh et al. (2001) in rice (*Oryza sativa*) cultivars in conditions comparable to ours with a 6 hours diffusion time in deionized water. At the seedling stage, the cultivar IR72 emitted $0.31 \text{ mg C.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, and exudation started to decline at the panicle initiation stage to reach $0.17 \text{ mg C.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at maximum tillering. Another study also measured TOC emitted by the roots and come to the conclusion that the younger the plant are, the more they produce root exudates. Groleau-Renaud (1998) observed a maximum exudation of maize at 8 days before decreasing until 16 days. The decrease of TOC was not observed in our experiment although oldest plants were aged 47 days.

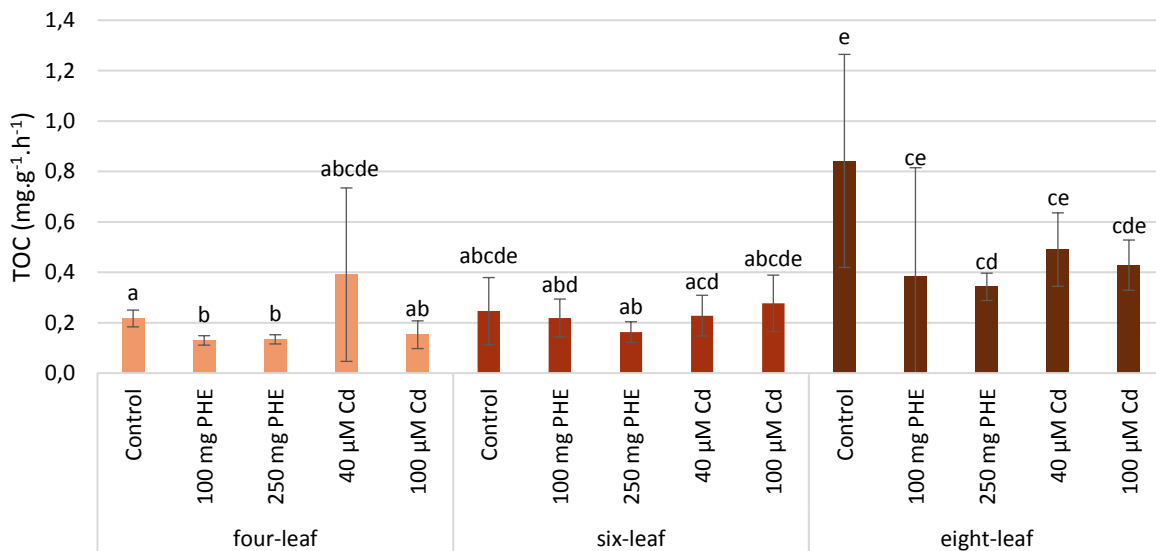


Figure 62: Total organic carbon (TOC) in the diffusate solution emitted by maize submitted to Cd or PHE (100 and 250 mg PHE.kg⁻¹; 40 and 100 μM Cd). Mean ± standard deviation, n = 5. Different letters mean significant differences, after a three ways ANOVA and Wilcoxon test (p < 0.05).

Carbohydrates, proteins ad amino acids exuded were not significantly impacted by both stage of development and pollutant exposure (Table S 2). However, even if no significant differences

were observed, amino acids in the diffusate solution tended to increase with plant growth. In the control treatment, plants initially produced $0.036 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at the first stage (≈ 20 days) to finally produce three times this quantity ($0.100 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) at the last stage of development (≈ 47 days). The same trend with an equivalent magnitude was observed by Bobille et al. (2016) in *Medicago truncatula* with a significant increase in amino acids exudation during plant growth. Twenty nine days after sowing, plants emitted about 0.012 mg.g^{-1} and this quantity was almost multiplied by four, 45 days after sowing ($\approx 0.044 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

3.2.2. Analysis of individual mono, disaccharides, amino acids and other organic compounds in the diffusate solution

Three monosaccharides, glucose, fructose and xylose, were measured with the LC-MS procedure, as well as two disaccharides, sucrose and cellobiose. Rhamnose, mannose and mannitol were below the limit of detection (LOD) or the limit of quantification (LOQ) (Table S 3). Compounds were expressed per gram of dry roots and per hour. Sucrose was above those limits only at the 8-leaf stage. Globally, the diffusion of mono and disaccharides was highest at the four-leaf stage. For the control, roots emitted 145 mg.g^{-1} of xylose at the four-leaf stage while this quantity dropped at about 13 mg.g^{-1} at the eight-leaf stage. It is also the case for fructose (Figure 63). Control plants emitted $251 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ of fructose at the four-leaf stage and $127 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at the eight-leaf stage, and less than $1 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at the four-leaf stage. A change in carbohydrate concentration over time had already been showed by Aulakh et al. (2001); sugar content in rice was divided by three at the last stage, maximum tillering ($\approx 0.1 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) compared to seedling ($\approx 0.3 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). The impact of the pollutants on saccharide exudation was very variable from a stage of development to another. At four-leaf stage, sugar exudation generally decreased for all compounds with pollutant exposure. Concerning fructose, its content was about $250 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for the control while it was below $50 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for the polluted treatments except for the $250 \text{ mg PHE.kg}^{-1}$ which reached about $450 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. However, this last treatment was very variable with an important standard deviation. The same trend was observed for the eight-leaf stage. On the contrary, for the six-leaf stage, plants submitted to pollutant exposure seemed to increase sugar exudation, especially for plants submitted to Cd stress. A decrease in sugar content was observed by Muratova et al. (2009) and Luo et al. (2014) on plants submitted to organic or metallic pollution. In case of a PHE exposure ($100 \text{ mg PHE.kg}^{-1}$), fructose, glucose, maltose and galactose exudation from four weeks old *Sorghum bicolor* decreased substantially (Muratova et al., 2009). It was also the case for two months old

Sedum alfredii exposed to Cd, where fructose, glucose or mannitol exudation decreased since 5 μM of Cd exposure (Luo *et al.*, 2014).

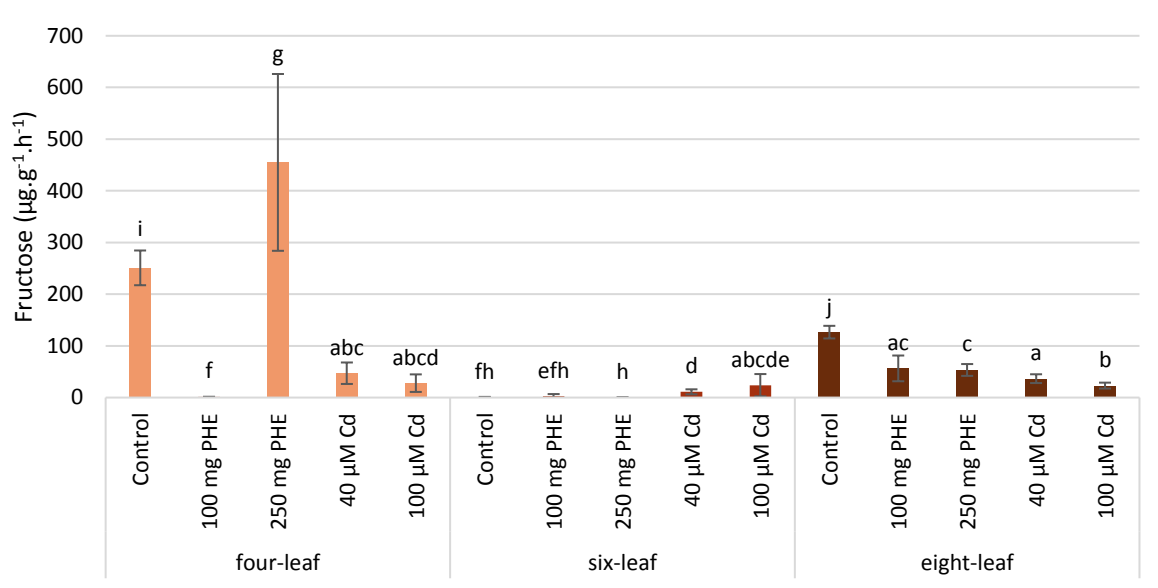


Figure 63: Fructose content in the diffusate solution emitted by maize submitted to Cd or PHE (100 and 250 mg.kg^{-1} PHE; 40 and 100 μM Cd). Mean \pm standard deviation, $n=5$. Different letters mean significant differences, after a three ways ANOVA and Wilcoxon test ($p < 0.05$).

Amino acids in the diffusate solution were measured and 18 of them were above the limit of quantification; glycerine, serine, alanine, threonine, asparagine, aspartic acid, proline, histidine, arginine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, glutamine, glutamic acid, valine, lysine, methionine and leucine (Table S 4). Globally, their emission from plants exposed to Cd or PHE tended to increase with the plant development while it was not necessarily the case for control plants. For example, plants exposed to 250 mg PHE.kg^{-1} initially exuded 0.1 $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ while they emitted 7.7 $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at the last stage. The same increase was visible for plants exposed to 40 μM of Cd, which produced 0.8 $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at the first stage and finally 7.2 $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at the last stage of development (Figure 64). However, this increase was not observed in the control treatment contrarily to what Bobille *et al.* (2016) did, measuring an increase in amino acids exudation; in their experiment, amino acids were produced by *Medicago truncatula* up to 0.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ 29 days after sowing and about 2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ at 45 days. The impact of the pollutant on amino acid content also depended on the stage of development. At the four-leaf stage, amino acids content tended to decrease with both PHE and Cd exposure; proline content for the control was about 3 $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ while plants submitted to Cd or PHE stress produced less than 1 $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. However, at the six-leaf and eight-leaf stages, most amino acid exudations, like that of proline, leucine, asparagine submitted to pollutant stress tended to increase when compared to the control. Concerning proline, at the eight-leaf stage, the control treatment produced about 3.13

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ and reached $6.23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ for the $250 \text{ mg PHE}\cdot\text{kg}^{-1}$ exposure while for the $100 \mu\text{M}$ of Cd exposure it was around $4.46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

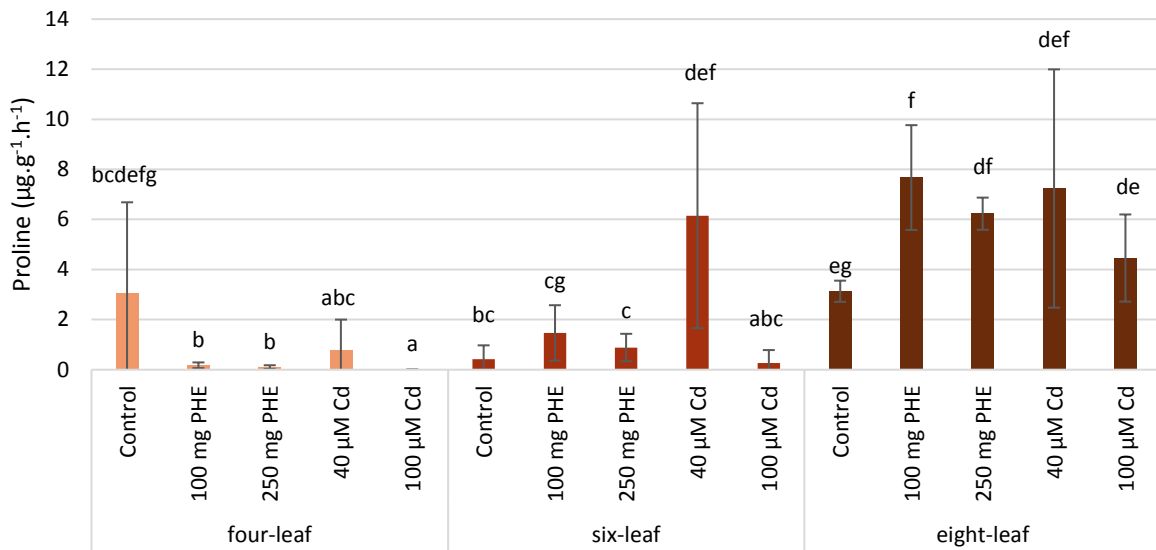


Figure 64: Proline content in the diffusate solution emitted by maize submitted to Cd or PHE (100 and $250 \text{ mg PHE}\cdot\text{kg}^{-1}$; 40 and $100 \mu\text{M Cd}$). Mean \pm standard deviation, $n = 5$. Different letters mean significant differences, after a three ways ANOVA and Wilcoxon test ($p < 0.05$)

With the GC-MS procedure, we measured 23 various compounds above the LOQ (Table S 5). Ten of them were organic acids, including valeric, lactic, glycolic, caproic, hydracrylic, 3- and 4-hydroxybutanoic, benzoic, succinic and nonanoic acid. The presence of organic acids is classically described in root exudates (Pinto *et al.*, 2008; Uren, 2007; Zhu *et al.*, 2011). We also determined four saturated fatty acids, the octanoic (C8), palmitic (C16), stearic (C18) and dodecanoic (C12) acids. Four monoglycerides were found (1-monomyristin, 2-palmitoylglycerol, 1-monopalmitin and 1, monostearin), two alcohols (2-butoxyethanol and 2-ethylhexanol) and a sugar alcohol (xylitol) as well as urea and dopamine which is a catecholamine. In the Table S 5, a logarithm function was applied on pic area values to simplify its reading contrarily to the Figure 65 where the logarithm function was not applied.

Globally, plants exposed to pollutants emitted a larger amount of organic compounds at the second stage of development (six-leaf) compared to the other stages. It is not the case for control plant, the maximum emission is for most compound the first stage like for valeric acid or lactic acid. But for some other compounds like glycolic or caproic, the maximum exudation appeared at the second stage of development. This trend was visible, for example, on succinic acid (Figure 65); first stage plants, exposed to $100 \mu\text{M}$ of Cd, emitted succinic acid in quantities below the LOQ. At the second stage, the concentration was more important ($12121 \text{ pic area}\cdot\text{g}^{-1}$

¹) before decreasing for the third stage (9638 pic area.g⁻¹). Concerning the control, succinic emission is maximum for the two first stages before to decrease for the last stage of development. In fact, all organic compounds determined with GC-MS at four-leaf stage plants exposed to 40 and 100 µM of Cd were below the LOQ. At this stage, there was few root biomass, which can explain the small concentrations of the compounds measured in the diffusate solution. Contrarily to our experiment, Aulakh et al. (2001) observed no differences between the different stages of development. In their experiment, organic acid emission by the roots was measured on rice and its content, expressed per plants, increased as the plants developed. But if the concentrations are expressed per gram of root, like in our study, total organic acid emission was equivalent between the seedling and the maximum tillering stages, about 0.02 mg.g⁻¹.h⁻¹. The impact of pollutant on the compounds measured by GC-MS was very clear; pollutants caused an increase of the quantity of exuded organic and fatty acids, monoglycerides, alcohols and other measured molecules. This increase was higher when plants were exposed to Cd compared to control or plants exposed to PHE. Control plants at four-leaf stage exuded about 2857 pic area.g⁻¹ of succinic acid and this amount increased slightly for plants exposed to PHE (3051 pic area.g⁻¹ for the 100 mg PHE.kg⁻¹ modality and 3756 pic area.g⁻¹ for the 250 mg PHE.kg⁻¹ modality) while plants exposed to Cd, exuded two (5489 pic area.g⁻¹) and four time (12121 pic area.g⁻¹) more of succinic acid than the control, respectively for the 40 and 100 µM of Cd treatment. An increase of organic acid exudation in presence of abiotic stress is classically observed. In rice submitted to Cd stress, all organic acids measured (tartaric, oxalic, malic, succinic, citric, acetic and malonic acid) increased significantly (Fu *et al.*, 2018). The same tendency was also observed on maize in case of water stress on malic, citric, lactic and maleic acids (Song *et al.*, 2012).

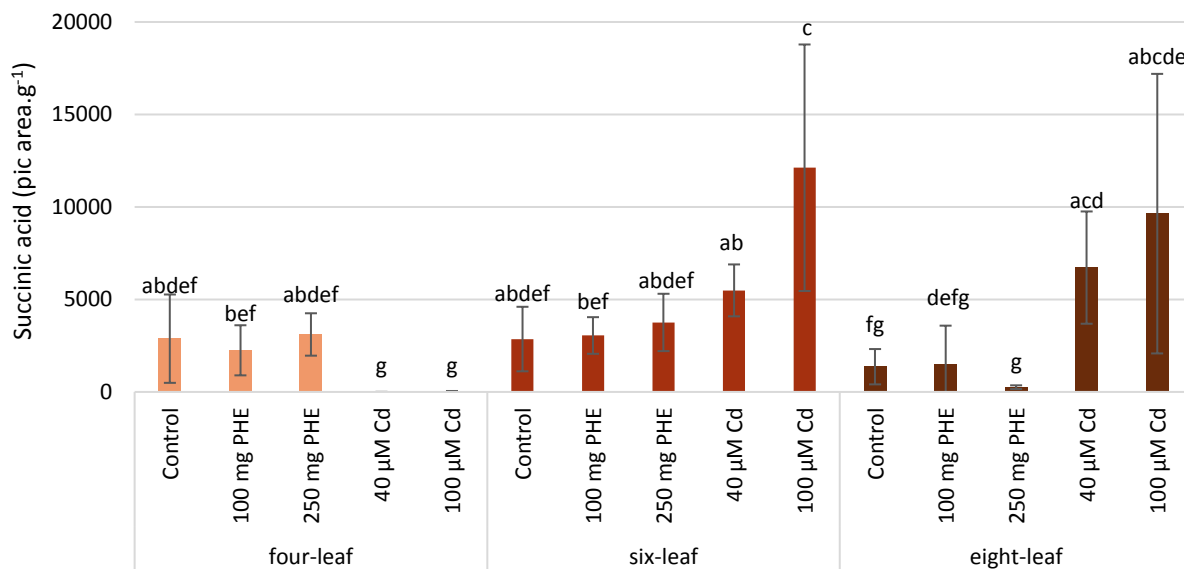


Figure 65: Succinic acid measurement in the diffusate solution emitted by maize submitted to Cd or PHE (100 and 250 mg PHE.kg⁻¹; 40 and 100 µM Cd). Mean ± standard deviation, n = 5. Different letters mean significant differences, after a three ways ANOVA and Wilcoxon test (p < 0.05).

3.2.3. Multivariate approach of the impact of Cd and PHE exposure on the diffusate solution

The results previously described were summarized into three principal component analysis (PCA). The first one (Figure 66a and Figure 66b) was performed with 31 compounds resulting from GC-MS and LC-MS analysis measured in the diffusate solutions collected from four-leaf stage plant. The second one (Figure 66c and Figure 66d) and the third one (Figure 66e and Figure 66f) were also performed on those 31 compounds respectively emitted by six and eight-leaf stage plants.

The first plane of the four-leaf PCA explained 67.27 % of the variability. The first component explains 45.48 % of the variability and is mostly driven by organic acids and other components measured by GC-MS like fatty acids or monoglycerides but also by some sugar (mannose, rhamnose, xylose, fructose, xylitol and cellobiose). The rest of the variables, mostly amino acids and some sugars (glucose and fructose) contribute to the second component which explain 21.79 % of the variability. In this PCA, we can differentiate four groups, the control, the sample exposed to 100 mg of PHE, those exposed to 250 mg of PHE and those exposed to Cd. Indeed, samples exposed to 40 and 100 µM of Cd do not seem to exude differently one from the other as shown by their superimposed confidence ellipses. Diffusate solutions from plants exposed to PHE and especially those exposed to 100 mg of PHE are located closely to the control diffusate solutions while solutions exposed to Cd are far from the three other groups.

Concerning the six-leaf PCA, the first plane explains 64.47 % of the variability. The repartition of the variables on the first (40.92 %) and second component (23.55 %) is very similar to the repartition in the four-leaf PCA. The samples exposed to 40 μM of Cd are detached from those exposed to 100 μM of Cd while samples exposed to PHE (100 and 250 mg PHE.kg⁻¹) are superimposed with control samples. Like for the previous PCA, samples are mostly discriminated according to the first component which is driven by fatty acids, organic acids, and some sugars like xylitol, sucrose xylose and fructose. Samples exposed to Cd and especially those exposed to 100 μM of Cd are positively correlated with the presence of those compounds.

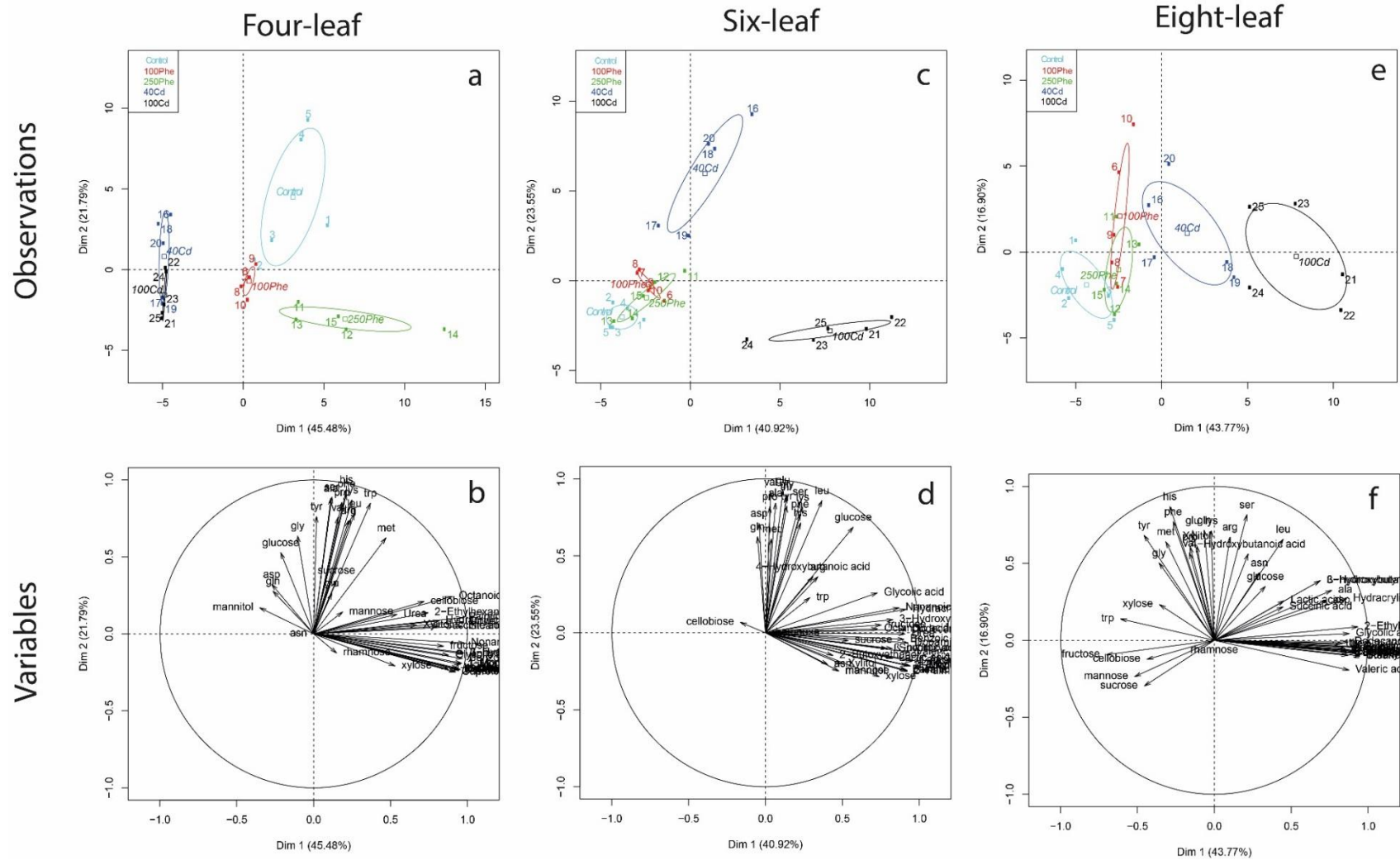


Figure 66: Principal component analysis (PCA) generated from all molecules measured in the diffusate solution from four (a, b), six (c, d) and eight-leaf (e, f) plants exposed or not to Cd or PHE. Full square represents the different samples according to pollutant treatments, empty square represents the barycentre of those samples and ellipse represents the confidence ellipse with a confidence interval of 95 %.

Finally, for the eight-leaf PCA, 60.97 % of the variability is explained in the first plane. The repartition of the variables is slightly different from the two former PCA. Indeed, most of fatty and organic acids continues to contribute to the positive first component and they are negatively correlated to the sugars, except for glucose, and tryptophan. Amino acids are still the components that contribute the most to the second component (positive). Like for the previous PCA, we can distinguish three groups: one is formed by the control samples and by samples exposed to PHE while the two other groups are resulting from the samples exposed to 40 μM of Cd and to 100 μM of Cd. The distribution of the samples is done according to the first component. The PHE/control group is positively correlated with the sugars while the Cd groups are correlated with the organic and fatty acids.

3.3. The rhizospheric sand extract

3.3.1. Biochemical analysis

Like for the diffusate solution, the rhizospheric sand extract contains mostly carbohydrates (Table S 2). This solution collected from six-leaf stage plants was mostly composed of carbohydrates (0.42 mg.g^{-1}) and contain only 0.06 mg.g^{-1} of amino acids and 0.04 mg.g^{-1} of proteins. This composition is usually the one of mucilage with a high proportion of polysaccharides, reaching 95% (w/w) and a smaller amount of proteins (5%, w/w) (Bacic *et al.*, 1986; Harris & Northcote, 1970). In our rhizospheric sand extract, there was about 80% of polysaccharides and 20% of proteins and amino acids.

As the plants grew, a significant and gradual increase of carbon secretion was observed in the rhizospheric sand extract (Figure 67): control plants at the first stage secreted $0.128 \text{ mg C.}(\text{g root})^{-1}$ while this quantity is six time more important at the last stage of development ($0.846 \text{ mg C.g}^{-1}$ of dry root). The quantity of carbon secreted by plants exposed to PHE is always beneath the quantity secreted by control plants. It is not the case for plants exposed to 40 μM of Cd which produce an amount of TOC equivalent to that of the control and plants exposed to 100 μM of Cd exude significantly more carbon than the control at the six and eight-leaf stages.

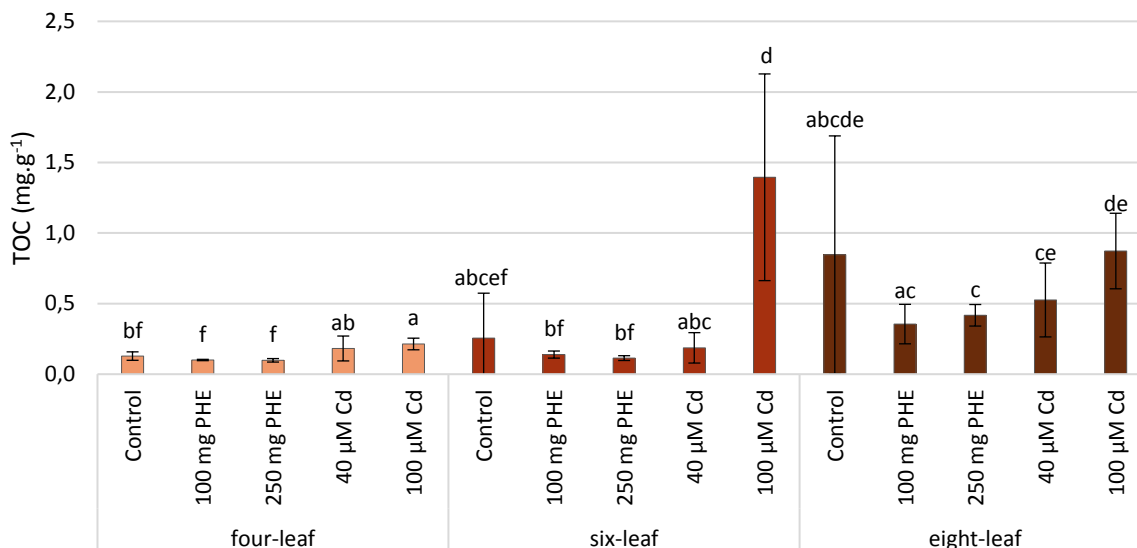


Figure 67: Total organic carbon (TOC, mg.(g root)⁻¹) in the rhizospheric sand extract emitted by maize submitted to Cd or PHE (100 and 250 mg PHE.kg⁻¹; 40 and 100 μM Cd). Mean ± standard deviation, n = 5. Different letters mean significant differences, after a three ways ANOVA and Wilcoxon test (p < 0.05).

Carbohydrates and amino acids in the rhizospheric sand extract were also not significantly impacted by the age of plant or by the pollutant exposure (Table S 2). Even if no significant differences were observed, in the rhizospheric sand extract, carbohydrates and proteins seemed to reach a maximum of secretion at the six-leaf stage, for all pollutant modalities. Additionally, pollutant exposure increased significantly the secretion of proteins at all development stages and whether the pollutant is organic or metallic, even if the increase is more important in rhizospheric sand extract exposed to Cd than those exposed to PHE.

3.3.2. Analysis of individual amino acids, mono, disaccharides and other organic compounds in the rhizospheric sand extract

Before the acid hydrolysis, no mono or disaccharides were found in the rhizospheric sand extracts in quantities above the LOD (Table S 3). Only glucose after acid hydrolysis was measured in the samples, indicating the presence of polysaccharides (Figure 68). These polysaccharides were composed of glucose chains because no other carbohydrate could be determined after hydrolysis. At the four-leaf stage, the quantity of hydrolysed glucose in our solutions was below the LOD in all samples collected, while samples from the two following stages contained glucose in sufficient concentrations. The polysaccharides secreted by roots increased significantly with plant growth. Indeed, at four-leaf stage, control plant emitted polysaccharides in quantities below LOD while at four and eight-leaf stages, they respectively emitted 6.1 and 39.1 μg.g⁻¹ of glucose unit. The rise in glucose emission was more important

in control plant than in plants exposed to a pollutant, whether organic or metallic. Their presence seemed to affect rhizodeposition by first increasing significantly polysaccharide production per gram of dry roots for the six-leaf stage. At the last stage, PHE caused a decrease in the amount of polysaccharides emitted by the roots but no significant differences were found for plant exposed to Cd even if glucose content tended to decrease.

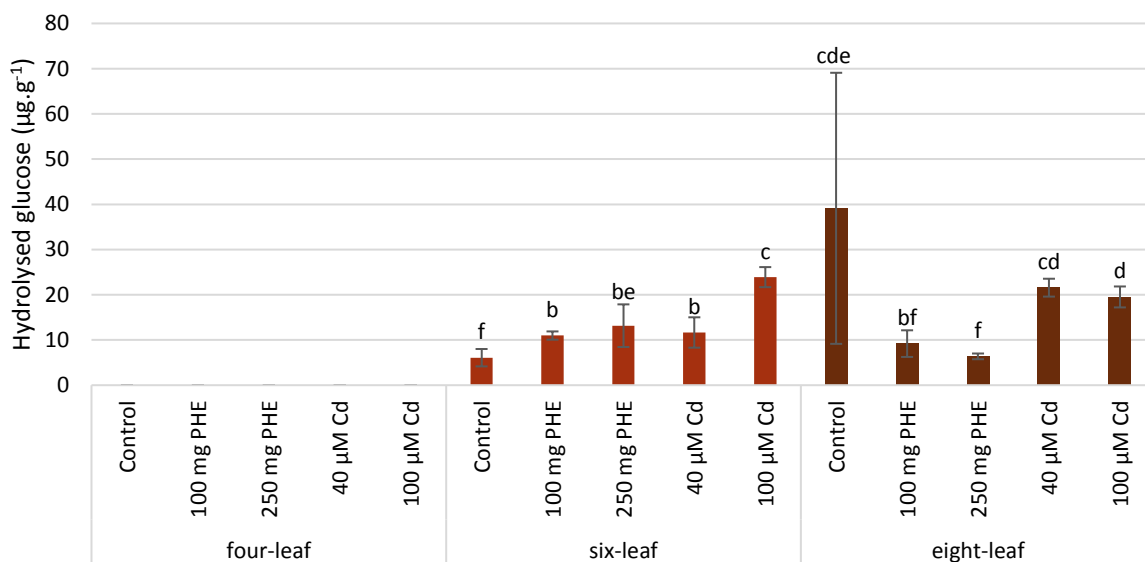


Figure 68: Hydrolysed glucose content in the rhizospheric sand extract emitted by maize submitted to Cd or PHE (100 and 250 mg PHE.kg⁻¹; 40 and 100 µM Cd). Mean ± standard deviation, n = 5. Three ways ANOVA and Wilcoxon test. Different letters mean significant differences (p < 0.05).

Concerning amino acids determination, we determined 10 compounds in quantities above the LOQ, i.e. histidine, arginine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, glutamic acid, valine, lysine, methionine and leucine (Table S 6). The stage of development seemed to influence this rhizodeposition in a non-linear way. Indeed, it is at the six-leaf stage that plant the more secreted amino acids compared to the two other stages except for glutamic acid and lysine. For histidine, for the three stages, all pollutants modalities combined, plants secrete about 1.38, 3.80 and 1.02 µg.g⁻¹ respectively for the four-leaf, the six-leaf and the eight-leaf stage. Moreover, the presence of an organic or metallic pollutant seemed to increase the quantity of amino acids secreted at all development stages. This trend was clearly visible for the histidine content from six-leaf plants. Control plant secrete about 1.1 µg.g⁻¹ of histidine while plants submitted to PHE produce respectively 2.1 and 2.6 µg.g⁻¹ for the 100 and 250 mg PHE.kg⁻¹ and plants submitted to Cd produce respectively 3.75 and 8.55 µg.g⁻¹ for the 40 and 100 µM Cd.

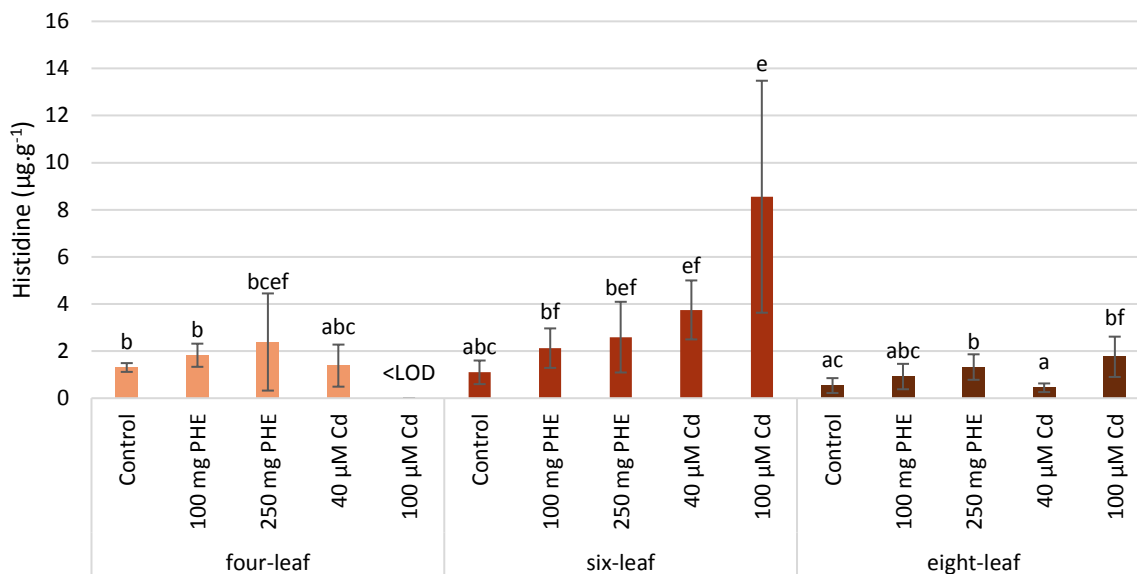


Figure 69: Histidine content in the rhizospheric sand extract emitted by maize submitted to Cd or PHE (100 and 250 mg PHE.kg⁻¹; 40 and 100 µM Cd). Mean ± standard deviation, n = 5. Three ways ANOVA and Wilcoxon test. Different letters mean significant differences (p < 0.05).

In the rhizospheric sand extract we measured 23 different compounds with the GCMS procedure (Table S 7). Nine organic acids were determined, including lactic, caproic, glycolic, 3-hydroxybutanoic, benzoic, succinic, nonanoic, 3-methylvaleric, and azelaic acid. We also measured the content of five saturated fatty acids, i.e. octanoic (C8), decanoic (C10), dodecanoic (C12), myristic (C14), palmitic (C14), stearic acid (C18) and two monounsaturated fatty acids, palmitoleic (C16) and oleic acid (C18) as well as three monoglycerides, 2-palmitoylglycerol, 1-monopalmitin and 2-monostearin. We also measured dopamine, xylitol and urea. The abundance of lipidic compounds like fatty acids and monoglycerides is in agreements with previous works which described mucilage as mainly composed of polysaccharides, proteins but also phospholipids composed of one or two fatty acids (Bacic *et al.*, 1986; Read *et al.*, 2003). Moreover, Read *et al.* (2003) analysed mucilage in lupin, maize and wheat and found a higher proportion of saturated fatty acids than unsaturated just like in our experiment where we measured five saturated and two unsaturated fatty acids.

Like for the diffusate solution, the stage of development seems to influence the composition of the rhizospheric sand extract. Indeed, a larger amount of compounds from plants exposed to pollutant was emitted by plants harvested at the four and six-leaf stages rather than at the eight-leaf one. However, this trend was not visible for the control plants. For example, palmitoleic acid is emitted by control plant up to 60485 pic area.g⁻¹ for the first stage, 19997 pic area.g⁻¹ for the second stage and 16550 pic area.g⁻¹ for the last stage of development. However, plants exposed to 100 µM of Cd emitted 229955 pic area.g⁻¹ at the first stage, an equivalent amount

(250320 pic area.g⁻¹) for the second stage before finally decreasing to 61195 pic area.g⁻¹ for the last stage of development. The presence of pollutant, like for the diffusate solution also increased the secretion of the measured compounds in the rhizospheric sand extract. Exposure to Cd impact more the rhizodeposition than exposure to PHE for all compounds (organic and fatty acids, monoglyceride, alcohols, urea and dopamine). This trend was clearly visible in palmitic acid concentrations (Figure 70). At the first stage, control plants produced 60485 pic area.g⁻¹ of palmitic acid. This quantity increased slightly in case of PHE exposure, respectively 68602 and 105259 area.g⁻¹ of palmitic acid for the 100 and 250 mg PHE.kg⁻¹. The quantity of palmitic acid emitted by the control doubled when plants were exposed to 40 µM of Cd and almost quadruple when plants are exposed to 100 µM of Cd. However, the stage of development do not seem to accentuate the impact of the pollutants like for the diffusate solution.

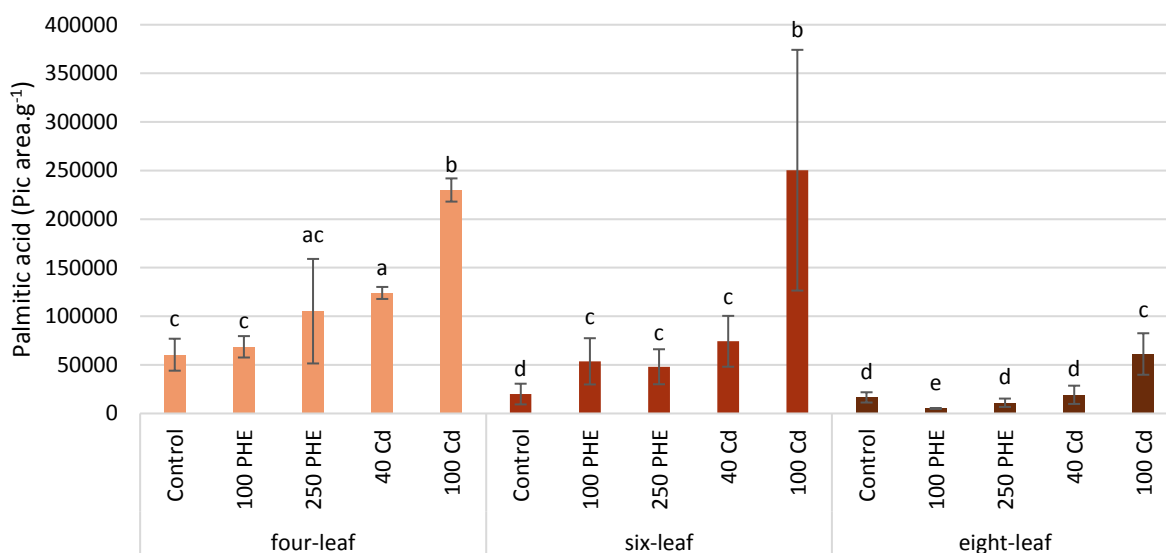


Figure 70: Palmitic acid measurement in the rhizospheric sand extract emitted by maize submitted to Cd or PHE (100 and 250 mg PHE.kg⁻¹; 40 and 100 µM Cd). Mean ± standard deviation, n = 5. Three ways ANOVA and Wilcoxon test. Different letters mean significant differences (p < 0.05).

3.3.3. Multivariate approach of the impact of Cd and PHE exposure on the rhizospheric sand extract

The results concerning 31 compounds of the rhizospheric sand extract are summarized in three PCA according to the stage of development (Figure 71). At the four-leaf stage, the first plane of the PCA explains 65.91 % of the variability with 51.90% for the first component and 14.01% for the second one. The variables that the most contribute to the first component are fatty and organic acids. The second one, on the positive side, is driven by some amino acids like phenylalanine, leucine or arginine and by xylitol and urea while alanine, valine, and azelaic acid contribute to the negative side of this component. The samples from plants exposed to 100

μM of Cd are apart from all other samples and positively correlated to organic and fatty acids while all other samples are negatively correlated to those compounds. At the four-leaf stage, compounds secreted by control plants and plants exposed to PHE or to $40 \mu\text{M}$ of Cd are located in the same area due to a very close composition.

In the second PCA, at six-leaf stage, the first plane explains 82.43 % of the variability of which 70.04 % are explained by the first component. All fatty acids, organic acids and other compounds measured by GC-MS, except urea contribute to this component as well as hydrolysed glucose, arginine, leucine and histidine, while tryptophan, methionine and threonine contributes to the second component. The repartition of the groups is very close from the previous PCA. The confidence ellipses of the control samples and samples from plants exposed to $40 \mu\text{M}$ of Cd, 100 and 250 mg PHE.kg⁻¹ are superimposed. On the contrary, plants exposed to $100 \mu\text{M}$ Cd are opposed to the previous group and are positively correlated to the fatty and organic acids.

At the eight-leaf stage, the two first components of the PCA explain 69.59% of the variability. The major part of the variability is explained by the first component (56.38%) which organic and fatty acids are the main contributors. The second component, which explains less variability (13.21 %) is mainly composed of amino acids (arginine, tryptophan, tyrosine, phenylalanine and methionine) on its positive side and by azelaic acid on its negative side. Like for the previous PCA, samples are distributed according to the first component. Control samples and samples exposed to PHE still have a close composition but their confidence ellipses are not superimposed anymore. Additionally, the two Cd groups are distinct from the others and positively correlated with the concentration in fatty and organic acids.

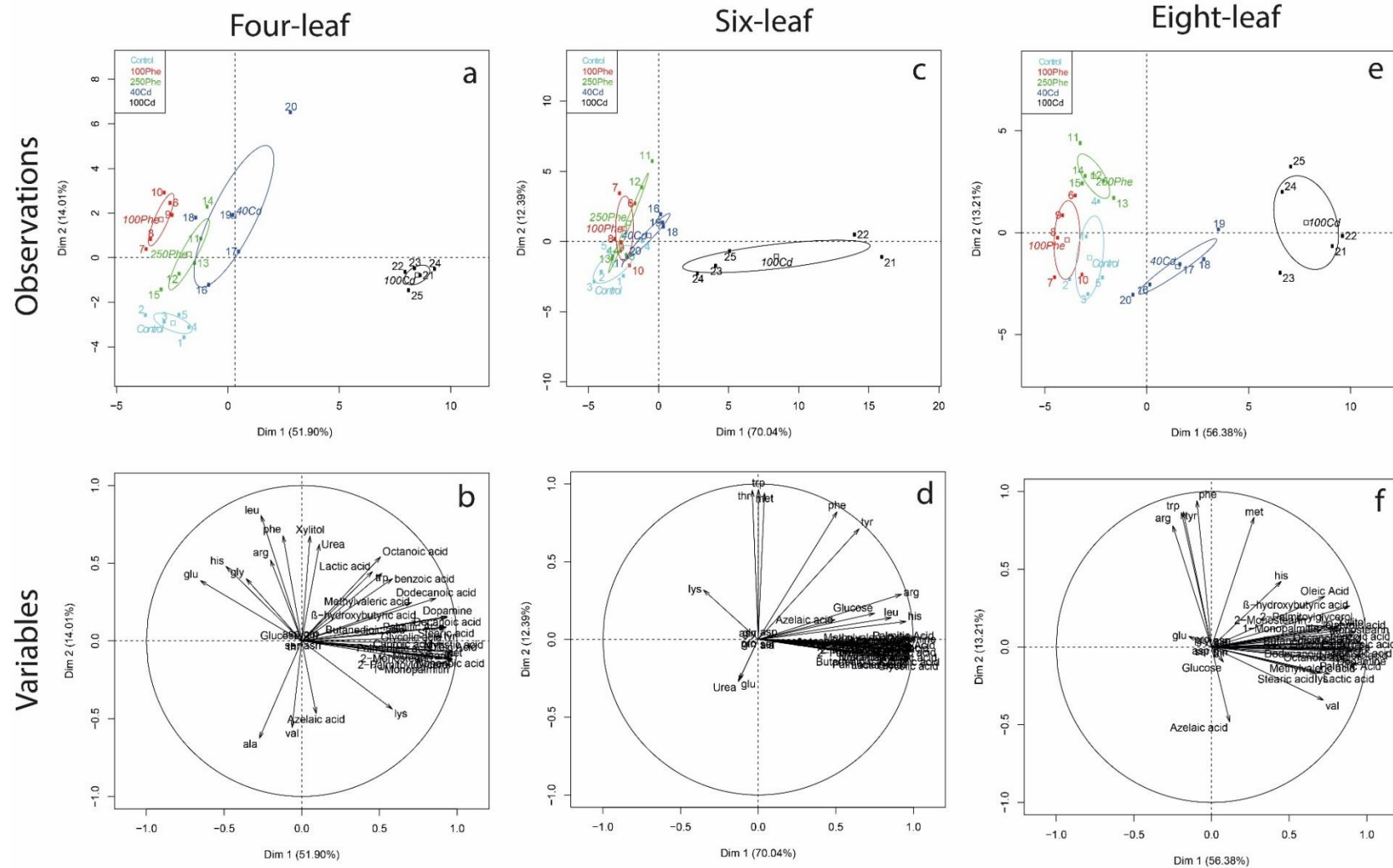


Figure 71: Principal component analysis (PCA) generated from all molecules measured in the rhizospheric sand extract from four (a, b), six (c, d) and eight-leaf (e, f) plants exposed or not to Cd or PHE. Empty square represents the different samples according to pollutant treatments, full square represents the barycentre of those samples and ellipse represents the confidence ellipse with a confidence interval of 95 %.

3.4. Suspected role of collected rhizodeposits on organic or metallic pollutant dynamics

We collected many rhizodeposits which are able to, directly or indirectly, modify the pollutant dynamic. Some of them contribute to prevent pollutant penetration, like that of metal ions, into the root cell, by emitting chelating compounds in the rhizosphere. Organic and amino acids, well-represented in rhizodeposits, are very effective ligands toward trace metal like Cd. The emission of organic acids like oxalic acid or citric acid significantly decreases the concentration of free Cd and consequently reduces the phytotoxicity of the pollutant (Pinto *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011). In the same way, the emission of amino acids like histidine, asparagine and proline also play an important role in the metal sequestration (Bottari & Festa, 1996; Sharma & Dietz, 2006; Smirnoff & Cumbes, 1989). Cysteine and methionine are very strong ligands toward heavy metals due to their thiol group (Colovic *et al.*, 2018). Concerning more particularly mucilage, polysaccharides can bind heavy metals like Cd through bounding to the carboxyl groups of the uronic acids located on the polysaccharide chains (Morel *et al.*, 1986).

On the contrary some rhizodeposits like many lipidic compounds measured in our rhizodeposits solutions and especially in the rhizospheric sand extract are able to increase the aqueous concentration of poorly soluble compounds like PAHs and consequently improve their bioavailability toward both plants and microorganisms (Deziel *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2006; Tiehm *et al.*, 1997). Those compounds are known as surfactant and have amphiphilic characteristics like fatty and neutral acids (e.g. monoglycerides) but also phospholipids which are composed of one or two fatty acids (Desai & Banat, 1997; Yap *et al.*, 2010). In this work, we measured four fatty acids and four monoglycerides in the diffusate solution but also eight fatty acids in the rhizospheric sand extract and three monoglycerides. Moreover, the emission of organic acids like acetic, oxalic, tartaric and citric acid combined with surfactant improves the PAHs solubilisation (Deziel *et al.*, 1996).

Indirectly, rhizodeposits could also modify the dynamic of organic or metallic pollutant because many of those compounds are known to be chemoattractant toward microorganisms. *Escherichia coli* could respond to very low chemotactic signal, below 10 nM of glucose while the average exudation flux of this sugar in our diffusate solutions is about 60 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ which correspond to 330 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Lux *et al.*, 1999). This bacterium could also react to low concentrations of amino acids like threonine (1 μM), glutamic acid (5 μM), aspartic acid (0.6 nM) or asparagine (2 μM) (Mesibov & Adler, 1972). Additionally, the low molecular weight compounds like sugars, amino and organic acids are easily degradable and can be used as

nutritive substrate by microorganisms (Grayston *et al.*, 1997; Heinrich & Hess, 1985; Reinhold *et al.*, 1985; Tian *et al.*, 2017). The chemotactic and nutritive characteristics of rhizodeposits induces a proliferation of the microorganism biomass in the rhizosphere of 17 to 36% compared to sterile conditions (Heulin *et al.*, 1987; Osorio Vega, 2007a). Microorganisms are able to degrade organic pollutants using oxidative enzymes like peroxidase or laccase and this process could be improved with the production of surfactants by the plants or by the microorganisms (Bollag, 1992; Cerniglia, 1992).

3.5. Influence of maize development on rhizodeposition

Plant growth is a factor that influence rhizodeposition as well as the light intensity, the temperature, the nutrient status or a stress (Neumann & Röhmheld, 2000; Rovira, 1959). The influence of plant growth have been studied in other publications but only on root exudates, not on mucilage and nor on plant submitted to pollutant stress (Aulakh *et al.*, 2001; Bobille *et al.*, 2016; Groleau-Renaud, 1998). If the values of the compounds are expressed per gram of dry roots, their emission not necessarily increases. For example, the TOC emission in the diffusate solution decreases (non significantly) with plant growth. However, if the values are expressed per plant, the rhizodeposition increases because of the increase of the root surface. As said previously, the rhizodeposition is not linear and many changes seem to occur at the six-leaf stage. At this stage, sugar diffusion is minimal in the diffusate solution while polysaccharides, amino acids and proteins content are maximal in the rhizospheric sand extract. In maize, the end of the heterotrophy and the beginning of the autotrophy occurred between the three and the five-leaf stages. This important modification in plant functioning could explain the variability between the first stages of development and the two other and especially the maximal exudation of those compounds at the six-leaf stage. Indeed, a higher production of amino acids, organic acids and proteins could help plant to improve its nutrient acquisition (Hinsinger, 2001; Murata *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2002, 2005; Tang *et al.*, 2009).

Moreover, the plant growth seems to accentuate the impact of Cd on the rhizodeposition while the impact of PHE seems to decrease with time. The decrease of PHE effect over time could be explain by a degradation of the pollutant. Indeed, Dupuy *et al.* (2015) measured the PHE content in sand in conditions very close to ours, at the end of a four-weeks experiment of maize cultivation and its content was very low, less than 50 $\mu\text{g PHE.kg}^{-1}$ while they initially spiked the sand with concentrations from 50 to 750 mg PHE.kg^{-1} . If PHE is quickly degraded, Cd is continuously absorbed by plant throughout the culture and accumule in plant tissues. Cd exposure induce an increase in amino acid diffusion, polysaccharide secretion or organic acids

and fatty acids secretion while the stage of development have very few effect on control samples composition.

4. Conclusions

The three stages of development (two, four and six leaves) were well morphologically separated with an important biomass increase in all modalities, even on plants exposed to high pollutant concentrations (100 μM of Cd and 250 mg PHE.kg⁻¹). The impact of both organic and metallic pollutant was also clearly visible on plant functioning and especially on plant exposed to Cd which showed chlorosis, necrosis and an important drop in biomass. Plant growth and presence of pollutant also altered plant functioning. Indeed, chlorophyll content decreased as the plants grew even though amino acids, proteins and carbohydrates content in roots were not substantially affected. In the same way, pollutant did not seem to affect importantly the content of those compounds even if amino acids tended to increase with pollutant exposure.

Concerning rhizodeposits, the collected diffusate solution corresponded to what is usually described as root exudates in the literature with high amounts of low molecular weight compounds like sugars, amino and organic acids. During plant growth, individual and total amino acids content increased significantly. This increase was more important on plant submitted to pollutant stress and was accentuated with time. Fatty and organic acids emission was not linear and was maximum at the six-leaf stage. Individual and total carbohydrate emissions as well as those of proteins is minimal at the last stage of development and maximal at the four and six-leaf stage. The exposure to high concentrations of Cd or PHE also modified significantly their exudation but was not monotonous during plant growth. Indeed, carbohydrates and amino acids emission were not submitted to the same tendency at the three stages of development. Organic and fatty acids increased significantly in presence of a pollutant, and more particularly in presence of Cd. Indeed, the treatments seemed to be mostly discriminated by their organic and fatty acids composition according to their pollutant exposure and especially at the last stage of development (eight-leaf). Moreover, Cd had a higher effect on the diffusate composition than PHE and after 33 days, PHE did not have impact on root exudation anymore while Cd appeared more toxic.

Concerning the rhizospheric sans extract, it was mainly composed of higher molecular weight compounds than the diffusate solution, like polysaccharides and fatty acids generally composing the mucilage. In this solution, the TOC emission increased progressively with plant growth. Amino, fatty and organic acids as well as proteins increased with the stage of development, but their emission was maximum at the six-leaf stage in contrary to

carbohydrates. Indeed, carbohydrate emission was minimal at this development stage. The carbohydrate content was not impacted monotonously at the three stages of development by the pollutants. Its content first tended to increase at the four-leaf stage in presence of Cd or PHE before decreasing at the last stage. All other measured compounds like fatty acids, amino acids, organic acids or proteins increased with pollutant exposure. The main modification in the rhizospheric sand extract composition, like for the diffusate solution was an increase in organic acids and lipids secretion in presence or pollutant, especially Cd. Despite those differences rhizospheric sand extract seem to be less impacted by the presence of the pollutants and by plant growth than the diffusate solution.

Finally, Cd seemed to be more toxic than the PHE since the four-leaf stage and those differences were accentuated with time. Plants exposed to PHE had a rhizodeposition very close from that of the unexposed ones, especially since the six-leaf stage while for plants exposed to Cd, the modifications in their rhizodeposition was accentuated with time.

Many of the rhizodeposited compounds are able to modify the dynamic of organic or metallic compounds by improving or reducing their bioavailability. Indeed, amino acids, organic acids and polysaccharides are known to chelate metals and prevent their entrance into the roots while lipidic compounds like fatty acids or monoglycerides are surfactant able to improve the solubilisation of organic molecules like PAHs and therefore facilitate their microbial degradation.

Supplementary material

Table S 1: Evolution of maize plant characteristics(mean values) at three development stages of maize according to the different level of pollutant exposure (Cd or PHE). For a given parameter, mean values with different letters are significantly different, after a three ways ANOVA and Wilcoxon test (n = 5, p = 0.05). 1: four-leaf stage; 2: six-leaf stage; 3: eight-leaf. R/S: Root to Shoot biomass ratio.

Pollutant concentration	Stage n°	Biomass			R/S	Surface		Chlorophyll	Amino acids	Proteins	Carbohydrates
		Leaf	Stem	Root		Leaf	Root	Leaf	Root		
		g (DW)				cm ²		mg.g ⁻¹ (DW)			
Control	1	0.19 de	0.24 d	0.86 cd	2.22 ae	86 cef	129 bde	1.12 bcf	3.5 a	1.9 a	22.3 a
	2	0.99 cfghi	0.88 cdefgh	1.61 cdef	0.91 c	352 dghi	341 bcdefg	1.14 abcf	4.3 a	2.5 a	17.2 a
	3	1.5 cfghi	1.45 efgh	3.26 ef	1.21 ce	476 deg hi	410 fg	0.37 de	8.0 a	2.3 a	36.2 a
100 mg.kg ⁻¹ PHE	1	0.13 be	0.09 b	0.84 cd	3.81 a	63 bcf	148 de	1.25 abf	4.3 a	2.0 a	15.5 a
	2	0.77 fh	0.65 ceg	0.82 cd	0.58 d	264 dg	266 cef	1.03 cf	6.6 a	3.3 a	22.1 a
	3	1.4 g	1.69 fh	2.09 ef	0.71 bcd	452 hi	332 fg	0.3 de	5.6 a	2.8 a	17.1 a
250 mg.kg ⁻¹ PHE	1	0.09 b	0.06 ab	0.66 abcd	4.52 a	50 abf	102 bd	1.32 abcf	5.4 a	3.4 a	33.1 a
	2	0.67 h	0.5 ceg	0.85 cd	0.77 bcd	260 dg	213 cef	1.21 abcf	9.1 a	4.7 a	22.6 a
	3	1.89 i	1.87 h	2.45 f	0.69 bcd	528 i	443 g	0.32 de	8.8 a	3.2 a	28.9 a
40 µM Cd	1	0.08 ab	0.05 ab	0.53 abc	5.16 a	49 ab	75 ab	1.41 a	4.2 a	2.5 a	23.6 a
	2	0.42 cd	0.31 cd	0.56 bcd	0.81 bcd	159 cde	160 bcde	0.81 cde	9.1 a	3.2 a	12.0 a
	3	1.07 fg	0.94 ef	1.32 de	0.65 bd	384 gh	251 cf	0.81 d	7.5 a	2.8 a	31.6 a
100 µM Cd	1	0.04 a	0.03 a	0.29 a	4.3 a	32 a	39 a	1.51 ab	6.0 a	3.0 a	30.6 a
	2	0.13 be	0.06 ab	0.23 ab	1.13 bce	60 abcf	60 a	1.02 abcf	7.2 a	3.1 a	20.3 a
	3	0.47 ch	0.42 cdg	0.58 cd	0.7 bcd	167 d	136 cde	0.39 e	6.9 a	2.6 a	28.4 a

Table S 2: Evolution of total carbon, carbohydrates, amino acid and protein content in the two rhizodeposit solutions at three development stages of maize according to the pollutant exposure level (Cd or PHE). Expressed in mg of metabolite per gram of dry root. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different, after a three ways ANOVA and Wilcoxon test ($n = 5$, $p = 0.05$). 1: four-leaf stage; 2: six-leaf stage; 3: eight-leaf.

Pollutant concentration	Stage n°	Diffusate solution (per hour)				Rhizospheric sand extract			
		Organic carbon	Carbohydrates	Amino acids	Proteins	Organic carbon	Carbohydrates	Amino acids	Proteins
		mg.g ⁻¹				mg.g ⁻¹			
Control	1	0.217 a	0.250 a	0.036 a	0.007 a	0.128 bf	0.963 a	0.061 a	0.043 de
	2	0.246 abcde	0.100 a	0.012 a	0.011 a	0.256 abcef	1.117 a	0.191 a	0.092 abcde
	3	0.842 e	0.160 a	0.100 a	0.004 a	0.846 abcde	0.415 a	0.060 a	0.040 e
100 mg PHE.kg ⁻¹	1	0.13 b	0.172 a	0.021 a	0.012 a	0.101 f	0.422 a	0.069 a	0.054 bde
	2	0.219 abd	0.212 a	0.064 a	0.014 a	0.139 bf	1.117 a	0.233 a	0.121 ac
	3	0.584 ce	0.15 a	0.086 a	0.004 a	0.338 ac	0.320 a	0.057 a	0.036 e
250 mg PHE.kg ⁻¹	1	0.134 b	0.289 a	0.012 a	0.019 a	0.098 f	0.823 a	0.065 a	0.065 abde
	2	0.162 ab	0.176 a	0.047 a	0.019 a	0.114 bf	0.866 a	0.091 a	0.143 abcd
	3	0.342 cd	0.099 a	0.077 a	0.004 a	0.417 c	0.387 a	0.165 a	0.040 e
40 μM Cd	1	0.391 abcde	0.467 a	0.060 a	0.013 a	0.182 ab	0.807 a	0.077 a	0.121 ab
	2	0.228 acd	0.245 a	0.049 a	0.019 a	0.187 abc	1.007 a	0.123 a	0.189 ac
	3	0.490 ce	0.109 a	0.058 a	0.005 a	0.526 ce	0.262 a	0.135 a	0.067 abde
100 μM Cd	1	0.152 ab	0.122 a	0.022 a	0.020 a	0.214 a	0.832 a	0.145 a	0.162 ac
	2	0.277 abcde	0.250 a	0.006 a	0.036 a	1.395 d	1.800 a	0.072 a	0.594 c
	3	0.428 cde	0.148 a	0.017 a	0.007 a	0.873 de	0.715 a	0.138 a	0.143 ac

Table S 3 : Evolution of mono and disaccharide content in the rhizospheric sand extract and in the diffusate solution at three development stages of maize according to the pollutant exposure level (Cd or PHE). Expressed in μg of metabolite per gram of dry root and per hour. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different, after a three ways ANOVA and Wilcoxon test ($n = 5, p = 0.05$). 1: four-leaf stage; 2: six-leaf stage; 3: eight-leaf.

Pollutant concentration	Stage n°	Rhizospheric sand extract	Diffusate solution (per hour)							
		Hydrolysed glucose	xylose	rhamnose	fructose	glucose	mannose	mannitol	sucrose	cellobiose
		$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$							
Control	1	< LOD	145.00 acf	< LOD	250.97 i	268.26 a	< LOD	< LOQ	< LOQ	61.11 h
	2	6.10 f	10.78 d	< LOD	0.47 fh	0.16 g	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOQ
	3	39.12 cde	12.68 dgh	< LOD	126.59 j	15.73 de	< LOQ	< LOD	35.21 f	3.44 acdeg
100 mg PHE.kg ⁻¹	1	< LOD	111.02 abcdef	< LOD	1.30 f	1.96 f	< LOD	< LOQ	< LOQ	3.01 ag
	2	10.98 b	19.23 de	< LOD	2.48 efh	0.53 g	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOQ
	3	9.20 bf	33.99 bce	< LOD	56.46 ac	36.14b	< LOQ	< LOD	0.24 ac	1.70 ceg
250 mg PHE.kg ⁻¹	1	< LOD	222.98 f	< LOD	455.00 g	68.87 c	< LOD	< LOQ	< LOQ	51.35 bh
	2	13.16 be	14.16 h	< LOD	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOQ
	3	6.38 f	3.12 g	< LOD	53.42 c	8.44 ef	< LOQ	< LOD	0.53 ad	2.41 aceg
40 μM Cd	1	< LOD	62.43 abc	< LOD	47.09 abc	411.70 a	< LOD	< LOQ	< LOQ	7.43 ab
	2	11.66 b	26.03 bde	< LOD	11.10 d	11.30 e	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOQ
	3	21.57 cd	3.80 g	< LOD	36.58 a	41.88 bcd	< LOQ	< LOD	0.14 abc	2.42 acg
100 μM Cd	1	< LOD	90.29 a	< LOD	27.86 abcd	47.49 bcd	< LOD	< LOQ	< LOQ	1.83 acdefg
	2	23.9 c	148.00 af	< LOD	23.94 abcde	6.23 e	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOQ
	3	19.52 d	4.10 gh	< LOD	23.16 b	29.97 b	< LOQ	< LOD	0.74 ade	0.90 d

Table S 4 : Evolution of individual amino acid content (mean values) in the diffusate solution at three development stages of maize according to the pollutant exposure level (Cd or PHE). Expressed in μg of metabolite per gram of dry root and per hour. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different, after a three ways ANOVA and Wilcoxon test ($n = 5, p = 0.05$). 1: four-leaf stage; 2: six-leaf stage; 3: eight-leaf.

Pollutant concentration	Stage n°	Gly	Ser	Ala	Thr	Asn	Asp	Pro	His	Arg	Phe	Tyr	Trp	Gln	Glu	Val	Lys	Met	Leu
		$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$																	
Control	1	1.71 a	3.61 bdef	5.73 bcd	2.42 a	<LOD	0.99 bd	3.07 bcdefg	1.04 a	1.03 a	1.18 abcde	0.93 abcd	0.26 a	0.05 a	2.05 c	3.60 ce	3.22 f	0.27 ade	2.26 abcd
	2	1.47 a	0.21 c	3.28 bcdef	0.42 a	<LOD	9.94 abcdef	0.41 bc	0.12 a	0.26 a	0.23 b	0.20 bc	0.05 a	0.31 a	6.02 abce	1.80 abce	0.38 b	0.09 abd	0.63 b
	3	0.86 a	3.75 bef	2.39 d	0.72 a	<LOD	3.74 df	3.13 eg	1.15 a	0.51 a	1.25 abcde	2.89 d	0.53 a	1.03 a	9.20 be	3.49 e	1.01 abc	0.08 ad	1.20 abc
100 mg PHE.kg ⁻¹	1	1.09 a	0.30 ac	1.06 e	1.43 a	<LOD	1.50 bd	0.18 b	0.26 a	0.45 a	0.60 abc	0.46 abc	0.15 a	<LOD	4.71 bc	1.96 ab	0.71 abc	0.21 de	1.19 abc
	2	2.27 a	0.87 a	10.38 bcd	0.98 a	0.09 ab	6.41 abcdef	1.47 cg	1.33 a	1.91 a	1.3 cde	1.10 ad	0.27 a	0.20 a	16.59 be	3.97 ce	3.29 ef	0.78 c	3.63 d
	3	1.71 a	5.82 bf	4.35 bcd	0.98 a	0.41 b	9.73 ce	7.67 f	1.61 a	1.74 a	2.07 acde	2.85 d	0.30 a	1.07 a	12.89 e	3.17 ace	1.89 acef	0.19 ade	1.55 abcd
250 mg PHE.kg ⁻¹	1	0.73 a	0.39 ac	0.62 f	0.66 a	<LOD	0.88 b	0.10 b	0.10 a	0.43 a	0.29 b	0.23 c	0.07 a	0.03 a	2.23 c	0.99 b	0.43 ab	0.14 ade	1.17 abcd
	2	1.23 a	0.90 acd	2.97 bd	0.61 a	0.10 ab	1.52 bd	0.89 c	1.06 a	1.59 a	0.90 abcde	0.85 abcd	0.32 a	0.06 a	7.59 be	4.00 e	1.89 cef	0.88 ce	2.65 abcd
	3	1.25 a	4.13 bdef	3.37 d	1.5 a	0.09 ab	6.53 ef	6.23 df	1.07 a	0.48 a	1.48 acde	2.43 d	0.36 a	0.35 a	11.96 e	3.67 e	1.12 abce	0.06 ab	1.54 abcd
40 μM Cd	1	2.42 a	1.72 abcde	3.06 abcdef	0.61 a	<LOD	4.98 abcdef	0.79 abc	0.33 a	0.67 a	0.54 abc	0.40 abc	0.08 a	0.35 a	3.23 abc	1.83 ab	0.97 abc	0.05 a	0.97 ab
	2	12.38 b	8.80 bf	20.44 bcd	6.41 a	<LOD	29.14 ace	6.15 def	7.17 a	1.59 a	2.65 d	1.71 abd	0.28 a	0.71 a	75.78 d	18.56 d	16.07 d	1.33 c	11.03 e
	3	1.29 a	5.04 bf	5.82 bc	2.31 a	3.04 b	9.47 ce	7.24 def	1.25 a	0.89 a	1.73 de	2.71 d	0.17 a	1.54 a	12.75 e	3.83 e	0.71 abc	0.07 abd	1.76 c
100 μM Cd	1	0.87 a	0.25 ac	0.19 a	0.90 a	<LOD	0.73 abd	<LOD	0.17 a	0.23 a	0.28 ab	0.61 abcd	0.03 a	<LOD	0.50 a	1.00 abc	0.49 ab	0.01 b	1.09 abcd
	2	1.03 a	1.53 acde	3.24 bdef	0.49 a	0.26 ab	2.82 bdf	0.26 abc	1.22 a	1.39 a	0.98 abcde	0.50 abc	0.29 a	0.05 a	9.83 bce	1.47 abce	3.05 abcdef	0.36 abcde	3.61 abcde
	3	0.49 a	5.95 f	7.07 c	3.11 a	4.65 b	21.42 c	4.46 de	0.91 a	1.04 a	0.95 ace	1.42 ad	0.06 a	0.99 a	10.40 be	3.09 ace	1.31 ace	0.04 ab	2.11 acd

Table S 5 : Evolution of individual compounds measured by GC-MS (log of mean values) in the diffusate solution at three development stages of maize according to the pollutant exposure level (Cd or PHE). Expressed in log(pic area) per gram of dry root and per hour. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different, after a three ways ANOVA and Wilcoxon test ($n = 5, p = 0.05$). 1: four-leaf stage; 2: six-leaf stage; 3: eight-leaf. Amino acids are abbreviated according to their three letter international codes.

Pollutant concentration		Control			100 mg PHE.kg ⁻¹			250 mg PHE.kg ⁻¹			40 µM Cd			100 µM Cd		
Stage n°		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Organic acids	Valeric acid	4.09 c	3.43 d	2.57 e	4.09 bc	3.53 ad	2.66 e	4.41 b	3.53 d	2.88 f	<LOQ	3.76 a	3.48 d	<LOQ	4.13 bc	3.74 ad
	Lactic acid	3.60 bcf	3.02 g	3.36 bcfg	3.52 bf	3.57 bcf	3.87 abcef	3.99 ace	3.64 abcf	3.13 fg	<LOQ	3.73 abc	4.75 d	<LOQ	4.30 ade	4.38 de
	Glycolic acid	3.53 cd	3.65 cde	2.51 bf	3.64 d	3.90 ae	2.45 f	3.84 de	3.97 ae	2.49 f	<LOQ	4.12 a	2.94 b	<LOQ	4.19 a	3.3 c
	Caproic acid	2.99 g	4.10 adh	3.03 fg	3.09 fg	4.32 ah	3.01 fg	3.37 cef	4.20 h	3.25 ef	<LOQ	4.42 a	3.48 cde	<LOQ	4.87 b	3.62 cd
	Hydracrylic acid	3.47 cde	3.38 cde	2.48 f	3.24 bc	3.52 e	2.58 f	3.41 cde	3.57 de	2.44 f	<LOQ	3.80 a	3.02 b	<LOQ	3.95 a	3.18 bcd
	3-Hydroxybutanoic acid	3.44 bc	2.88 ef	2.91 df	3.30 b	3.26 be	3.07 bdef	3.68 c	3.27 be	2.74 f	<LOQ	3.47 abc	3.35 bcd	<LOQ	4.08 a	3.32 b
	4-Hydroxybutanoic acid	3.44 bc	2.88 ef	2.91 df	3.30 b	3.26 be	3.07 bdef	3.68 c	3.26 be	2.74 f	<LOQ	3.88 ab	3.35 bd	<LOQ	4.53 a	3.32 b
	Benzoic acid	3.81 de	3.55 cd	2.79 b	3.77 d	3.80 de	2.92 b	4.12 ae	3.76 cd	2.93 b	<LOQ	4.15 a	3.05 b	<LOQ	4.54 a	3.46 c
	Succinic acid	3.46 abdef	3.46 abdef	3.13 fg	3.35 def	3.48 bef	3.17 defg	3.49 abdef	3.57 abdef	2.41 g	<LOQ	3.74 ab	3.83 acd	<LOQ	4.08 c	3.98 abcde
Nonanoic acid	3.30 eg	3.42 efg	2.09 d	3.23 e	3.59 bf	2.29 d	3.52 fg	3.53 befg	2.32 d	<LOQ	3.76 ab	2.45 cd	<LOQ	3.89 a	2.88 c	
Fatty acids	Octanoic acid	2.64 de	2.98 ef	1.96 c	2.36 bd	3.26 af	2.07 c	2.57 de	3.15 f	2.16 c	<LOQ	3.38 a	2.20 bc	<LOQ	3.58 a	2.61 de
	Palmitic acid	4.20 c	3.61 fg	3.52 g	3.90 bf	4.03 abd	3.88 bf	4.27 acd	3.86 bdfg	3.66 fg	<LOQ	4.54 abcd	3.96 abcd	<LOQ	5.34 e	4.28 ac
	Stearic acid	4.08 b	3.62 adefg	3.23 fg	3.88 ad	3.81 ad	3.51 ef	4.19 b	3.76 ade	3.30 g	<LOQ	4.37 ab	3.68 de	<LOQ	5.13 c	3.99 abd
	Dodecanoic acid	3.46 f	3.27 ef	2.20 d	3.19 af	3.39 ef	2.40 d	3.56 bc	3.49 abef	2.31 d	<LOQ	3.71 ab	2.55 d	<LOQ	4.00 c	2.71 e
Monoglycerides	1-Monomyristin	3.31 ade	2.89 g	2.96 fg	3.25 ade	3.21 adefg	3.22 defg	3.64 bc	3.27 abdefg	3.16 ef	<LOQ	3.46 ab	3.50 abcd	<LOQ	4.03 c	3.87 c
	2-Palmitoylglycerol	3.37 ad	2.90	2.87 fg	3.36 ad	3.22 de	3.00 efg	3.71 b	3.26 def	2.88 g	<LOQ	3.53 ab	3.30 ad	<LOQ	4.20 c	3.62 b
	1-Monopalmitin	5.14 bcf	4.60 h	4.77 gh	5.06 bef	4.94 efg	4.97 efg	5.46 acd	4.98 bcefgh	4.89 eg	<LOQ	5.23 abc	5.28 abc	<LOQ	5.88 d	5.57 ad
	1-Monostearin	4.90 cef	4.44 g	4.65 efg	4.89 ef	4.82 ef	4.77 ef	5.31 ab	4.89 bcef	4.68 fg	<LOQ	5.17 abc	5.02 abce	<LOQ	5.83 d	5.28 a
Alcohols	2-Ethylhexanol	2.21 eh	3.79 df	2.61 gh	1.86 e	4.10 af	2.82 g	2.14 e	3.94 af	2.81 g	<LOQ	4.17 a	3.18 c	<LOQ	4.73 b	3.37 cd
	2-Butoxyethanol	2.99 e	4.96 a	3.07 cde	3.07 de	4.91 a	3.06 de	3.37 bcd	4.73 a	3.29 cd	<LOQ	4.99 a	3.57 bc	<LOQ	5.20 ab	3.70 b
	Xylitol	3.46 b	2.33 de	2.70 cde	2.23 e	2.61 cde	3.51 abcde	3.42 abcde	2.61 cde	2.94 abcde	<LOQ	3.30 abc	2.85 acd	<LOQ	3.62 ab	2.89 ac
Other	Dopamine	4.56 f	4.37 ef	3.54 d	4.64 af	4.54 ef	3.61 d	4.93 bc	4.59 abef	3.61 d	<LOQ	4.86 ab	3.83 d	<LOQ	5.24 c	4.32 e
	Urea	3.64 a	3.68 a	3.31 a	3.80 a	4.10 a	3.50 a	3.43 a	3.82 a	3.72 a	<LOQ	3.97 a	3.63 a	<LOQ	4.68 a	4.09 a

Table S 6 : Evolution of individual amino acid content (mean values) in the rhizospheric sand extract at three morphological stages according to the pollutant exposure level (Cd or PHE). Expressed in μg of metabolite per gram of dry root and per hour. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different ($n=5$, $p=0.05$). Amino acids are abbreviated according to their three letter international codes.

Pollutant concentration	Stage n°	His	Arg	Phe	Tyr	Trp	Glu	Val	Lys	Met	Leu
		$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$									
Control	1	1.3 b	2.65 ac	0.23 e	0.49 e	0.14 af	8.24 ae	6.73 de	10.67 dg	0.22 abc	0.23 f
	2	1.1 abc	3.03 abc	1.80 bd	0.95 cef	0.38 abde	9.78 acde	0.25 fg	4.01 b	0.95 efh	3.09 abdg
	3	0.54 ac	3.74 abc	1.83 abcd	0.72 ef	0.19 af	7.34 acde	1.25 a	0.22 ef	0.37 abcg	1.55 abcde
100 mg PHE.kg ⁻¹	1	1.82 b	2.17 ac	1.03 d	0.65 e	0.14 af	14.77 a	<LOD	2.35 a	0.36 abch	2.62 ab
	2	2.12 bf	5.06 abc	4.38 acf	2.33 abd	1.20 cde	1.56 c	<LOD	4.34 abcdefg	1.77 e	3.64 abcdefg
	3	0.92 abc	4.27 bc	1.60 abde	1.63 abcef	0.25 abf	0.42 cd	0.24 cfg	<LOD	0.22 bc	1.05 cde
250 mg PHE.kg ⁻¹	1	2.39 bcef	2.11 abc	0.72 de	0.62 e	0.03 f	11.11 a	<LOD	0.44 a	0.17 c	1.63 acd
	2	2.59 bef	7.08 bcd	5.10 abcf	2.42 abcdf	1.2 bce	1.33 cd	2.98 ab	1.54 ab	2.24 de	2.87 abcdeg
	3	1.32 b	6.20 b	4.25 cf	2.40 a	1.02 c	0.48 d	0.37 cg	0.29 ab	0.57 abfgh	0.93 ce
40 μM Cd	1	1.38 abc	3.84 abc	2.21 abcd	1.95 abc	0.33 ab	15.78 a	1.53 abc	3.34 ab	0.30 abc	2.14 abcd
	2	3.75 ef	8.29 bd	5.02 abcf	2.84 abd	1.1 c	1.52 bcd	4.24 bd	<LOD	1.53 efg	2.55 ab
	3	0.44 a	2.32 ac	1.45 d	0.77 ef	0.23 adf	0.52 cd	1.48 a	2.64 ab	0.32 abch	1.64 acd
100 μM Cd	1	<LOD	1.06 a	0.18 e	5.41 d	0.27 a	<LOD	1.18 a	13.25 c	5.76 d	0.69 ef
	2	8.55 e	20.18 bd	5.85 f	3.50 ad	0.59 abcde	2.07 bcde	15.26 e	<LOD	1.11 aefgh	8.82 g
	3	1.76 bf	3.35 ac	2.26 abd	1.21 bcef	0.31 ab	0.75 cd	1.83 ab	2.18 ab	0.54 abh	3.45 bg

Table S 7 : Evolution of individual compounds measured by GCMS (log of mean values) in the rhizospheric sand extract at three morphological stages according to the pollutant exposure level (Cd or PHE). Expressed in log(pic area) per gram of dry root and per hour. For a given parameter, mean values with different letters are significantly different (n=5, p=0.05). Amino acids are abbreviated according to their three letter international codes.

Pollutant concentration		Control			100 mg PHE.kg ⁻¹			250 mg PHE.kg ⁻¹			40 µM Cd			100 µM Cd		
Stage n°		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Organic acids	Lactic acid	3.84 bcd	3.57 bcdefg	3.17 efg	4.29 abd	3.65 bcde	3.18 fg	3.84 bcd	3.61 cdef	3.16 g	4.08 ab	3.78 bcde	3.63 bcdef	4.32 a	4.52 a	3.72 c
	Caproic acid	2.87 f	3.28 cdg	2.88 fg	2.85 f	3.40 cd	3.39 cd	3.25 dg	3.30 d	3.57 c	3.54 abcd	3.57 ac	3.86 b	4.12 abe	4.25 e	4.07 e
	Glycolic acid	3.56 cdf	3.79 acdefg	3.29 fg	3.60 cdf	3.84 ae	3.12 g	3.84 ae	3.44 dfg	3.51 defg	4.07 a	4.05 ac	3.79 acdefg	4.49 b	4.75 b	3.99 a
	Methylvaleric acid	3.49 bc	3.17 bdef	2.62 fg	3.40 b	3.19 bde	2.46 g	3.56 abcd	3.33 bd	2.58 fg	3.53 abcd	3.43 b	2.91 ef	3.75 a	3.94 ac	3.14 d
	3-Hydroxybutyric acid	4.39 cde	4.18 bcdefg	3.66 fg	4.21 de	4.00 efg	3.57 g	4.64 abc	4.07 def	4.13 de	4.69 abc	4.39 bcd	4.20 d	4.79 a	4.90 a	4.72 ab
	Benzoic acid	4.23 bce	3.79 defgh	3.46 gh	4.31 bce	3.91 df	3.17 h	4.59 ab	4.00 cdef	3.36 gh	4.54 abc	4.14 bcde	3.70 fg	4.67 a	4.68 a	3.99 d
	Nonanoic acid	3.67 aef	3.25 cdeghi	2.63 i	3.59 acef	3.36 cdg	2.75 i	3.74 af	3.28 dgh	3.03 h	3.81 a	3.56 cdef	3.29 g	4.26 b	4.26 b	3.45 cdeg
	Azelaic acid	4.24 abc	4.08 abc	3.41 e	3.86 bc	3.77 c	3.07 fg	4.01 ab	3.69 ce	2.86 g	4.07 abc	4.22 a	3.53 bcdef	4.11 abc	4.12 abc	3.29 d
Succinic acid	5.00 b	3.93 cdefgh	3.05 gh	4.98 b	3.71 ce	3.00 h	5.15 b	3.49 cefg	3.32 f	5.36 a	3.75 c	3.45 ef	5.49 ab	4.45 d	3.59 ce	
Fatty acids	Octanoic acid	5.00 d	4.61 efh	4.22 h	4.94 cde	4.74 cef	4.26 h	5.25 bg	4.74 cef	4.33 h	5.64 ab	4.97 cde	4.64 f	5.58 a	5.51 ab	5.16 cdg
	Decanoic acid	3.37 bd	2.58 eg	2.06 h	3.31 bd	2.93 f	2.01 h	3.51 abd	2.96 f	2.28 eh	3.61 ab	3.32 d	2.55 e	3.92 c	3.90 ac	2.84 fg
	Dodecanoic acid	4.01 f	3.45 d	2.89 g	4.07 ce	3.89 f	2.69 g	4.17 acef	3.95 ef	2.99 g	4.29 a	4.22 ac	3.41 d	4.48 b	4.74 b	3.49 d
	Myristic acid	3.58 cf	3.43 ef	2.49 g	3.56 cf	3.58 acf	2.33 g	3.65 acf	3.62 acf	2.55 dg	3.75 a	3.81 ac	2.88 d	4.13 b	4.31 b	3.14 e
	Palmitoleic acid	3.12 e	3.58 bceghi	2.50 h	3.25 ef	3.85 c	2.43 h	3.62 bceg	3.25 efg	2.70 hi	3.99 abc	4.12 a	3.05 e	4.48 ad	4.78 d	3.37 bfg
	Palmitic Acid	4.78 c	4.30 d	4.22 d	4.84 c	4.73 c	3.71 e	5.02 ac	4.68 c	4.04 d	5.09 a	4.87 c	4.28 d	5.36 b	5.40 b	4.79 c
	Oleic Acid	3.83 ac	3.44 f	2.14 e	3.79 cf	3.87 c	0.00 g	3.83 c	3.70 cf	2.55 d	4.04 a	3.98 ac	2.61 de	4.48 b	4.55 b	2.97 d
	Stearic acid	4.50 cef	4.38 ef	4.37 f	4.60 ce	4.62 cef	3.84 d	4.77 acef	4.63 cef	3.79 d	4.93 a	4.70 c	3.88 d	5.23 b	5.42 b	4.6 cef
Monoglycérides	2-Palmitoylglycerol	3.71 ab	3.64 abh	3.11 gi	3.67 ab	3.92 bce	2.88 g	3.74 ab	4.03 ce	3.24 hi	3.83 abc	4.18 de	3.57 a	4.70 d	4.73 f	3.83 bc
	1-Monopalmitin	5.53 ab	5.88 bd	4.86 g	5.4 a	6.11 cde	4.68 g	5.38 a	6.25 ce	4.92 g	5.60 ab	6.36 e	5.41 a	6.07 cd	6.90 f	5.50 a
	2-Monostearin	3.70 hi	3.70 bghi	2.63 j	3.65 hi	4.01 ace	2.63 j	3.74 abi	4.14 ce	2.79 j	3.94 abc	4.24 e	3.32 g	4.36 d	4.84 f	3.57 h
Other	Xylitol	0.00 e	3.14 abcd	2.72 bed	3.89 a	2.63 bd	2.35 bd	3.58 a	2.57 bd	2.37 d	3.81 a	3.18 abc	2.64 bd	3.69 a	3.55 a	3.07 c
	Urea	2.42 be	4.21 g	2.32 bef	4.15 acg	2.56 bef	2.24 bf	2.60 e	2.84 bde	1.96 f	3.62 abcde	2.24 b	2.29 bef	3.82 ac	3.51 ad	4.14 cg
	Dopamine	4.73 ad	4.48 def	3.67 g	4.75 ad	4.59 adf	3.76 g	4.78 ad	4.66 adf	3.88 g	4.99 ab	4.81 ad	4.16 e	5.31 c	5.35 bc	4.45 f

Conclusion et discussion

La biomasse de chacun des organes (feuilles, tiges et racines) diminue lorsque les plantes sont exposées au Cd ou au PHE. Cette diminution est graduelle et corrélée avec la concentration en polluant. Plus la concentration en Cd ou en PHE est importante et plus la biomasse diminue. Elle diminue d'ailleurs davantage en présence de Cd que de PHE. Les mêmes tendances sont observées concernant la surface du système racinaire et la surface foliaire. Dans les chapitres précédents, comme dans la littérature nous avons pu observer une modification de l'allocation de la biomasse au profit des racines en présence de polluants organiques ou métalliques (Dupuy *et al.*, 2016; Perriguet *et al.*, 2008; Rellán-Álvarez *et al.*, 2006a). Cette modification de l'allocation de la biomasse est mesurable par le ratio R/S. Ce dernier augmente en présence de polluants pour les plantes au stade quatre-feuilles mais ce n'est en revanche pas le cas pour les stades à six et huit-feuilles. Effectivement dans les chapitres précédents, le ratio était maximum à 20 μM de Cd et 50 mg PHE.kg⁻¹ puis diminuait après. Il est ainsi possible que les concentrations en polluants appliquées soient trop importantes et ne permettent plus d'assurer la croissance des racines. Concernant leur composition biochimique, nous avons pu noter une augmentation de la teneur en acides aminés, surtout aux stades quatre et six feuilles. Cette observation concorde avec ce que nous avons pu observer précédemment et dans d'autres études du fait de la mise en place d'une réponse face au stress oxydatif provoqué par l'exposition aux polluants (Costa & Spitz, 1997; Hare & Cress, 1997; Shah & Dubey, 1997; Zhang *et al.*, 2007). En effet, certains acides aminés comme la proline sont des molécules anti-oxydantes émises spécifiquement par la plante pour atténuer le stress oxydatif. D'autres part, quel que soit le stade de développement, nous observons une augmentation de la teneur protéique des racines, significative dans le cas des extraits de sable rhizosphérique. Nous n'avons pas observé cette augmentation dans les chapitres précédents alors que cette tendance a été documentée dans la littérature. En effet, en présence de Cd ou de stress abiotiques, la plante produit des protéines appelées Heat Shock Proteins (Bauman *et al.*, 1993; Leita *et al.*, 1991). Ces dernières sont notamment connues dans le cas d'une exposition à des éléments traces métalliques pour améliorer la tolérance de la plante à ces polluants et les chélater (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Hall, 2002).

Du même que la biochimie et la morphologie de la plante sont affectées par la présence de polluants organiques ou métalliques, la composition des rhizodépôts émis dans la rhizosphère

est également modifiée (Figure 72). La quantité de carbone rhizodéposé est peu impactée par la présence de polluants organiques ou métalliques avec des modifications le plus souvent non-significatives comme on avait pu l'observer pour les chapitres précédents.

En ce qui concerne les sucres, ils sont globalement négativement impactés par la présence de polluants, qu'il s'agisse de sucres exsudés dans la solution de diffusats ou de sucres secrétés dans les extraits de sable rhizosphérique. En effet leur concentration diminue en présence de Cd ou de PHE au stade quatre-feuilles et au stade huit-feuilles tandis que leur teneur augmente dans les deux solutions au stade six-feuilles. Le stade huit-feuilles correspond approximativement au stade étudié dans les précédents chapitres. A ce stade, pour le Cd, la baisse des sucres diffusés et secrétés coïncide avec ce que nous avons pu mesurer au chapitre III. Dans la littérature, la présence de Cd induit une diminution de l'exsudation de sucres diffusés et ce dès une exposition à 5 μM de Cd (Luo *et al.*, 2014). Pour le PHE en revanche, nous avons observé au chapitre IV, une diminution des sucres secrétés comme c'est le cas ici mais une augmentation significative des sucres simples diffusés que nous n'observons pas dans ce chapitre.

La diffusion d'acides aminés, quant à elle, est négativement affectée par la présence des polluants organiques ou métalliques au stade quatre-feuilles alors que passé ce stade, leur concentration augmente dans les solutions de rhizodépôts. Cette augmentation au stade huit-feuilles n'avait pas été observée dans le chapitre III, où le Cd affectait négativement la concentration en acides aminés. En revanche, des concentrations plus faibles en PHE entraînaient plutôt une augmentation de la teneur en acides aminés. Dans les extraits de sable rhizosphérique, nous observons globalement une augmentation de la teneur en acides aminés secrétés, quel que soit le stade de développement et que le polluant soit organique ou métallique. Une publication de Fu *et al.* (2018) tend à montrer que la rhizodéposition des acides aminés serait très dépendante de l'espèce utilisée. Leur expérience montre que sur deux lignées de riz exposées au Cd, l'une augmente de façon significative la sécrétion de ses acides aminés tandis que sur l'autre aucune modification n'est observée.

La rhizodéposition des protéines se rapproche de celle des acides aminés. Elles tendent à augmenter dans les solutions de diffusats, de façon non significative, et significativement dans les extraits de sable rhizosphérique, surtout dans les solutions issues des deux premiers stades de développement. Cette augmentation n'était en revanche pas visible à des concentrations plus basses en polluants, comme c'était le cas dans les précédents chapitres. Le Cd provoquait une diminution des protéines secrétées dans les extraits de sable rhizosphérique tandis que dans les

solutions de diffusats, leur teneur était similaire malgré l'exposition au polluant. Le PHE quant à lui induisait bien une augmentation non significative des protéines diffusées comme c'est le cas dans ce chapitre mais ne provoquait pas de modification de leur teneur dans les extraits de sable rhizosphériques. Au contraire, Muratova et al. (2009) avaient observé une diminution de la teneur en protéines exsudées par *Sorghum bicolor* en présence de PHE.

Même si l'émission d'acides aminés, de protéines et de sucres est modifiée par la présence de polluants ou selon le stade de développement, c'est la quantité d'acides organiques et de composés lipidiques qui semble être davantage impactée par l'exposition aux polluants. En effet, quelle que soit la concentration en Cd ou en PHE et quel que soit le stade de développement, nous observons une augmentation des concentrations en acides organiques et en composés lipidiques tels que les acides gras ou les monoglycérides dans les deux solutions de rhizodépôts. Cette tendance était également visible dans les chapitres précédents à l'exception des solutions de diffusat issues de plantes exposées à des concentrations plus faibles en PHE. Une augmentation de la teneur en acides organiques rhizodéposés en présence d'un polluant métallique est une réaction classiquement observée dans la littérature (Pinto *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011).

Dans les précédents chapitres comme dans celui-ci nous avons pu observer une toxicité plus importante du Cd par rapport à celle du PHE, qui se traduit par les chloroses et les nécroses sur les plantes exposées au Cd ou par la biomasse plus fortement diminuée dans le cas d'une exposition au Cd qu'au PHE. Ces différences entre l'impact du Cd et du PHE sont également visibles au niveau de la rhizodéposition et principalement en ce qui concerne l'émission d'acides organiques et de composés lipidiques comme les acides gras ou les monoglycérides. En effet, si leur production augmente en présence de PHE en comparaison du contrôle, elle augmente davantage en ce qui concerne le Cd, surtout à la concentration d'exposition la plus élevée.

	Cd		PHE			Cd		PHE			Cd		PHE	
	○	○	○	○		○	○	○	○		○	○	○	○
Solution de diffusat	[TOC]	≈	∇*		[TOC]	≈	∇		[TOC]	∇	∇*			
	[Sucres tot.]	≈	≈		[Sucres tot.]	↗	↗		[Sucres tot.]	∇	∇			
	[Acides aminés tot.]	∇	∇		[Acides aminés tot.]	↗	↗		[Acides aminés tot.]	∇	∇			
	[Protéines tot.]	↗	↗		[Protéines tot.]	↗	↗		[Protéines tot.]	≈	↗			
	[Sucres ind.]	∇*	∇*		[Sucres ind.]	↗*	↗*		[Sucres ind.]	∇*	∇*			
	[Acides aminés ind.]	∇*	∇*		[Acides aminés ind.]	↗*	↗*		[Acides aminés ind.]	↗*	↗*			
	[Acides organiques]	↗*	↗*		[Acides organiques]	↗*	↗*		[Acides organiques]	↗*	↗*			
	[Acides gras]	↗*	↗*		[Acides gras]	↗*	↗*		[Acides gras]	↗*	↗*			
	Stade quatre-feuilles				Stade six-feuilles				Stade huit-feuilles					
Extrait de sable rhizosphérique	[TOC]	↗*	∇		[TOC]	↗*	∇		[TOC]	≈	∇			
	[Sucres tot.]	∇	∇		[Sucres tot.]	≈	≈		[Sucres tot.]	∇	∇			
	[Acides aminés tot.]	↗	↗		[Acides aminés tot.]	∇	∇		[Acides aminés tot.]	↗	↗			
	[Protéines tot.]	↗*	↗		[Protéines tot.]	↗	↗		[Protéines tot.]	↗*	≈			
	[Polysaccharides]	∅	∅		[Polysaccharides]	↗*	↗*		[Polysaccharides]	∇*	∇*			
	[Acides aminés ind.]	↗*	↗*		[Acides aminés ind.]	↗*	↗*		[Acides aminés ind.]	↗*	↗*			
	[Acides organiques]	↗*	↗*		[Acides organiques]	↗*	↗*		[Acides organiques]	↗*	↗*			
	[Acides gras]	↗*	↗*		[Acides gras]	↗*	↗*		[Acides gras]	↗*	↗*			

Figure 72 : Schéma récapitulatif de l'impact du Cd et du PHE sur le fonctionnement de la rhizodéposition à trois stades de développement.. Lorsque la modification est statistiquement significative, un * est apposé.

Conclusion générale

et perspectives

La surface de terres cultivables à l'échelle mondiale diminue d'année en année du fait de l'anthropisation qui entraîne leur érosion, leur salinisation ou encore leur pollution. Les inquiétudes grandissent quant à la sécurité alimentaire de la population mondiale croissante alors que la surface cultivable par individu diminue. A cela s'ajoute une baisse des rendements des plantes cultivées sur ces surfaces dégradées pouvant aller jusqu'à la mort du végétal. Il est ainsi crucial de pouvoir réhabiliter ces terres et de continuer à les cultiver. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'action des stress issus de l'anthropisation sur le fonctionnement des végétaux. L'influence d'un stress abiotique sur le fonctionnement de la plante a été souvent étudiée, qu'il s'agisse de stress salin, hydrique, de carences nutritives ou encore de la présence de polluants. Ces derniers induisent entre autres des perturbations de la photosynthèse et la production d'espèces réactives de l'oxygène provoquant un stress oxydatif. Ces mécanismes mis en place au sein de la plante sont bien connus tandis que l'implication de processus à l'interface entre le sol et les racines – la rhizosphère – dans la réponse aux pollutions, est méconnue. C'est en effet *via* cette zone que se fait l'absorption de nutriments, d'eau ou de polluants. Son étude est nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes de défense face à ces stress abiotiques. La rhizodéposition est un processus mal connu et c'est pourquoi nous avons focalisé notre étude sur les rhizodépôts émis par les racines dans la rhizosphère et leur modification en présence de polluants organiques et métalliques. A l'inverse, les rhizodépôts pourraient avoir un effet en retour sur la dynamique des polluants, en relarguant des molécules capables de solubiliser ou au contraire de chélater ces polluants. De façon indirecte, les rhizodépôts peuvent aussi être des chemoattractants, attirant ainsi des microorganismes capables à leur tour de modifier la dynamique des polluants dans le sol.

Pour cela, nous avons exposé des plants de maïs à des concentrations croissantes en Cd ou en phénanthrène (PHE). Ces derniers sont utilisés comme contaminants modèles des polluants métalliques et organiques. Nous nous sommes également intéressés à l'évolution de ces réponses à des stress abiotiques en fonction du développement de la plante. Afin d'approcher au mieux la diversité des molécules émises par les racines du maïs nous avons utilisés deux protocoles de collecte pour d'une part récolter le mucilage à partir de l'extraction des molécules adhérant au sable rhizosphérique et d'autre part, les exsudats diffusés à partir des racines du maïs sur une courte période. Les molécules collectées ont ensuite été dosées globalement grâce à des méthodes biochimiques et individuellement par chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse, c'est à dire GC-MS et LC-MS. La littérature scientifique a été utilisée

afin d'évaluer la signification des composés quantifiés, vis-à-vis du fonctionnement de la plante et de leurs interactions avec les polluants.

Bilan des dispositifs de culture, de collecte des rhizodépôts et des méthodes d'analyses

Afin de choisir le dispositif de culture et de collecte des rhizodépôts, plusieurs systèmes tirés de la littérature ont été testés. Le premier système de culture en conditions stériles était très difficile à mettre en place en particulier pour le maintien sur plusieurs semaines de cultures axéniques. De plus, la solution d'exsudats récoltée en continu était trop faiblement concentrée, même après lyophilisation, pour un dosage selon différentes méthodes (analyses colorimétriques, COT-mètre, spectrométrie de masse, ...). Ce dernier point est également valable pour le second dispositif testé, un dispositif de collecte en continu des rhizodépôts dans des conditions non-stériles. Nous avons donc retenu un troisième dispositif statique en condition non-stérile mais qui permet une récolte suffisante et plus facile de rhizodépôts. Ce troisième système permet la culture des plants de maïs sur sable, dans des conditions non stériles et la nutrition des plantes est assurée par l'apport d'une solution nutritive. Le sable, utilisé comme substrat, est inerte chimiquement et dépourvu de carbone et de composés qui pourraient être confondus avec les rhizodépôts. Il permet une bonne rhizodeposition et surtout la sécrétion d'une quantité plus importante de mucilage due à la présence d'une contrainte mécanique (Groleau-Renaud *et al.*, 1998b). De plus, le système retenu permet aussi bien l'exposition à des polluants métalliques et organiques que la collecte, après la récolte, du mucilage et des exsudats racinaires.

Le mucilage est collecté grâce à une extraction dans un tampon des molécules adhérant au sable rhizosphérique, la solution résultante est appelée extraction de sable rhizosphérique. Tandis que les exsudats racinaires sont collectés par diffusion simple à travers les racines dans de l'eau déminéralisée, la solution est appelée solution de diffusat. Concernant plus spécifiquement la collecte des mucilages, celle-ci est très souvent limitée dans la littérature à des plants très jeunes, quelques jours après germination, et essentiellement adaptée aux racines nodales du maïs. C'est pourquoi nous avons mis au point un nouveau protocole permettant l'extraction du mucilage sur des racines nodales et séminales et adaptable à tous types de plantes. Les exsudats racinaires ont quant à eux été collectés *via* un protocole largement utilisé dans des expériences postérieures de diffusion des racines dans de l'eau déminéralisée (Aulakh *et al.*, 2001; Jaitz *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2017). Dans chacune des solutions de rhizodépôts collectées, la présence de cellules muées ou lysées est évitée par filtration. En effet, le filtre utilisé a une porosité de 2 μm tandis que les cellules végétales mesurent entre 10 et 200 μm . Cet ensemble de protocoles

de culture et de collecte des rhizodépôts semble convenir car il permet de cultiver successivement la plante en présence d'un polluant métallique ou organique et de recueillir ensuite le mucilage et les exsudats racinaires, ce qui constitue une collection très complète des rhizodépôts, conforme à ce qui est habituellement décrit dans la littérature. Cependant, ces protocoles doivent être nuancés. En effet, la production du mucilage est réalisée tout au long de la culture dans des conditions non-stériles. Les composés collectés résultent de l'émission de mucilage mais aussi de l'action des microorganismes sur ces derniers ainsi que de la production par les microorganismes de composés pouvant être confondus avec les rhizodépôts. De plus, le protocole employé pour la récolte des exsudats racinaires est souvent décrit dans la littérature comme surestimant la rhizodéposition. Concernant les exsudats, ils sont quant à eux récoltés sur un temps très court (six heures) et l'eau déminéralisée permettant de les récolter accentue le gradient de concentration entre la racine et la solution du sol, augmentant ainsi la quantité de rhizodépôts émis dans la rhizosphère (Aulakh *et al.*, 2001). A ce jour il est donc toujours compliqué de collecter l'ensemble des rhizodépôts du fait de leur facile dégradation par les microorganismes mais aussi de leur faible concentration dans la solution du sol.

Les molécules rhizodéposées sont très nombreuses et de familles variées, c'est pourquoi nous avons utilisé des analyses très diversifiées. L'analyse du carbone organique total permet de se faire une idée de la quantité de molécules organiques émises par les racines dans la rhizosphère. Ces analyses ont été couplées à des dosages colorimétriques (protéines, acides aminés, sucres totaux) qui permettent d'avoir une vue d'ensemble des composés produits même si ces analyses sont peu sensibles. La teneur en protéines dans les solutions doit par exemple être supérieure à $1.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ces analyses ont été, pour certaines familles, complétées avec des méthodes plus sensibles de dosage des molécules individuelles, c'était le cas pour les sucres, les acides aminés et pour d'autres composés organiques tels que les acides organiques, les acides gras ou les alcools. Cependant, cette méthode nécessite l'achat de nombreux standards, c'est pourquoi, pour la GC-MS, nous avons travaillé en semi-quantitatif. C'est-à-dire que les concentrations n'ont pas pu être obtenues mais les aires de pic ont pu être comparées pour un même composé présent dans plusieurs solutions de rhizodépôts. Un autre problème réside dans la diversité des concentrations des composés récoltés, c'est notamment le cas des sucres. Par exemple dans le chapitre IV, les teneurs en fructose sont entre 200 et 400 fois plus concentrées que les teneurs en cellobiose tandis que d'autres sucres ne sont même pas détectables. Cependant si on concentre trop nos échantillons, cela risque de détériorer la colonne et si on ne concentre pas alors certains sucres ne seront pas visibles. La concentration de nos échantillons pose un autre

problème, plus spécifiquement concernant les extraits de sable rhizosphérique. En effet ceux-ci sont obtenus par extraction dans un tampon salin et en concentrant nos échantillons on va aussi concentrer les sels qui sont néfastes aux différents appareils utilisés (COT-mètres, GC-MS et LC-MS). La concentration des échantillons est donc nécessaire pour leur dosage mais ne doit pas être trop importante pour ne pas détériorer les appareils utilisés.

Composition des solutions de rhizodépôts collectées

Le système a donc permis la récolte de deux types de solutions de rhizodéposition. La première, la solution de diffusat est essentiellement composée de molécules de faible poids moléculaire : des mono et disaccharides, des acides aminés et des acides organiques. Dans les trois expériences se sont les sucres qui ont été retrouvés en plus grandes quantités et notamment le glucose et le fructose. Les quantités mesurées dans notre expérience et dans la littérature sont de même ordre de grandeur. Boeuf-Tremblay et al. (1995) ont mesuré en moyenne $0.2 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de glucides totaux dans leurs solutions d'exsudation, dans notre cas, toutes modalités confondues, elles sont comprises entre 0.2 et $2.2 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de glucides totaux pour la première expérience, entre 0.28 et $0.90 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour la seconde et entre 0.10 et $0.47 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour la dernière. Les acides aminés totaux sont également largement représentés dans les solutions de diffusat, respectivement entre 11 et 30, 16 et 24 et 12 et $100 \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour la première, deuxième et troisième expérience tandis que Boeuf-Tremblay et al. (1995) ont mesuré une concentration moyenne de $70 \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ d'acides aminés totaux dans leurs solutions. Des similitudes sont également retrouvées en comparant les acides aminés individuels dosés dans de précédents travaux et durant notre expérience. En effet, la concentration en glycine émise par *Ricinus communis* est par exemple de $0.56 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $1.68 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour l'alanine, $0.78 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour la méthionine ou encore $0.21 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour la tyrosine (Huang *et al.*, 2016). Dans le chapitre III, pour les plantes non exposées au Cd, ces valeurs sont du même ordre de grandeur et respectivement de 1.44, 2.83, 0.16 et $1.13 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour la glycine, l'alanine, la méthionine et la tyrosine. Les protéines ne sont pas habituellement décrites comme étant des composants majeurs des exsudats racinaires mais elles ont été retrouvées néanmoins en concentrations non-négligeables. Dans nos solutions de diffusat, elles sont retrouvées à des concentrations comprises entre 4 et $43 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Muratova et al. (2009) les ont dosées à des concentrations similaires chez *Sorghum bicolor* ($36 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Le reste des molécules de nos solutions ont été dosées de façon semi-quantitative et il n'est donc pas possible de les comparer aux valeurs de la littérature. Du fait de son mode de collecte et sa composition, la solution de diffusat peut être assimilée à une solution d'exsudats racinaires.

L'extrait de sable rhizosphérique est quant à lui plutôt composé de molécules de poids moléculaire plus important telles que des polysaccharides, des protéines et des molécules lipidiques. Les polysaccharides sont les composés majoritaires, et notamment lorsque qu'on les compare aux protéines. Dans la littérature, la proportion entre les polysaccharides et les protéines représente 95 % (m/m) de polysaccharides tandis que les protéines ne représentent que 5 % (Bacic *et al.*, 1986; Chaboud, 1983; Harris & Northcote, 1970). Les mêmes proportions sont retrouvées dans nos extraits de sable rhizosphérique avec entre 91 et 98 % de polysaccharides et entre 2 et 9 % de protéines toutes expériences confondues. Les polysaccharides contenus dans le mucilage du maïs ont déjà été analysés par Chaboud (1983). Leur étude a montré qu'ils étaient composés en majorité de galactose (30.7 % m/m), de glucose (18.5 %) et de fucose (19.3 %). Une étude postérieure a identifié le galactose (20.3 % m/m) et le glucose (37.9 %) comme les sucres majoritaires composant les polysaccharides présents dans le mucilage du riz (Chaboud & Rougier, 1984). Or, dans les trois expériences réalisées dans cette thèse, nous n'avons trouvé que du glucose. Cependant, avec le protocole que nous avons utilisé, le glucose et le galactose ne pouvaient être séparés du fait de leur épimérie, il était donc impossible de les quantifier individuellement. Dans la littérature, une autre famille de molécules très répandue dans les mucilages sont les phospholipides (Read *et al.*, 2003). Ils sont composés d'un ou deux acides gras largement retrouvés dans nos extraits de sable rhizosphérique. D'après Read *et al.* (2003), que le mucilage soit issu du maïs, du lupin ou du blé, les acides gras mesurés sont majoritairement saturés comme l'acide palmitique ou l'acide stéarique retrouvés dans nos solutions. La composition des extraits de sable rhizosphérique ainsi que son mode de collection nous permettent d'assimiler cette solution à une solution de mucilage.

Impact des polluants organiques et métalliques sur la morphologie et le fonctionnement du maïs

Postérieurement à la collecte des rhizodépôts, des mesures et des analyses ont été réalisées sur les plants de maïs à l'exception des mesures de l'activité photosynthétique qui ont été réalisées avant la récolte.

Dans le cas d'une exposition au Cd, ce dernier affecte négativement la biomasse de tous les organes dès 10 μM mais de façon non significative. Pour que cette baisse soit significative, il faut des concentrations d'exposition plus importantes, entre 20 et 40 μM . A ces concentrations en Cd, la baisse de la biomasse est plus importante dans les organes aériens que dans le système racinaire et se manifeste par une augmentation significative du ratio R/S (dès 20 μM). Ce paramètre traduit une allocation plus importante de la biomasse dans les racines que dans le

reste de la plante. Mais cette augmentation du ratio R/S n'est pas vraie pour toutes les concentrations, il commence à décroître passé 40 μM et dans le chapitre V, il est inférieur au témoin à 40 et 100 μM . Une diminution de la biomasse pour de fortes concentrations est en adéquation avec les mesures déjà réalisées par Perriguet et al. (2008) dont les plants de maïs n'étaient pas affectés par le Cd à de faibles concentrations (10 μM) tandis qu'une exposition plus importante (100 μM) entraînait une diminution conséquente de la biomasse de la plante. C'est aussi le cas de Lagriffoul et al. (1998) qui constatent que des changements morphologiques sur le maïs n'interviennent que pour les hautes concentrations en métal. En effet, à des concentrations inférieures à 10 μM , ils ne constatent aucune apparition de symptômes foliaires, pas de baisse de la biomasse, ni de la longueur des racines ou de la surface foliaire. L'exposition au Cd semble affecter l'activité photosynthétique, mesurée grâce aux échanges de CO_2 et d' H_2O , qui tend à diminuer de façon non significative. Une diminution de la photosynthèse a déjà été observée en présence de Cd (Clijsters & Van Assche, 1985; Küpper *et al.*, 2002, 2007; Lagriffoul *et al.*, 1998). Elle est due, entre autres, à la compétition entre le Cd et le Mg. De par leurs analogies structurales, le Cd peut se substituer au Mg dans certaines enzymes telles que la RuBisCo, la rendant non fonctionnelle, ou encore au centre des pigments de chlorophylle (Küpper *et al.*, 2007). Les mesures biochimiques réalisées sur nos plants de maïs montrent assez peu de différences significatives. Cependant la teneur en acides aminés tend à augmenter en présence de Cd. Il semblerait qu'ils fassent partie, au même titre que les acides organiques, de l'arsenal de molécules déployées lors d'une exposition à des ETM (Manara, 2012). Leurs groupements carboxyle, amine ou imidazole leur permettent de chélater les métaux. L'histidine possède d'ailleurs ces trois groupements et est considérée comme l'acide aminé le plus important en cas de stress par des ETM (Manara, 2012; Rauser, 1999).

L'exposition au PHE quant à elle affecte également la croissance du maïs et ce dès 50 mg PHE.kg⁻¹. Il en est de même pour la surface foliaire et la surface racinaire qui diminuent graduellement avec l'exposition au PHE. Cependant, aucune modification de la coloration foliaire n'a été observée quel que soit l'âge ou la concentration en PHE. Ces modifications interviennent malgré un niveau supposément très faible en PHE à la fin de la culture. En effet, si nous n'avons pas mesuré la concentration en PHE à la fin de la culture, cette mesure a été réalisée dans une autre expérience dont les concentrations en PHE et les conditions de culture sont très similaires (Dupuy *et al.*, 2015). Cependant, malgré une dégradation rapide du PHE, Dupuy et al. (2015) ont également observé une inhibition de la croissance de maïs qui pourrait être due à des effets précoces du PHE ou à ses métabolites. De plus, comme pour le Cd, grâce

au ratio R/S nous avons pu observer une modification de l'allocation de la biomasse au sein de la plante due à la présence du polluant. Ce ratio augmente significativement et ce dès 25 mg PHE.kg⁻¹. La même tendance a déjà été observée, que l'exposition au PHE soit racinaire ou atmosphérique (Desalme *et al.*, 2011; Dupuy *et al.*, 2015, 2016). L'effet du PHE sur la photosynthèse n'est en revanche pas celui que nous attendions. Nous avons pu observer une augmentation significative de l'activité photosynthétique dès 25 mg.kg⁻¹ alors qu'au contraire, dans la littérature c'est classiquement l'effet inverse qui est observé (Liu *et al.*, 2009a; Oguntimehin *et al.*, 2008). A l'exception de Li *et al.* (2008) qui ont également pu observer une augmentation de l'activité photosynthétique du riz soumis à des concentrations en HAP inférieures à 200 mg.kg⁻¹ qu'ils ont expliquée par un accroissement concomitant de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD). Cette dernière a en effet un rôle protecteur de l'appareil photosynthétique, dont les chloroplastes. Ces derniers sont sensibles à la présence d'espèce réactives de l'oxygène (Halliwell, 1984; Li *et al.*, 2008; Monk *et al.*, 1989, p. 89). Enfin, comme pour les plants exposés au Cd, l'exposition au PHE induit une augmentation de la teneur en acides aminés significative dans les racines et les feuilles du maïs.

Des phénomènes comme l'augmentation du ratio R/S et la production d'acides aminés sont souvent observés en réaction à des stress abiotiques et pas seulement ceux liés à la présence de polluants. Une modification de l'allocation de la biomasse au profit des racines a en effet déjà été observée en présence de stress hydrique ou de stress salin par exemple (Lisar *et al.*, 2012; Meyer & Boyer, 1981; Nadi *et al.*, 1969; Read & Bartlett, 1972; Sharp & Davies, 1979). Cette modification du rapport entre la biomasse aérienne et racinaire montre qu'une partie de la stratégie de la plante lui permettant de mieux tolérer ces stress abiotiques réside dans le maintien de ses racines au dépend de son système aérien. Concernant la production d'acides aminés, le même phénomène est retrouvé qu'il s'agisse d'un stress dû à la présence de polluants organiques ou métalliques, d'un stress hydrique ou d'un stress salin (Ashraf & Foolad, 2007; Costa & Spitz, 1997; Gargallo-Garriga *et al.*, 2018). Même si la surproduction d'acides aminés intervient fréquemment en présence de stress subit par la plante, leur rôle diffère qu'il s'agisse d'un stress hydrique, salin ou de la présence de polluants. En effet, les acides aminés sont multifonctionnels et peuvent agir dans la régulation du transport des ions, dans la modulation de l'ouverture des stomates, agir comme osmolyte ou encore dans la détoxification des éléments traces métalliques (Rai, 2002).

Impact des polluants organiques et métalliques sur la rhizodéposition du maïs

De même que les polluants affectent le fonctionnement et la composition de la plante, ils affectent également la rhizodéposition. Cette dernière est modifiée dans son ensemble, aussi bien au niveau de ses molécules de bas ou de haut poids moléculaire. L'exposition au Cd induit globalement une diminution du carbone émis par les racines de maïs, ainsi qu'une baisse des sucres totaux et des acides aminés totaux, et ce dans les deux solutions de rhizodépôts. Quant aux protéines diffusées, elles ne semblent pas être affectées tandis que les protéines des extraits de sable rhizosphérique diminuent. Quand la plupart des molécules analysées diminuent en présence de Cd, les acides organiques eux augmentent, de même que les acides gras. Les analyses biochimiques globales sont confirmées par les analyses individuelles des mono, disaccharides et des acides aminés individuels qui tendent à diminuer lorsque les plantes sont exposées au Cd. Ces résultats ne sont en revanche pas corrélés avec les mesures biochimiques faites dans la plante. En effet, si les acides aminés exsudés et secrétés diminuent, ceux dans la plante ont plutôt tendance à augmenter. Nous pourrions penser que, notamment pour les molécules diffusées passivement, les concentrations en rhizodépôts seraient dépendantes des métabolites dosés dans la plante et surtout au niveau des racines. Cette observation conforte l'hypothèse que la rhizodéposition n'est pas uniquement le reflet du fonctionnement de la plante mais est bien un processus sujet à une régulation spécifique.

Pour ce qui est de l'impact du PHE sur la rhizodéposition, les différences entre les deux solutions collectées sont plus marquées que pour l'exposition au Cd. Dans la solution de diffusat, la teneur en COT tend à augmenter ainsi que la teneur en sucres totaux, en acides aminés et en protéines. Ces dosages biochimiques concordent avec les analyses des composés individuels. Cependant, dans cette solution, la diffusion d'acides organiques ne semble pas augmenter en présence de PHE comme c'est le cas pour le Cd. Dans les extraits de sable rhizosphérique, la teneur en COT tend au contraire à diminuer tout comme les acides aminés alors que la teneur en sucres totaux augmente. Les acides organiques et les acides gras semblent quant à eux positivement corrélés à la présence de PHE. Dans les deux solutions, nous observons une baisse de la rhizodéposition d'acides aminés alors que dans la plante, quel que soit l'organe considéré, leur teneur augmente. De même pour les sucres, leur teneur n'est significativement pas affectée par le PHE dans la plante, bien que leur concentration dans les racines tende à baisser alors que la quantité de sucre émis dans la rhizosphère augmente avec l'exposition au PHE. Ici la même conclusion s'impose, la rhizodéposition ne reflète pas uniquement le fonctionnement de la plante mais a bien un fonctionnement qui lui est propre.

Du fait de la composition très différente des solutions récoltées en présence de Cd ou de PHE, nous pouvons en conclure que la plante adapte sa rhizodéposition en fonction du stress auquel elle fait face. Il semble qu'il existe des réponses spécifiques aux différents stress. En effet, en présence de Cd, malgré une diminution globale de l'émission de rhizodépôts, on observe une augmentation de la quantité d'acides organiques qui ont un fort pouvoir chélatant. Et en présence de PHE, comme on a pu le voir dans le chapitre IV avec une exposition comprise entre 25 et 100 mg PHE.kg⁻¹, nous avons observé une augmentation de la production de sucres et notamment de monosaccharides qui ont un fort pouvoir chemoattractant. De plus nous avons également observé une augmentation de la sécrétion d'acides gras, d'acides organiques et à de plus fortes concentrations, de monoglycérides qui améliorent la disponibilité du PHE. La production de ces molécules pourrait être induite spécifiquement par la présence de polluant et ainsi diminuer leur toxicité envers la plante. Des comportements similaires avaient déjà été mis en évidence dans le cas des carences nutritives. Ainsi une carence en fer induit l'émission de phytosidérophores qui sont émis spécifiquement et améliorent ainsi son assimilation par la plante (Murata *et al.*, 2006). Carvalhais et al. (2011) avaient également démontré l'existence d'une exsudation modifiée selon que le maïs soit affecté par une carence en P, en Fe, en K ou en N. Dans le cas d'une carence en fer, il produisait spécifiquement de l'acide glutamique, de l'acide citrique, du glucose et du ribitol alors qu'une carence en phosphore stimulait plus particulièrement l'exsudation de glucides et d'acide γ -aminobutyrique. Un milieu pauvre en potassium entraînait une diminution de l'exsudation de sucres tandis qu'un manque d'azote induisait au contraire une diminution de l'exsudation d'acides aminés.

Ainsi si certains facteurs abiotiques induisent des modifications de la composition des rhizodépôts, ces derniers peuvent en retour influencer sur la dynamique des polluants dans le sol. Si l'existence d'une stratégie permettant de mieux tolérer certains stress abiotiques grâce aux molécules présentes dans les rhizodépôts a déjà été mise en évidence lors de carences nutritives, elle a en revanche été beaucoup moins étudiée concernant les polluants et encore moins lorsqu'il s'agit de polluants organiques. Il est étonnant que la rhizodéposition soumise à ces stress abiotiques ait été aussi peu étudiée alors que la phytoremédiation a été utilisée dans de nombreux cas pour la remédiation de terres contaminées aux polluants organiques ou métalliques. On sait pourtant que dans le cas d'une pollution organique, la remédiation est essentiellement due au fonctionnement rhizosphérique plus qu'au fonctionnement au sein de la plante (Reilley *et al.*, 1996). Et l'effet des rhizodépôts sur la dégradation des polluants organiques est imputé essentiellement au caractère chemoattractant de ces molécules sans que

la rhizodéposition a été mesurée (Joner & Leyval, 2003; Smalla *et al.*, 2001). De plus, les études portent souvent sur l'exsudation et non pas sur la rhizodéposition dans sa globalité. Dans cette optique, et suite à la mesure des composés présents dans nos rhizodépôts, nous avons cherché quels rôles ont ces molécules vis-à-vis de la dynamique des polluants puisque de nombreuses molécules dosées dans notre étude ont déjà été décrites dans la littérature comme ayant une influence sur des polluants organiques ou métalliques que ce soit de façon directe ou indirecte. Directement, certaines de ces molécules peuvent modifier la dynamique de ces polluants en les rendant plus ou moins biodisponibles. C'est le cas des acides organiques et des acides aminés largement présents dans nos solutions de rhizodépôts. Ces molécules sont connues pour être des chélatants des ETM comme le Cd dans la plante mais également dans le sol. Lorsqu'ils sont émis dans la rhizosphère, l'acide citrique ou l'acide oxalique diminuent de façon significative le Cd biodisponible et donc préviennent la toxicité dans la plante (Pinto *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011). De même, l'histidine comme d'autres acides aminés tels que l'asparagine ou la proline a un fort pouvoir chélatant des métaux (Hinsinger, 2001; Rauser, 1999). Le mucilage peut aussi intervenir dans ces mécanismes de chélation. Certains polysaccharides sécrétés par les racines possèdent des groupements carboxyle capables de chélater les ETM (Mench *et al.*, 1987; Morel *et al.*, 1986). Ils agissent ainsi comme une barrière physico-chimique entourant les racines. Les rhizodépôts peuvent aussi modifier la dynamique des polluants dans le sol de façon indirecte. Nombre d'entre eux sont connus pour être des chémoattractants ; c'est le cas des sucres, des acides aminés et des acides organiques (Lux *et al.*, 1999; Mesibov & Adler, 1972). Ces molécules sont reconnues par les microorganismes à des concentrations infimes, parfois de l'ordre du picomolaire. Les microorganismes vont alors orienter leur mouvement dans le sens du gradient de concentration créé par les rhizodépôts (Paterson, 2003). Une fois dans la rhizosphère, ils peuvent métaboliser les rhizodépôts qui sont facilement dégradables et produire à leur tour des molécules capables d'augmenter la biodisponibilité de certains polluants organiques pour ensuite les dégrader plus facilement par voie enzymatique (Osorio Vega, 2007a). Ces molécules permettant d'améliorer la disponibilité des polluants organiques et par conséquent de favoriser leur dégradation microbienne, sont des tensioactifs. Ils peuvent être produits par les microorganismes comme c'est le cas des rhamnolipides ou par la plante (An *et al.*, 2010; Desai & Banat, 1997). Certaines des molécules que nous avons dosées dans nos rhizodépôts sont des tensioactifs, des molécules amphiphiles capables de solubiliser deux phases non miscibles, l'une hydrophile et l'autre lipophile. Ainsi les acides gras comme l'acide palmitique retrouvé dans nos solutions de rhizodépôts font partie des tensioactifs comme c'est le cas des phospholipides qui possèdent une ou deux chaînes

d'acides gras (Desai & Banat, 1997; Yap *et al.*, 2010). L'effet des tensioactifs peut être renforcé par la présence d'acides organiques également présents dans les rhizodépôts comme l'acide oxalique, l'acide acétique ou encore l'acide citrique (Deziel *et al.*, 1996).

Variation de la rhizodéposition du maïs selon le stade de développement

Aulakh *et al.* (2001) montraient une augmentation progressive de la rhizodéposition du riz au fur et à mesure de la croissance de la plante approximativement jusqu'à l'initiation de la panicule voire la floraison. De même, Bobille *et al.* (2016) ont observé une augmentation de l'exsudation des acides aminés jusqu'à la fin du stade végétatif. Cependant, lorsque nous avons étudié l'évolution de la rhizodéposition au cours du temps sur un pas de temps plus resserré au début de la culture par rapport à ce qui a déjà été fait, nous avons observé des variations plus complexes qu'une augmentation progressive de la rhizodéposition jusqu'au stade floraison. Groleau-Renaud *et al.* (1998) ont montré que les plantules très jeunes (4 à 8 jours) produisaient plus d'exsudats solubles que les plantes légèrement plus âgées (12 à 16 jours). De même dans notre étude, des modifications de la rhizodéposition semblent s'opérer de façon non linéaire entre le stade quatre et huit feuilles. Le stade quatre-feuilles pourrait correspondre à la fin de l'hétérotrophie et le stade six-feuilles au début de l'autotrophie. Lors de ce dernier stade, nous avons observé une augmentation globale de la rhizodéposition d'acides aminés, d'acides organiques et de protéines. Ces composés émis par les racines ont souvent été décrits dans la littérature comme contribuant ou améliorant l'acquisition de nutriments (Hinsinger, 2001; Murata *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2002, 2005; Tang *et al.*, 2009). L'importante production de ces composés au début de l'autotrophie pourrait donc aider la plante dans sa transition entre ces deux modes de nutrition et ainsi faciliter l'absorption de nutriments.

L'influence du Cd et du PHE ne semble pas avoir le même impact quelque soit le stade de développement. En effet, l'effet du PHE sur les solutions de diffusat semble s'estomper au cours du temps. Dès le stade six-feuilles, les échantillons soumis à 100 et 250 mg PHE.kg⁻¹ ont une exsudation qui se confond quasiment avec celle des échantillons contrôle. En revanche, le contraire semble se produire pour les plantes exposées au Cd même si elles se démarquent des témoins dès le stade quatre-feuilles. En ce qui concerne les extraits de sable rhizosphériques, on observe des tendances moins marquées. En effet, au premier stade de développement analysé (quatre-feuille), toutes les modalités polluées se démarquent des contrôles et plus particulièrement la modalité 100 µM de Cd. Puis, dès le second stade (six-feuille), l'effet du PHE sur la solution d'extrait de sable rhizosphérique diminue tandis que pour le dernier stade de développement, l'effet du Cd est plus marqué dès 40 µM de Cd.

Conclusion et perspectives

Nos résultats montrent que la plante modifie sa rhizodéposition en fonction du stress qu'elle subit. La composition des rhizodépôts n'est pas la même qu'il s'agisse de l'exposition à un polluant organique, métallique ou à un autre stress. La plante émet ainsi des molécules dans la rhizosphère en fonction du stress qu'elle subit et, pour la plupart des composés, indépendamment de la composition de ses racines ou de ses autres organes. De plus, il reste toujours une présence latente de toutes les molécules identifiées même en l'absence de stress : considérant le Cd et les acides organiques, ceux-ci sont produits en plus grande quantité en présence de Cd mais sont tout de même émis à des concentrations plus basses en son absence.

Longtemps la rhizodéposition a été décrite comme une perte d'énergie par la plante alors que d'autres études ainsi que cette thèse tendent à montrer qu'elle fait effet de tampon contre les stress abiotiques, qu'il s'agisse de carences nutritives, de stress salin, hydrique ou comme c'est le cas dans notre étude, de la présence d'un polluant. Que ce soit de façon directe à travers la production de rhizodépôts impliqués dans la disponibilité des polluants ou indirectement par l'attraction et la multiplication de microorganismes, la rhizosphère dans laquelle sont libérés les rhizodépôts constitue une zone tampon qui permet à la plante d'optimiser son fonctionnement en particulier face à un stress toxique.

Nous avons longtemps envisagé de réaliser la culture des plantes et la collecte des rhizodépôts dans des conditions stériles pour pouvoir séparer clairement le rôle des microorganismes dans la tolérance de ces stress et le rôle des rhizodépôts. Un dispositif permettant la stérilité a été mis au point pendant la thèse et les points critiques permettant de maintenir la stérilité ont été identifiés. Cette expérience devait surtout apporter des informations concernant les extraits de sable rhizosphérique assimilés aux mucilages puisque dans notre étude, la solution résultait de deux à six semaines de culture dans des conditions non-stériles et était donc la résultante de la sécrétion du mucilage mais aussi de la métabolisation de ces composés par des microorganismes. En condition stérile on s'affranchit alors de l'impact des microorganismes sur les composés sécrétés et notamment leur dégradation. Cependant, à la suite de réflexions menées pendant cette thèse, il nous paraît préférable de conserver la présence de microorganismes. En effet, dans des conditions naturelles les microorganismes sont indissociable de la plante et il est donc important de les étudier pour mieux comprendre les implications de chaque compartiment du système. Si les rhizodépôts ont un rôle direct dans la dynamique des polluants, on a vu qu'ils avaient aussi un rôle indirect *via* leur effet chémoattractant. Les microorganismes, plus nombreux dans la rhizosphère, vont à leur tour agir

sur la dynamique des polluants et il est donc important de mieux quantifier et identifier ces microorganismes. En retour, les microorganismes peuvent également avoir un rôle indirect sur la production de rhizodépôts. En effet, certains microorganismes travaillent de concert avec la plante. On peut notamment citer les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes ou RFCP (en anglais : PGPR, acronyme de Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Ces dernières favorisent la croissance des plantes grâce à leur capacité à améliorer l'assimilation de nutriments, à produire des phytohormones ou encore en entraînant une élongation racinaire. Ces modifications au sein de la plante peuvent alors conduire à une production accrue de rhizodépôts. Pour mieux appréhender le rôle des bactéries, il pourrait être envisagé d'ensemencer en début de culture le dispositif avec des bactéries collectées dans la rhizosphère de plantes et d'en suivre la composition tout au long de la culture.

Toujours dans l'optique de se rapprocher des conditions réelles, il serait intéressant de travailler sur des systèmes plus complexes de multi-contamination. En effet, dans les cas de pollution sur des sites industriels par exemple, on retrouve plusieurs contaminants avec le plus souvent un cocktail de polluants à la fois de nature organiques et métalliques. Maintenant que l'on connaît l'influence, séparément, du phénanthrène et du Cd sur la rhizodéposition du maïs, il serait intéressant d'apporter de façon concomitante les deux polluants. On pourrait alors voir si les deux stratégies mises en place par la polluante *via* la rhizodéposition sont conservées ou si l'une prend le dessus sur l'autre. À terme il serait ensuite instructif de travailler avec un mélange de polluants tel que retrouvé sur certains sites pollués.

Dans ces expériences, nous avons travaillé avec le maïs puisqu'il possède, entre autres, un large système racinaire qui exsude beaucoup et qui produit également une quantité importante de mucilage visible à l'œil nu. Il serait cependant intéressant d'appliquer ces mêmes analyses sur d'autres plantes en présence de polluant. Le maïs est une plante en C4, il faudrait donc au minimum étudier une plante dont le métabolisme est en C3 et en CAM pour voir si elles exudent de la même façon en présence de polluants. De plus, dans le contexte des sols pollués, il serait également instructif d'étudier la rhizodéposition des plantes hyperaccumulatrices pour comprendre le rôle des rhizodépôts dans ces mécanismes de tolérance et d'hyperaccumulation.

D'autre part il serait intéressant, pour compléter les études déjà existantes, de modéliser l'impact des rhizodépôts seuls et dans leur ensemble sur la dynamique des polluants. Grâce aux concentrations déterminées dans notre étude des différents composés émis par les racines, il peut être envisagé de rentrer tous ces paramètres dans un logiciel de modélisation ainsi que les concentrations en polluants pour mieux comprendre les interactions rhizodépôts/polluants. En

effet, il existe déjà des études de modélisation pour connaître la part biodisponible de polluant mais celles-ci ne prennent pas en compte la rhizodéposition.

Enfin, l'étude de des rhizodépôts reste compliquée du fait de leur collecte imparfaite ou incomplète mais également due à leur concentration très faible. Il reste ainsi encore du chemin à parcourir pour améliorer à la fois les techniques de collecte des rhizodépôts mais également leur analyse *via* des outils ou des méthodes plus sensibles. De plus, dans la grande majorité des études, se sont souvent les métabolites dits primaires qui sont le plus étudiés tels que les sucres, les acides aminés et les acides organiques. Comme on a pu le voir, ces métabolites sont fortement représentés dans les rhizodépôts, mais d'autres, en quantités moins importantes sont également présents et très peu étudiés : les métabolites secondaires. Il serait donc envisageable d'élargir le nombre de molécules étudiées afin d'avoir une vision d'ensemble de la rhizodéposition.

Références

- ABDEL-SHAIFY, H. I. & MANSOUR, M. S. M., (2016), A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation, *Egyptian Journal of Petroleum*, vol. 25, n°1, p. 107-123.
- ADAM, G. & DUNCAN, H., (2002), Influence of diesel fuel on seed germination, *Environmental Pollution*, vol. 120, n°2, p. 363-370.
- ADLER, P. R., ARORA, R., EL GHAOUTH, A., GLENN, D. M. & SOLAR, J. M., (1994), Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases, *Journal of Environmental Quality*, vol. 23, n°5, p. 1113-1117.
- AHAMMED, G. J., WANG, M.-M., ZHOU, Y.-H., XIA, X.-J., MAO, W.-H., SHI, K. & YU, J.-Q., (2012), The growth, photosynthesis and antioxidant defense responses of five vegetable crops to phenanthrene stress, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 80, p. 132-139.
- AHMED, M. A., HOLZ, M., WOCHE, S. K., BACHMANN, J. & CARMINATI, A., (2015), Effect of soil drying on mucilage exudation and its water repellency: a new method to collect mucilage, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 178, n°6, p. 821-824.
- AHMED, M. A., KROENER, E., HOLZ, M., ZAREBANADKOUKI, M. & CARMINATI, A., (2014), Mucilage exudation facilitates root water uptake in dry soils, *Functional Plant Biology*, vol. 41, n°11, p. 1129-1137.
- ALKIO, M., TABUCHI, T. M., WANG, X. & COLÓN-CARMONA, A., (2005), Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms, *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, n°421, p. 2983-2994.
- ALLAN, D. L. & JARRELL, W. M., (1989), Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls, *Plant Physiology*, vol. 89, n°3, p. 823-832.
- ALLOWAY, B. J., (1995), *Heavy Metals in Soils*, Springer Science & Business Media, 390 p.
- ALLOWAY, B. J., (2013), Sources of Heavy Metals and Metalloids in Soils, In : B. J. ALLOWAY (éd.), *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*, Springer Netherlands, Dordrecht, p. 11-50.
- AN, C., HUANG, G., WEI, J. & YU, H., (2011), Effect of short-chain organic acids on the enhanced desorption of phenanthrene by rhamnolipid biosurfactant in soil-water environment, *Water Research*, vol. 45, n°17, p. 5501-5510.
- AN, C., HUANG, G., YU, H., WEI, J., CHEN, W. & LI, G., (2010), Effect of short-chain organic acids and pH on the behaviors of pyrene in soil-water system, *Chemosphere*, vol. 81, n°11, p. 1423-1429.
- ASHRAF, M. & FOOLAD, M. R., (2007), Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, *Environmental and Experimental Botany*, vol. 59, n°2, p. 206-216.

- AULAKH, M. S., WASSMANN, R., BUENO, C., KREUZWIESER, J. & RENNENBERG, H., (2001), Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars, *Plant Biology*, vol. 3, n°2, p. 139-148.
- BACIC, A., MOODY, S. F. & CLARKE, A. E., (1986), Structural analysis of secreted root slime from maize (*Zea mays* L.), *Plant Physiology*, vol. 80, n°3, p. 771-777.
- BACIC, A., MOODY, S., MCCOMB, J., HINCH, J. & CLARKE, A., (1987), Extracellular polysaccharides from shaken liquid cultures of *Zea mays*, *Functional Plant Biology*, vol. 14, n°6, p. 633-641.
- BADRI, D. V. & VIVANCO, J. M., (2009), Regulation and function of root exudates, *Plant, Cell & Environment*, vol. 32, n°6, p. 666-681.
- BAEK, K.-H., KIM, H.-S., OH, H.-M., YOON, B.-D., KIM, J. & LEE, I.-S., (2004), Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, vol. 39, n°9, p. 2465-2472.
- BAIS, H. P., WEIR, T. L., PERRY, L. G., GILROY, S. & VIVANCO, J. M., (2006), The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms, *Annual Review of Plant Biology*, vol. 57, n°1, p. 233-266.
- BARLOW, P., (1975), The root cap, vol. 21, n°4, p. 21-54.
- BARNIER, C., OUVRARD, S., ROBIN, C. & MOREL, J. L., (2014), Desorption kinetics of PAHs from aged industrial soils for availability assessment, *Science of The Total Environment*, vol. 470-471, p. 639-645.
- BASOL, (2013), *Basol, un panorama des sites et sols pollués, ou potentiellement pollués, nécessitant une action des pouvoirs publics*, Commissariat général au développement durable, Service de l'observation et des statistiques, La Défense.
- BAUDOIN, E., (2001), *Impact des rhizodépôts du maïs sur la structure des communautés bactériennes telluriques* (Thèse de doctorat, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL).
- BAUMAN, J. W., LIU, J. & KLAASSEN, C. D., (1993), Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals, *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 21, n°1, p. 15-22.
- BENIZRI, E., DEDOURGE, O., DIBATTISTA-LEBOEUF, C., PIUTTI, S., NGUYEN, C. & GUCKERT, A., (2002), Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure, *Applied Soil Ecology*, vol. 21, n°3, p. 261-265.
- BERTIN, C., YANG, X. & WESTON, L. A., (2003), The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere, *Plant and Soil*, vol. 256, n°1, p. 67-83.
- 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, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 188, n°1-3, p. 221-230.

- BINET, P., PORTAL, J. M. & LEYVAL, C., (2000), Dissipation of 3–6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass, *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 32, n°14, p. 2011-2017.
- BOBILLE, H., LIMAMI, A. M., ROBINS, R. J., CUKIER, C., LE FLOCH, G. & FUSTEC, J., (2016), Evolution of the amino acid fingerprint in the unsterilized rhizosphere of a legume in relation to plant maturity, *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 101, p. 226-236.
- BOEUF-TREMBLAY, V., PLANTUREUX, S. & GUCKERT, A., (1995), Influence of mechanical impedance on root exudation of maize seedlings at two development stages, *Plant and Soil*, vol. 172, n°2, p. 279-287.
- BOLLAG, J. M., (1992), Decontaminating soil with enzymes, *Environmental Science & Technology*, vol. 26, n°10, p. 1876-1881.
- BORG, M., BUENDÍA, D. & BERGER, F., (2019), A simple and robust protocol for immunostaining Arabidopsis pollen nuclei, *Plant Reproduction*.
- BOSMA, T. N. P., MIDDELDORP, P. J. M., SCHRAA, G. & ZEHNDER, A. J. B., (1997), Mass Transfer Limitation of Biotransformation: Quantifying Bioavailability, *Environmental Science & Technology*, vol. 31, n°1, p. 248-252.
- BOTTARI, E. & FESTA, M. R., (1996), Asparagine as a ligand for cadmium(II), lead(II) and zinc(II), *Chemical Speciation & Bioavailability*, vol. 8, n°3-4, p. 75-83.
- BOWEN, H. J. M., (1979), *Environmental Chemistry of the elements*.
- BRADFORD, M., (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, vol. 72(1-2), p. 248-254.
- BRADY, N. C. & WEIL, R. R., (2002), *The nature and properties of soils*.
- BRGM, (2010), Quelles techniques pour quels traitements –Analyse coûts – bénéfiques, Rapport final.
- BRUZZONITI, M. C., FUNGI, M. & SARZANINI, C., (2010), Determination of EPA's priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking waters by solid phase extraction-HPLC, *Analytical Methods*, vol. 2, n°6, p. 739.
- BUEKERS, J., LAER, L. V., AMERY, F., BUGGENHOUT, S. V., MAES, A. & SMOLDERS, E., (2007), Role of soil constituents in fixation of soluble Zn, Cu, Ni and Cd added to soils, *European Journal of Soil Science*, vol. 58, n°6, p. 1514-1524.
- CADIERE, F., (2012), taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines polluées en France. ADEME, Angers.
- CARRIER, P., BARYLA, A. & HAVAUX, M., (2003), Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil, *Planta*, vol. 216, n°6, p. 939-950.

- CARVALHAIS, L. C., DENNIS, P. G., FEDOSEYENKO, D., HAJIREZAEI, M.-R., BORRIS, R. & WIRÉN, N. VON, (2011), Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 174, n°1, p. 3-11.
- CÉBRON, A., LOUVEL, B., FAURE, P., FRANCE-LANORD, C., CHEN, Y., MURRELL, J. C. & LEYVAL, C., (2011), Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene degraders in PAH-polluted soil but not phenanthrene degradation rates, *Environmental Microbiology*, vol. 13, n°3, p. 722-736.
- CERNIGLIA, C. E., (1992), Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biodegradation*, vol. 3, n°2, p. 351-368.
- CERNIGLIA, C. E., (1993), Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 4, n°3, p. 331-338.
- CHABOUD, A., (1983), Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime, *Plant and Soil*, vol. 73, n°3, p. 395-402.
- CHABOUD, A. & ROUGIER, M., (1984), Identification and Localization of Sugar Components of Rice (*Oryza sativa* L.) Root Cap Mucilage, *Journal of Plant Physiology*, vol. 116, n°4, p. 323-330.
- CHAIMBAULT, P., (2000), *Analyse d'acides amines non dérivés par chromatographie en phase liquide avec le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière et couplage avec la spectrométrie de masse* (thesis, Université d'Orléans).
- CHAIMBAULT, P., PETRITIS, K., ELFAKIR, C. & DREUX, M., (2000), Ion-pair chromatography on a porous graphitic carbon stationary phase for the analysis of twenty underivatized protein amino acids, *Journal of Chromatography A*, vol. 870, n°1, p. 245-254.
- CHEN, Y.-T., WANG, Y. & YEH, K.-C., (2017), Role of root exudates in metal acquisition and tolerance, *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 39, n°Supplement C, p. 66-72.
- CHRISTENSEN, T. H., (1984), Cadmium soil sorption at low concentrations: I. Effect of time, cadmium load, pH, and calcium, *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 21, n°1-4, p. 105-114.
- CHRISTENSEN, T. H. & HAUNG, P. M., (1999), Solid Phase Cadmium and the Reactions of Aqueous Cadmium with Soil Surfaces, In : M. J. MCLAUGHLIN et B. R. SINGH (éd.), *Cadmium in Soils and Plants*, Springer Netherlands, p. 65-96.
- CITEPA & SECTEN, (2017), *Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques - HAP*.
- CLARKSON, D. T. & LÜTTGE, U., (1989), Mineral nutrition: divalent cations, transport and compartmentation, In : H.-D. BEHNKE, K. ESSER, K. KUBITZKI, M. RUNGE et H. ZIEGLER (éd.), *Progress in Botany*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p. 93-112.
- CLEMENS, S., (2006), Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants, *Biochimie*, vol. 88, n°11, p. 1707-1719.

- CLEMENS, S., PALMGREN, M. G. & KRÄMER, U., (2002), A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation, *Trends in Plant Science*, vol. 7, n°7, p. 309-315.
- CLIJSTERS, H. & VAN ASSCHE, F., (1985), Inhibition of photosynthesis by heavy metals, *Photosynthesis Research*, vol. 7, n°1, p. 31-40.
- COBBETT, C. & GOLDSBROUGH, P., (2002), Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis, *Annual Review of Plant Biology*, vol. 53, n°1, p. 159-182.
- COBBETT, C. S., (2000), Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification, *Plant Physiology*, vol. 123, n°3, p. 825-832.
- COLLINS, C., FRYER, M. & GROSSO, A., (2006), Plant Uptake of Non-Ionic Organic Chemicals, *Environmental Science & Technology*, vol. 40, n°1, p. 45-52.
- COLOVIC, M. B., VASIC, V. M., DJURIC, D. M. & KRSTIC, D. Z., (2018), Sulphur-containing Amino Acids: Protective Role Against Free Radicals and Heavy Metals, *Current Medicinal Chemistry*, vol. 25, n°3, p. 324-335.
- CONTE, P., ZENA, A., PILIDIS, G. & PICCOLO, A., (2001), Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances, *Environmental Pollution*, vol. 112, n°1, p. 27-31.
- CORGIÉ, S. C., JONER, E. J. & LEYVAL, C., (2003), Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots, *Plant and Soil*, vol. 257, n°1, p. 143-150.
- CORNU, J. Y., BAKOTO, R., BONNARD, O., BUSSIÈRE, S., CORIOU, C., SIRGUEY, C., ... NGUYEN, C., (2016), Cadmium uptake and partitioning during the vegetative growth of sunflower exposed to low Cd²⁺ concentrations in hydroponics, *Plant and Soil*, vol. 404, n°1, p. 263-275.
- COSTA, G. & SPITZ, E., (1997), Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*, *Plant Science*, vol. 128, n°2, p. 131-140.
- COUSINS, I. T. & JONES, K. C., (1998), Air-soil exchange of semi-volatile organic compounds (SOCs) in the UK, *Environmental Pollution*, vol. 102, n°1, p. 105-118.
- DAKORA, F. D. & PHILLIPS, D. A., (2002), Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments, *Plant and Soil*, vol. 245, n°1, p. 35-47.
- DALCORSO, G., FARINATI, S. & FURINI, A., (2010), Regulatory networks of cadmium stress in plants, *Plant Signaling & Behavior*, vol. 5, n°6, p. 663-667.
- DAS, P., SAMANTARAY, S. & ROUT, G. R., (1997), Studies on cadmium toxicity in plants: A review, *Environmental Pollution*, vol. 98, n°1, p. 29-36.
- DEC, J. & BOLLAG, J.-M., (1997), Determination of covalent and noncovalent binding interactions between xenobiotic chemicals and soil, vol. 162, p. 858-874.

- DESAI, J. D. & BANAT, I. M., (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential., *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 61, n°1, p. 47-64.
- DESALME, D., BINET, P., EPRON, D., BERNARD, N., GILBERT, D., TOUSSAINT, M.-L., ... CHIAPUSIO, G., (2011), Atmospheric phenanthrene pollution modulates carbon allocation in red clover (*Trifolium pratense* L.), *Environmental Pollution*, vol. 159, n°10, p. 2759-2765.
- DEZIEL, E., PAQUETTE, G., VILLEMUR, R., LEPINE, F. & BISAILLON, J., (1996), Biosurfactant production by a soil pseudomonas strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons., *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, n°6, p. 1908-1912.
- DINKELAKER, B., RÖMHELD, V. & MARSCHNER, H., (1989), Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.), *Plant, Cell & Environment*, vol. 12, n°3, p. 285-292.
- DONG, J., MAO, W. H., ZHANG, G. P., WU, F. B. & CAI, Y., (2007), Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity-a review, vol. 53, n°5, p. 193.
- DUARTE-DAVIDSON, R. & JONES, K. C., (1996), Screening the environmental fate of organic contaminants in sewage sludge applied to agricultural soils: II. The potential for transfers to plants and grazing animals, *Science of The Total Environment*, vol. 185, n°1, p. 59-70.
- DUBEIKOVSKY, A. N., MORDUKHOVA, E. A., KOCHETKOV, V. V., POLIKARPOVA, F. Y. & BORONIN, A. M., (1993), Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid, *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 25, n°9, p. 1277-1281.
- DUPUY, J., (2014), *Interactions entre les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les plantes supérieures : prélèvement et réponses toxiques. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.*
- DUPUY, J., LEGLIZE, P., VINCENT, Q., ZELKO, I., MUSTIN, C., OUVRARD, S. & STERCKEMAN, T., (2016), Effect and localization of phenanthrene in maize roots, *Chemosphere*, vol. 149, p. 130-136.
- DUPUY, J., OUVRARD, S., LEGLIZE, P. & STERCKEMAN, T., (2015), Morphological and physiological responses of maize (*Zea mays*) exposed to sand contaminated by phenanthrene, *Chemosphere*, vol. 124, p. 110-115.
- EEA, (2014), Progress in management of contaminated sites. Reports CSI 015. EEA Publ., EEA, Indicator Assessment. <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites-3/assessment> (page consultée le 20/10/15)
- EFSA, (2008), Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on polycyclic aromatic hydrocarbons in food, vol. 724, p. 1-114.
- EFSA, (2009), Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food, n°980, p. 1-139.
- EFSA, (2012), Cadmium dietary exposure in the European population: Cadmium dietary exposure in Europe, *EFSA Journal*, vol. 10, n°1, p. 2551.

- EINHELLIG, F. A., (1995), *Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy*.
- ELLIS, B., HAROLD, P. & KRONBERG, H., (1991), Bioremediation of a creosote contaminated site, *Environmental Technology*, vol. 12, n°5, p. 447-459.
- ELTROP, L. & MARSCHNER, H., (1996), Growth and mineral nutrition of non-mycorrhizal and mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies*) seedlings grown in semi-hydroponic sand culture, *New Phytologist*, vol. 133, n°3, p. 469-478.
- ETIM, E. E., (2012), Phytoremediation and Its Mechanisms: A Review, vol. 2, n°3, p. 120-136.
- FABIAŃSKA, M., KOZIELSKA, B., BIELACZYC, P., WOODBURN, J. & KONIECZYŃSKI, J., (2016), Geochemical markers and polycyclic aromatic hydrocarbons in solvent extracts from diesel engine particulate matter, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, n°7, p. 6999-7011.
- FAN, T. W.-M., LANE, A. N., SHENKER, M., BARTLEY, J. P., CROWLEY, D. & HIGASHI, R. M., (2001), Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS, *Phytochemistry*, vol. 57, n°2, p. 209-221.
- FAO, (2011), L'état des ressources en terres et en eau pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde. Gérer les systèmes en danger. Rapport de synthèse.
- FAO & ITPS, (2015), *Status of the World's Soil Resources: Main Report*, FAO, Rome, Italy, 650 p.
- FAOSTAT, (2009), La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture (No. 32). Food & Agriculture Org.
- FLOYD, R. A. & OHLROGGE, A. J., (1970), Gel formation on nodal root surfaces of *Zea mays*, *Plant and Soil*, vol. 33, n°1, p. 331-343.
- FONTAINE, J.-X., SALADINO, F., AGRIMONTI, C., BEDU, M., TERCE-LAFORGUE, T., TETU, T., ... DUBOIS, F., (2006), Control of the Synthesis and Subcellular Targeting of the Two GDH Genes Products in Leaves and Stems of *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Cell Physiology*, vol. 47, n°3, p. 410-418.
- FRANCIS, A. J., (1990), Microbial dissolution and stabilization of toxic metals and radionuclides in mixed wastes, *Experientia*, vol. 46, n°8, p. 840-851.
- FU, H., YU, H., LI, T. & ZHANG, X., (2018), Influence of cadmium stress on root exudates of high cadmium accumulating rice line (*Oryza sativa* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 150, p. 168-175.
- GAO, Y., LING, W. & WONG, M. H., (2006), Plant-accelerated dissipation of phenanthrene and pyrene from water in the presence of a nonionic-surfactant, *Chemosphere*, vol. 63, n°9, p. 1560-1567.
- GAO, Y., REN, L., LING, W., GONG, S., SUN, B. & ZHANG, Y., (2010a), Desorption of phenanthrene and pyrene in soils by root exudates, *Bioresource Technology*, vol. 101, n°4, p. 1159-1165.

- GAO, Y., REN, L., LING, W., KANG, F., ZHU, X. & SUN, B., (2010b), Effects of Low-Molecular-Weight Organic Acids on Sorption–Desorption of Phenanthrene in Soils, *Soil Science Society of America Journal*, vol. 74, n°1, p. 51-59.
- GAO, Y. & ZHU, L., (2004), Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils, *Chemosphere*, vol. 55, n°9, p. 1169-1178.
- GARDINER, J., (1974), The chemistry of cadmium in natural water—I a study of cadmium complex formation using the cadmium specific-ion electrode, *Water Research*, vol. 8, n°1, p. 23-30.
- GARGALLO-GARRIGA, A., PREECE, C., SARDANS, J., ORAVEC, M., URBAN, O. & PEÑUELAS, J., (2018), Root exudate metabolomes change under drought and show limited capacity for recovery, *Scientific Reports*, vol. 8, n°1, p. 12696.
- GAYMARD, F., PILOT, G., LACOMBE, B., BOUCHEZ, D., BRUNEAU, D., BOUCHEREZ, J., ... SENTENAC, H., (1998), Identification and Disruption of a Plant Shaker-like Outward Channel Involved in K⁺ Release into the Xylem Sap, *Cell*, vol. 94, n°5, p. 647-655.
- GEORGE, T. S., GREGORY, P. J., HOCKING, P. & RICHARDSON, A. E., (2008), Variation in root-associated phosphatase activities in wheat contributes to the utilization of organic P substrates in vitro, but does not explain differences in the P-nutrition of plants when grown in soils, *Environmental and Experimental Botany*, vol. 64, n°3, p. 239-249.
- GERHARDT, K. E., HUANG, X.-D., GLICK, B. R. & GREENBERG, B. M., (2009), Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges, *Plant Science*, vol. 176, n°1, p. 20-30.
- GEVAO, B., SEMPLE, K. T. & JONES, K. C., (2000), Bound pesticide residues in soils: a review, *Environmental Pollution*, vol. 108, n°1, p. 3-14.
- GHANEM, M. E., HAN, R.-M., CLASSEN, B., QUETIN-LECLERQ, J., MAHY, G., RUAN, C.-J., ... LUTTS, S., (2010), Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: Localization and composition in relation to salt stress, *Journal of Plant Physiology*, vol. 167, n°5, p. 382-392.
- GIS SOL, (2011), L'état des sols de France. Rapport technique, Groupement d'intérêt scientifique sur les sols, 188.
- GODFRAY, H. C. J., BEDDINGTON, J. R., CRUTE, I. R., HADDAD, L., LAWRENCE, D., MUIR, J. F., ... TOULMIN, C., (2010), Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People, *Science*, vol. 327, n°5967, p. 812-818.
- GRANSEE, A. & WITTENMAYER, L., (2000), Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 163, n°4, p. 381-385.
- GRAY, T. R. & WILLIAMS, S. T., (1971), *Soil micro-organisms. Soil micro-organisms.*

- GRAYSTON, S. J., VAUGHAN, D. & JONES, D., (1997), Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability, *Applied Soil Ecology*, vol. 5, n°1, p. 29-56.
- GRILL, E., WINNACKER, E.-L. & ZENK, M. H., (1985), Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants, *Science*, vol. 230, n°4726, p. 674-676.
- GROLEAU-RENAUD, V., (1998), *Contrainte mécanique et exsudation racinaire du maïs : incidence de la morphologie du système racinaire* (thesis, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL).
- GROLEAU-RENAUD, V., PLANTUREUX, S. & GUCKERT, A., (1998a), Effet de la contrainte mécanique sur le système racinaire nodal et séminal du maïs, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, vol. 321, n°1, p. 63-71.
- GROLEAU-RENAUD, V., PLANTUREUX, S. & GUCKERT, A., (1998b), Influence of plant morphology on root exudation of maize subjected to mechanical impedance in hydroponic conditions, *Plant and Soil*, vol. 201, n°2, p. 231-239.
- GUCKERT, A., BREISCH, H. & REISINGER, O., (1975a), Interface sol-racine—I: Etude au microscope électronique des relations mucigel-argile-microorganismes, *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 7, n°4, p. 241-250.
- GUCKERT, A., BREISCH, H. & REISINGER, O., (1975b), The soil-root interface. 1. An electron microscope study of the relationships between mucigel, clay and micro-organisms.
- GUERINOT, M. L., (2000), The ZIP family of metal transporters, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1465, n°1, p. 190-198.
- GUERN, J., RENAUDIN, J. P. & BROWN, S., (1987), The compartmentation of secondary metabolites in plant cell cultures, In : *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Academic Press, San Diego, CA, USAF.Constabel & I.K.Vasil, , p. 43-76.
- HABIB, L. (INSTITUT N. DE LA R. A., CHENU, C., MOREL, J. L. & GUCKERT, A., (1990), Adsorption of maize root mucilages on homoionic clays. Consequences on the microstructure of the complexes, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Serie 2 Mécanique Physique Chimie Sciences de l'Univers Sciences de la Terre (France)*.
- HAICHAR, F. EL Z., SANTAELLA, C., HEULIN, T. & ACHOUAK, W., (2014), Root exudates mediated interactions belowground, *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 77, p. 69-80.
- HALE, M. G., FOY, C. L. & SHAY, F. J., (1971a), Factors affecting root exudation, In : *Advances in Agronomy* vol. 23, , p. 89-109.
- HALE, M. G., FOY, C. L. & SHAY, F. J., (1971b), Factors affecting root exudation, In : *Advances in Agronomy* vol. 23, , p. 89-109.
- HALL, J. L., (2002), Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, n°366, p. 1-11.
- HALLIWELL, B., (1984), Oxygen-derived species and herbicide action.

- HAPPI EMAGA, T., RABETAFIKA, N., S. BLECKER, C. & PAQUOT, M., (2012), Kinetics of the hydrolysis of polysaccharide galacturonic acid and neutral sugars chains from flaxseed mucilage, *BASE*.
- HARE, P. D. & CRESS, W. A., (1997), Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants, *Plant Growth Regulation*, vol. 21, n°2, p. 79-102.
- HARRIS, P. J. & NORTHCOTE, D. H., (1970), Patterns of polysaccharide biosynthesis in differentiating cells of maize root-tips, *Biochemical Journal*, vol. 120, n°3, p. 479-491.
- HARRISON, J., CRESCENZO, M.-A. P. DE, SENÉ, O. & HIREL, B., (2003), Does lowering glutamine synthetase activity in nodules modify nitrogen metabolism and growth of *Lotus japonicus?*, *Plant Physiology*, vol. 133, n°1, p. 253-262.
- HARTWIG, U. A., JOSEPH, C. M. & PHILLIPS, D. A., (1991), Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*, *Plant Physiology*, vol. 95, n°3, p. 797-803.
- HAYNES, R. J., (1990), Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH, *Plant and Soil*, vol. 126, n°2, p. 247-264.
- HEBERT, V. R. & MILLER, G. C., (1990), Depth dependence of direct and indirect photolysis on soil surfaces, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, n°3, p. 913-918.
- HEINRICH, D. & HESS, D., (1985), Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants, *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 31, n°1, p. 26-31.
- HELMKE, P. A., (1999), Chemistry of Cadmium in Soil Solution, In : M. J. MCLAUGHLIN et B. R. SINGH (éd.), *Cadmium in Soils and Plants*, Springer Netherlands, p. 39-64.
- HELMSTÄDTER, A., (2008), "Is there a tonic in the toxin?" The Arndt-Schulz law as an explanation for non-linear dose-response relationships, p. 29.
- HEULIN, T., GUCKERT, A. & BALANDREAU, J., (1987), Stimulation of root exudation of rice seedlings by *Azospirillum* strains: carbon budget under gnotobiotic conditions, *Biology and fertility of soils*, vol. 4, n°1-2, p. 9-14.
- HILTNER, L., (1904), Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache, n°98, p. 59-78.
- HINSINGER, P., (2001), Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review, *Plant and Soil*, vol. 237, n°2, p. 173-195.
- HINSINGER, P., GOBRAN, G. R., GREGORY, P. J. & WENZEL, W. W., (2005), Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes, *New Phytologist*, vol. 168, n°2, p. 293-303.

- HINSINGER, P., PLASSARD, C. & JAILLARD, B., (2006), Rhizosphere: A new frontier for soil biogeochemistry, *Journal of Geochemical Exploration*, vol. 88, n°1–3, p. 210-213.
- 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 and Soil*, vol. 248, n°1-2, p. 43-59.
- HIRSCH, R. E., LEWIS, B. D., SPALDING, E. P. & SUSSMAN, M. R., (1998), A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition, *Science*, vol. 280, n°5365, p. 918-921.
- HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I., (1938), *The water-culture method for growing plants without soil*, University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station, Berkeley, Calif.
- HODGE, A., GRAYSTON, S. J. & ORD, B. G., (1996), A novel method for characterisation and quantification of plant root exudates, n°184, p. 97-104.
- HOFFLAND, E., FINDENEGG, G. R. & NELEMANS, J. A., (1989), Solubilization of rock phosphate by rape : II. Local root exudation of organic acids as a response to P-starvation, *Plant and Soil*, vol. 113, n°2, p. 161-165.
- HONEYMAN, B. D. & SANTOSCHI, P. H., (1988), Metals in aquatic systems, *Environmental Science & Technology*, vol. 22, n°8, p. 862-871.
- HUANG, G., GUO, G., YAO, S., ZHANG, N. & HU, H., (2016), Organic acids, amino acids compositions in the root exudates and Cu-accumulation in castor (*Ricinus communis* L.) Under Cu stress, *International Journal of Phytoremediation*, vol. 18, n°1, p. 33-40.
- IJIMA, M., GRIFFITHS, B. & BENGOUGH, A. G., (2000), Sloughing of cap cells and carbon exudation from maize seedling roots in compacted sand, *New Phytologist*, vol. 145, n°3, p. 477-482.
- JAITZ, L., MUELLER, B., KOELLENSPERGER, G., HUBER, D., OBURGER, E., PUSCHENREITER, M. & HANN, S., (2010), LC-MS analysis of low molecular weight organic acids derived from root exudation, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 400, n°8, p. 2587-2596.
- JONER, E. J., CORGIÉ, S. C., AMELLAL, N. & LEYVAL, C., (2002), Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere, *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 34, n°6, p. 859-864.
- JONER, E. J. & LEYVAL, C., (2003), Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza, *Environmental Science & Technology*, vol. 37, n°11, p. 2371-2375.
- JONES, D. D. & MORRE, D. J., (1973), Golgi Apparatus Mediated Polysaccharide Secretion by Outer Root Cap Cells of *Zea mays*. III. Control by Exogenous Sugars, *Physiologia Plantarum*, vol. 29, n°1, p. 68-75.
- JONES, D. L. & DARRAH, P. R., (1993), Re-sorption of organic compounds by roots of *Zea mays* L. and its consequences in the rhizosphere, *Plant and Soil*, vol. 153, n°1, p. 47-59.

- JONES, D. L. & DARRAH, P. R., (1994), Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere, *Plant and Soil*, vol. 166, n°2, p. 247-257.
- JONES, D. L., NGUYEN, C. & FINLAY, R. D., (2009), Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface, *Plant and Soil*, vol. 321, n°1-2, p. 5-33.
- JUHASZ, A. L. & NAIDU, R., (2000), Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene, *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 45, n°1-2, p. 57-88.
- JUNG, C., MAEDER, V., FUNK, F., FREY, B., STICHER, H. & FROSSARD, E., (2003), Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification, *Plant and Soil*, vol. 252, n°2, p. 301-312.
- KEYTE, I., HARRISON, R. & LAMMEL, G., (2013), Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons – a review, *Chemical Society Reviews*, vol. 42, n°24, p. 9333-9391.
- KOLB, M. & HARMS, H., (2000), Metabolism of fluoranthene in different plant cell cultures and intact plants, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, n°5, p. 1304-1310.
- KRÄMER, U., PICKERING, I. J., PRINCE, R. C., RASKIN, I. & SALT, D. E., (2000), Subcellular Localization and Speciation of Nickel in Hyperaccumulator and Non-Accumulator *Thlaspi* Species, *Plant Physiology*, vol. 122, n°4, p. 1343-1354.
- KUIJKEN, R. C. P., SNEL, J. F. H., HEDDES, M. M., BOUWMEESTER, H. J. & MARCELIS, L. F. M., (2015), The importance of a sterile rhizosphere when phenotyping for root exudation, *Plant and Soil*, vol. 387, n°1-2, p. 131-142.
- KUMMEROVÁ, M., ZEZULKA, Š., BABULA, P. & VÁŇOVÁ, L., (2013), Root response in *Pisum sativum* and *Zea mays* under fluoranthene stress: Morphological and anatomical traits, *Chemosphere*, vol. 90, n°2, p. 665-673.
- KÜPPER, H. & ANDRESEN, E., (2016), Mechanisms of metal toxicity in plants, *Metallomics*, vol. 8, n°3, p. 269-285.
- KÜPPER, H., PARAMESWARAN, A., LEITENMAIER, B., TRTÍLEK, M. & ŠETLÍK, I., (2007), Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *New Phytologist*, vol. 175, n°4, p. 655-674.
- KÜPPER, H., ŠETLÍK, I., SPILLER, M., KÜPPER, F. C. & PRÁŠIL, O., (2002), Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation, *Journal of Phycology*, vol. 38, n°3, p. 429-441.
- LAGRIFFOUL, A., MOCQUOT, B., MENCH, M. & VANGRONSVELD, J., (1998), Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.), *Plant and Soil*, vol. 200, n°2, p. 241-250.
- LAMB, C. & DIXON, R. A., (1997), The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 48, n°1, p. 251-275.

- LAMETA, A. D. A. & JAY, M., (1987), Study of soybean and lentil root exudates, *Plant and Soil*, vol. 101, n°2, p. 267-272.
- LANE, T. W., SAITO, M. A., GEORGE, G. N., PICKERING, I. J., PRINCE, R. C. & MOREL, F. M. M., (2005), The first cadmium enzyme - carbonic anhydrase 2 from the marine diatom thalassiosira weissflogii, p. 1-3.
- LANG, F. S., DESTAIN, J., CAMPANELLA, B., DELVIGNE, F., DRUART, P. & THONART, P., (2014), Aperçu des connaissances actuelles sur la gestion de la pollution des mangroves par les hydrocarbures, vol. 18, n°3, p. 422-435.
- LANGER, I., SYAFRUDDIN, S., STEINKELLNER, S., PUSCHENREITER, M. & WENZEL, W. W., (2010), Plant growth and root morphology of *Phaseolus vulgaris* L. grown in a split-root system is affected by heterogeneity of crude oil pollution and mycorrhizal colonization, *Plant and Soil*, vol. 332, n°1, p. 339-355.
- LAPIE, C., LEGLIZE, P., PARIS, C., BUISSON, T. & STERCKEMAN, T., (2019), Profiling of main metabolites in root exudates and mucilage collected from maize submitted to cadmium stress, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 26, n°17, p. 17520-17534.
- LEITA, L., CONTIN, M. & MAGGIONI, A., (1991), Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*, *Plant Science*, vol. 77, n°2, p. 139-147.
- LERDA, D., (2011), Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) factsheet, p. 34.
- LEYVA, A., QUINTANA, A., SÁNCHEZ, M., RODRÍGUEZ, E. N., CREMATA, J. & SÁNCHEZ, J. C., (2008), Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: Method development and validation, *Biologicals*, vol. 36, n°2, p. 134-141.
- LI, J. H., GAO, Y., WU, S. C., CHEUNG, K. C., WANG, X. R. & WONG, M. H., (2008), Physiological and biochemical responses of rice (*Oryza Sativa* L.) to phenanthrene and pyrene, *International Journal of Phytoremediation*, vol. 10, n°2, p. 106-118.
- LI, Z., YU, J., PENG, Y. & HUANG, B., (2017), Metabolic pathways regulated by abscisic acid, salicylic acid and γ -aminobutyric acid in association with improved drought tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*), *Physiologia Plantarum*, vol. 159, n°1, p. 42-58.
- LIAO, M. & XIE, X. M., (2004), Cadmium release in contaminated soils due to organic acids, vol. 14, n°2, p. 223-228.
- LICHTENTHALER, H. K. & WELLBURN, A. R., (1983), Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents, *Biochemical Society Transactions*, vol. 11, n°5, p. 591-592.
- LIN, Z., SCHNEIDER, A., NGUYEN, C. & STERCKEMAN, T., (2014), Can ligand addition to soil enhance Cd phytoextraction? A mechanistic model study, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 21, n°22, p. 12811-12826.

- LIN, Z., SCHNEIDER, A., STERCKEMAN, T. & NGUYEN, C., (2016), Ranking of mechanisms governing the phytoavailability of cadmium in agricultural soils using a mechanistic model, *Plant and Soil*, vol. 399, n°1-2, p. 89-107.
- LING, W., REN, L., GAO, Y., ZHU, X. & SUN, B., (2009), Impact of low-molecular-weight organic acids on the availability of phenanthrene and pyrene in soil, *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 41, n°10, p. 2187-2195.
- LIPPMANN, B., LEINHOS, V. & BERGMANN, H., (1995), Influence of auxin producing rhizobacteria on root morphology and nutrient accumulation of crops. I: Changes in root morphology and nutrient accumulation in maize (*Zea mays* L.) caused by inoculation with indole-3 acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains or IAA applied exogenously, *Angewandte Botanik*, vol. 69, n°1-2, p. 31-36.
- LISAR, S. Y., MOTAFAKKERAZAD, R., HOSSAIN, M. M. & RAHMAN, I. M., (2012), Water stress in plants: causes, effects and responses, In : *Water stress*, Intechopen.
- LISTE, H.-H. & ALEXANDER, M., (1999), Rapid screening of plants promoting phenanthrene degradation, *Journal of Environmental Quality*, vol. 28, n°4, p. 1376-1377.
- LIU, H., WEISMAN, D., YE, Y., CUI, B., HUANG, Y., COLÓN-CARMONA, A. & WANG, Z., (2009a), An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Science*, vol. 176, n°3, p. 375-382.
- LIU, H., WEISMAN, D., YE, Y., CUI, B., HUANG, Y., COLÓN-CARMONA, A. & WANG, Z., (2009b), An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Science*, vol. 176, n°3, p. 375-382.
- LOGANATHAN, P., VIGNESWARAN, S., KANDASAMY, J. & NAIDU, R., (2012), Cadmium Sorption and Desorption in Soils: A Review, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, vol. 42, n°5, p. 489-533.
- LUO, Q., SUN, L., HU, X. & ZHOU, R., (2014), The variation of root exudates from the hyperaccumulator *Sedum alfredii* under cadmium stress: metabonomics analysis, *Plos one*, vol. 9, n°12, p. e115581.
- LUO, Q., WANG, S., SUN, L. & WANG, H., (2017), Metabolic profiling of root exudates from two ecotypes of *Sedum alfredii* treated with Pb based on GC-MS, *Scientific Reports*, vol. 7, .
- LUX, R., MUNASINGHE, V. R. N., CASTELLANO, F., LENGELER, J. W., CORRIE, J. E. T. & KHAN, S., (1999), Elucidation of a PTS-carbohydrate chemotactic signal pathway in *Escherichia coli* using a time-resolved behavioral assay, *Molecular Biology of the Cell*, vol. 10, n°4, p. 1133-1146.
- LYNCH, J., (1995), Root Architecture and Plant Productivity., *Plant Physiology*, vol. 109, n°1, p. 7-13.
- MA, W., MUTHREICH, N., LIAO, C., FRANZ-WACHTEL, M., SCHÜTZ, W., ZHANG, F., ... LI, C., (2010), The mucilage proteome of maize (*Zea mays* L.) primary roots, *Journal of Proteome Research*, vol. 9, n°6, p. 2968-2976.

- MACFARLANE, J. C., (1995), Plant transport of organic chemicals, In : *Plant Contamination - Modelling and Simulation of Organic Chemical Processes* Lewis Publishers: Boca Raton.
- MACKAY, D., SHIU, W.-Y., MA, K.-C. & LEE, S. C., (2006), *Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals, Second Edition*, CRC Press, 4196 p.
- MANARA, A., (2012), Plant Responses to Heavy Metal Toxicity, In : A. FURINI (éd.), *Plants and Heavy Metals*, Springer Netherlands, p. 27-53.
- MANDALAKIS, M., GUSTAFSSON, Ö., ALSBERG, T., EGEBÄCK, A.-L., REDDY, C. M., XU, L., ... STEPHANOU, E. G., (2005), Contribution of Biomass Burning to Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Three European Background Sites, *Environmental Science & Technology*, vol. 39, n°9, p. 2976-2982.
- MARSCHNER, H., (1995), *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, 668 p.
- MARTIN, B. C., GEORGE, S. J., PRICE, C. A., RYAN, M. H. & TIBBETT, M., (2014), The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: Current knowledge and future directions, *Science of The Total Environment*, vol. 472, p. 642-653.
- MCCULLY, M. E., (1995), The efflux of water from the surface of field-grown maize roots, n°95, p. 217-224.
- MCCULLY, M. E. & BOYER, J. S., (1997), The expansion of maize root-cap mucilage during hydration. 3. Changes in water potential and water content, *Physiologia Plantarum*, vol. 99, n°1, p. 169-177.
- MCCUTCHEON, S. C. & SCHNOOR, J. L., (2004), Overview of phytotransformation and control of wastes, In : *Phytoremediation : Transformation and Control of Contaminants*, Steven C. McCutcheon, Jerald L. Schnoor John Wiley & Son, vol. 19, , p. 358.
- MEHARG, A. A. & KILLHAM, K., (1991), A novel method of quantifying root exudation in the presence of soil microflora, *Plant and Soil*, vol. 133, n°1, p. 111-116.
- MENCH, M., MOREL, J. L. & GUCKERT, A., (1987), Metal binding properties of high molecular weight soluble exudates from maize (*Zea mays* L.) roots, *Biology and Fertility of Soils*, vol. 3, n°3, p. 165-169.
- MENZIE, C. A., POTOCKI, B. B. & SANTODONATO, J., (1992), Exposure to carcinogenic PAHs in the environment, *Environmental Science & Technology*, vol. 26, n°7, p. 1278-1284.
- MERKL, N., SCHULTZE-KRAFT, R. & INFANTE, C., (2005), Phytoremediation in the tropics – influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids, *Environmental Pollution*, vol. 138, n°1, p. 86-91.
- MESIBOV, R. & ADLER, J., (1972), Chemotaxis Toward Amino Acids in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, vol. 112, n°1, p. 315-326.

- MEYER, R. F. & BOYER, J. S., (1981), Osmoregulation, solute distribution, and growth in soybean seedlings having low water potentials, *Planta*, vol. 151, n°5, p. 482-489.
- MITTLER, R., (2002), Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, vol. 7, n°9, p. 405-410.
- MONK, L. S., FAGERSTEDT, K. V. & CRAWFORD, R. M. M., (1989), Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress, *Physiologia Plantarum*, vol. 76, n°3, p. 456-459.
- MOREL, H. J. L., GUCKERT, A., PLANTUREUX, S. & CHENU, C., (1990), Influence of root exudates on soil aggregation., *Symbiosis (Rehovot)*, vol. 9, n°1-3, p. 87-91.
- MOREL, J. L., MENCH, M. & GUCKERT, A., (1986), Measurement of Pb²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺ binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots, *Biology and Fertility of Soils*, vol. 2, n°1, p. 29-34.
- MORRÉ, D. J., JONES, D. D. & MOLLENHAUER, H. H., (1967), Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of *Zea mays*, *Planta*, vol. 74, n°3, p. 286-301.
- MOUSTAKAS, M., LANARAS, T., SYMEONIDIS, L. & KARATAGLIS, S. (ARISTOTELION U., (1994), Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper and lead stress, *Photosynthetica*.
- MOYA, J. L., ROS, R. & PICAZO, I., (1993), Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants, *Photosynthesis Research*, vol. 36, n°2, p. 75-80.
- MÜHLING, K. H., SCHUBERT, S. & MENGEL, K., (1993), Mechanism of sugar retention by roots of intact maize and field bean plants, *Plant and Soil*, vol. 155-156, n°1, p. 99-102.
- MURATA, Y., MA, J. F., YAMAJI, N., UENO, D., NOMOTO, K. & IWASHITA, T., (2006), A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots, *The Plant Journal*, vol. 46, n°4, p. 563-572.
- MURATOVA, A., GOLUBEV, S., WITTENMAYER, L., DMITRIEVA, T., BONDARENKOVA, A., HIRCHE, F., ... TURKOVSKAYA, O., (2009), Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *Environmental and Experimental Botany*, vol. 66, n°3, p. 514-521.
- MURPHY, E. M., ZACHARA, J. M. & SMITH, S. C., (1990), Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of hydrophobic organic compounds, vol. 24, n°10, p. 1507-1516.
- NADI, A. H. E., BROUWER, R. & LOCHER, J. T., (1969), *Some responses of the root and the shoot of Vicia faba plants to water stress*, n° 396 (n° 396), [s.n.], Wageningen.
- NAHON, D., (2008), *L'épuisement de la terre. L'enjeu du XXIe siècle*, Odile Jacob.
- NAMBIAR, E. K. S., (1976), Uptake of Zn⁶⁵ from dry soil by plants, *Plant and Soil*, vol. 44, n°1, p. 267-271.

- NARASIMHAN, K., BASHEER, C., BAJIC, V. B. & SWARUP, S., (2003), Enhancement of Plant-Microbe Interactions Using a Rhizosphere Metabolomics-Driven Approach and Its Application in the Removal of Polychlorinated Biphenyls, *Plant Physiology*, vol. 132, n°1, p. 146-153.
- NEUMANN, G. & RÖHMHELD, V., (2000), The release of root exudates as affected by the plant's physiological status, In : *The Rhizosphere : Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, p. 41-89.
- NGUYEN, C., (2003), Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls, *Agronomie*, vol. 23, n°5-6, p. 375-396.
- NGUYEN, C., SOULIER, A. J., MASSON, P., BUSSIÈRE, S. & CORNU, J. Y., (2016), Accumulation of Cd, Cu and Zn in shoots of maize (*Zea mays* L.) exposed to 0.8 or 20 nM Cd during vegetative growth and the relation with xylem sap composition, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, n°4, p. 3152-3164.
- OCKENDEN, W. A., BREIVIK, K., MEIJER, S. N., STEINNES, E., SWEETMAN, A. J. & JONES, K. C., (2003), The global re-cycling of persistent organic pollutants is strongly retarded by soils, *Environmental Pollution*, vol. 121, n°1, p. 75-80.
- OGUNTIMEHIN, I., NAKATANI, N. & SAKUGAWA, H., (2008), Phytotoxicities of fluoranthene and phenanthrene deposited on needle surfaces of the evergreen conifer, Japanese red pine (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.), *Environmental Pollution*, vol. 154, n°2, p. 264-271.
- OLDEMAN, L. R., (1991), World map on status of human-induced soil degradation (GLASOD) UNEP. ISRIC, Nairobi, Kenya : Wageningen, Netherlands, UNEP ; ISRIC.
- OLLAS, C. DE, ARBONA, V. & GÓMEZ-CADENAS, A., (2015), Jasmonoyl isoleucine accumulation is needed for abscisic acid build-up in roots of Arabidopsis under water stress conditions, *Plant, Cell & Environment*, vol. 38, n°10, p. 2157-2170.
- OSORIO VEGA, N. W., (2007a), A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake, vol. 60, n°1, p. 3621-3643.
- OSORIO VEGA, N. W., (2007b), A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake, vol. 60, n°1, p. 3621-3643.
- OUVRARD, S., LAPOLE, D. & MOREL, J. L., (2006), Root exudates impact on phenanthrene availability, *Water, Air, & Soil Pollution: Focus*, vol. 6, n°3-4, p. 343-352.
- OUVRARD, S., LEGLIZE, P. & MOREL, J. L., (2014), PAH Phytoremediation: Rhizodegradation or Rhizoattenuation?, *International Journal of Phytoremediation*, vol. 16, n°1, p. 46-61.
- PARK, K. S., SIMS, R. C., DUPONT, R. R., DOUCETTE, W. J. & MATTHEWS, J. E., (1990), Fate of PAH compounds in two soil types: Influence of volatilization, abiotic loss and biological activity, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, n°2, p. 187-195.
- PATERSON, E., (2003), Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity, *European Journal of Soil Science*, vol. 54, n°4, p. 741-750.

- PATERSON, E., GEBBING, T., ABEL, C., SIM, A. & TELFER, G., (2007), Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil, *New Phytologist*, vol. 173, n°3, p. 600-610.
- PAULL, R. E. & JONES, R. L., (1975), Studies on the secretion of maize root-cap slime, *Planta*, vol. 127, n°2, p. 97-110.
- PAWAR, R. M., (2015), The effect of soil pH on bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS), *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, vol. 06, n°03, .
- PERNOT, A., OUVRARD, S., LEGLIZE, P., WATTEAU, F., DERRIEN, D., LORGEUX, C., FAURE, P., (2014), Impact of fresh organic matter incorporation on PAH fate in a contaminated industrial soil, *Science of The Total Environment*, vol. 497-498, p. 345-352.
- PERRIGUEY, J., STERCKEMAN, T. & MOREL, J.-L., (2008), Effect of rhizosphere and plant-related factors on the cadmium uptake by maize (*Zea mays* L.), *Environmental and Experimental Botany*, vol. 63, n°1, p. 333-341.
- PETERSEN, W. & BÖTTGER, M., (1991), Contribution of organic acids to the acidification of the rhizosphere of maize seedlings, *Plant and Soil*, vol. 132, n°2, p. 159-163.
- PETERSON, P. J. & ALLOWAY, B. J., (1979), *The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*, Elsevier/North-Holland.
- PIMENTEL, D., HARVEY, C., RESOSUDARMO, P., SINCLAIR, K., KURZ, D., MCNAIR, M., ... BLAIR, R., (1995), Environmental and Economic Costs of Soil Erosion and Conservation Benefits, *Science*, vol. 267, n°5201, p. 1117-1123.
- PINTO, A. P., SIM[OTILDE]ES, I. & MOTA, A. M., (2008), Cadmium impact on root exudates of sorghum and maize Plants: A speciation study, *Journal of Plant Nutrition*, vol. 31, n°10, p. 1746-1755.
- PINTON, R., VARANINI, Z. & NANNIPIERI, P., (2007), *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface, second Edition*, CRC Press, 470 p.
- POKOJSKA-BURDZIEJ, A., (1980), The effect of carbon and nitrogen sources on auxins and gibberellin-like substances synthesis by bacteria isolated from the roots of pine seedlings (*Pinus silvestris* L.), *Acta Microbiologica Polonica*, vol. 30, n°4, p. 347-354.
- POORTER, H., FIORANI, F., STITT, M., SCHURR, U., FINCK, A., GIBON, Y., ... PONS, T. L., (2012), The art of growing plants for experimental purposes: a practical guide for the plant biologist, *Functional Plant Biology*, vol. 39, n°11, p. 821-838.
- PORTEOUS, F., KILLHAM, K. & MEHARG, A., (2000), Use of a lux-marked rhizobacterium as a biosensor to assess changes in rhizosphere C flow due to pollutant stress, *Chemosphere*, vol. 41, n°10, p. 1549-1554.
- POSCHENRIEDER, C., CABOT, C., MARTOS, S., GALLEGO, B. & BARCELÓ, J., (2013), Do toxic ions induce hormesis in plants?, *Plant Science*, vol. 212, p. 15-25.

- PRASAD, M. N. V., (1995), Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants, *Environmental and Experimental Botany*, vol. 35, n°4, p. 525-545.
- PREECE, C. & PEÑUELAS, J., (2016), Rhizodeposition under drought and consequences for soil communities and ecosystem resilience, *Plant and Soil*, vol. 409, n°1, p. 1-17.
- RADETSKI, C. M., COTELLE, S. & FÉRARD, J.-F., (2000), Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate, *Environmental and Experimental Botany*, vol. 44, n°3, p. 221-229.
- RAI, V. K., (2002), Role of amino acids in plant responses to stresses, *Biologia Plantarum*, vol. 45, n°4, p. 481-487.
- RAUSER, W. E., (1999), Structure and function of metal chelators produced by plants, *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol. 31, n°1, p. 19-48.
- READ, D. B., BENGOUGH, A. G., GREGORY, P. J., CRAWFORD, J. W., ROBINSON, D., SCRIMGEOUR, C. M., ... ZHANG, X., (2003), Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil, *New Phytologist*, vol. 157, n°2, p. 315-326.
- READ, D. B., GREGORY, P. J. & BELL, A. E., (1999), Physical properties of axenic maize root mucilage, *Plant and Soil*, vol. 211, n°1, p. 87-91.
- READ, D. J. & BARTLETT, E. M., (1972), The physiology of drought resistance in the soybean plant (*Glycine max*), *Journal of Applied Ecology*, vol. 9, n°2, p. 487-499.
- REID, B. J., JONES, K. C. & SEMPLE, K. T., (2000), Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments—a perspective on mechanisms, consequences and assessment, *Environmental Pollution*, vol. 108, n°1, p. 103-112.
- REILLEY, K. A., BANKS, M. K. & SCHWAB, A. P., (1996), Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere, *Journal of Environmental Quality*, vol. 25, n°2, p. 212-219.
- REINHOLD, B., HUREK, T. & FENDRIK, I., (1985), Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp., *Journal of Bacteriology*, vol. 162, n°1, p. 190-195.
- RELLÁN-ÁLVAREZ, R., ORTEGA-VILLASANTE, C., ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A., CAMPO, F. F. DEL & HERNÁNDEZ, L. E., (2006), Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury, *Plant and Soil*, vol. 279, n°1, p. 41-50.
- REN, Z.-L., TELLA, M., BRAVIN, M. N., COMANS, R. N. J., DAI, J., GARNIER, J.-M., ... BENEDETTI, M. F., (2015), Effect of dissolved organic matter composition on metal speciation in soil solutions, *Chemical Geology*, vol. 398, p. 61-69.
- RHODES, C. J., (2013), Applications of bioremediation and phytoremediation, *Science Progress*, vol. 96, n°4, p. 417-427.
- RICOCHON, G., PARIS, C., GIRARDIN, M. & MUNIGLIA, L., (2011), Highly sensitive, quick and simple quantification method for mono and disaccharides in aqueous media using liquid

chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS), *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 879, n°19, p. 1529-1536.

RIVETTA, A., NEGRINI, N. & COCUCCI, M., (1997), Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination, *Plant, Cell & Environment*, vol. 20, n°5, p. 600-608.

ROBINSON, N. J., TOMMEY, A. M., KUSKE, C. & JACKSON, P. J., (1993), Plant metallothioneins., *Biochemical Journal*, vol. 295, n°Pt 1, p. 1-10.

RODRÍGUEZ-EUGENIO, N., MCLAUGHLIN, M. & PENNOCK, D., (2018), *Soil pollution: a hidden reality*, Food and Agriculture Organization.

RÖMER, W., KANG, D.-K., EGLE, K., GERKE, J. & KELLER, H., (2000), The acquisition of cadmium by *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L., and *Lolium multiflorum* Lam., *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 163, n°6, p. 623-628.

RÖMHELD, V., (1987), Different strategies for iron acquisition in higher plants, *Physiologia Plantarum*, vol. 70, n°2, p. 231-234.

ROSEN, H., (1957), A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 67, n°1, p. 10-15.

ROVIRA, A. D., (1959), Root excretion in relation to the rhizosphere effect, vol. 11, n°1, p. 53-64.

ROVIRA, A. D., (1969), Plant root exudates, *The Botanical Review*, vol. 35, n°1, p. 35-57.

ROVIRA, A. D., (1979), Biology of the soil-root interface, p. 145-160.

RUELLAN, A., (2008), La dégradation des sols dans le monde. <http://unt.unice.fr/uoh/degsol/fertilite-chimique.php> (page consultée le 11/12/18)

SALT, D. E., KATO, N., KRÄMER, U., SMITH, R. D. & RASKIN, I., (1999), The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of thlaspi, In : *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, CRC Press vol. 1-0, , p. 191-202.

SALT, D. E. & RAUSER, W. E., (1995), MgATP-Dependent Transport of Phytochelatins Across the Tonoplast of Oat Roots, *Plant Physiology*, vol. 107, n°4, p. 1293-1301.

ŠAMAJ, J., BALUŠKA, F., BOBÁK, M. & VOLKMANN, D., (1999), Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4, *Plant Cell Reports*, vol. 18, n°5, p. 369-374.

SANDERMANN, H., SCHEEL, D. & TRENCK, TH. V. D., (1984), Use of plant cell cultures to study the metabolism of environmental chemicals, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 8, n°2, p. 167-182.

- SANDERS, D. & BERTHKE, P., (2000), Membrane transport, In : *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL American Society of Plant Physiologist, , p. 110-159.
- SANDNES, A., ELDHUSET, T. D. & WOLLEBÆK, G., (2005), Organic acids in root exudates and soil solution of Norway spruce and silver birch, *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 37, n°2, p. 259-269.
- SANITÀ DI TOPPI, L. & GABRIELLI, R., (1999), Response to cadmium in higher plants, *Environmental and Experimental Botany*, vol. 41, n°2, p. 105-130.
- SANO, T., KURAYA, Y., AMINO, S. & NAGATA, T., (1999), Phosphate as a limiting factor for the cell division of tobacco BY-2 cells, *Plant and Cell Physiology*, vol. 40, n°1, p. 1-16.
- SAS, L., RENGEL, Z. & TANG, C., (2001), Excess cation uptake, and extrusion of protons and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorus deficiency, *Plant Science*, vol. 160, n°6, p. 1191-1198.
- SAUVÉ, S., HENDERSHOT, W. & ALLEN, H. E., (2000), Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter, *Environmental Science & Technology*, vol. 34, n°7, p. 1125-1131.
- SCHILLING, G., GRANSEE, A., DEUHEL, A., LEŽOVIŽ, G. & RUPPEL, S., (1998), Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere, *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, vol. 161, n°4, p. 465-478.
- SCHWAB, A. P., HE, Y. & BANKS, M. K., (2005), The influence of organic ligands on the retention of lead in soil, *Chemosphere*, vol. 61, n°6, p. 856-866.
- SELVAM, A. & WONG, J. W. C., (2008), Phytochelatin synthesis and cadmium uptake of *Brassica napus*, *Environmental Technology*, vol. 29, n°7, p. 765-773.
- SEMPLE, K. T., MORRISS, A. W. J. & PATON, G. I., (2003), Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis, *European Journal of Soil Science*, vol. 54, n°4, p. 809-818.
- SEREGIN, I. V. & IVANOV, V. B., (2001), Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants, *Russian Journal of Plant Physiology*, vol. 48, n°4, p. 523-544.
- SHAH, K. & DUBEY, R. S., (1997), Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: role of proline as a possible enzyme protectant, *Biologia Plantarum*, vol. 40, n°1, p. 121-130.
- SHARMA, S. S. & DIETZ, K.-J., (2006), The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress, *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, n°4, p. 711-726.
- SHARP, R. E. & DAVIES, W. J., (1979), Solute regulation and growth by roots and shoots of water-stressed maize plants, *Planta*, vol. 147, n°1, p. 43-49.

- SHEN, H., YAN, X., ZHAO, M., ZHENG, S. & WANG, X., (2002), Exudation of organic acids in common bean as related to mobilization of aluminum- and iron-bound phosphates, *Environmental and Experimental Botany*, vol. 48, n°1, p. 1-9.
- SHEN, J., LI, H., NEUMANN, G. & ZHANG, F., (2005), Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in *Lupinus albus* as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system, *Plant Science*, vol. 168, n°3, p. 837-845.
- SHENKER, M., FAN, T. W.-M. & CROWLEY, D. E., (2001), Phytosiderophores Influence on Cadmium Mobilization and Uptake by Wheat and Barley Plants, *Journal of Environment Quality*, vol. 30, n°6, p. 2091.
- SHIMABUKURO, R. H., (1985), Detoxication of Herbicides, In : *Weed Physiology* S. O. Duke, vol. Vol II : Herbicide Physiology, , p. 215-240.
- SICILIANO, S. D. & GERMIDA, J. J., (1998), Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria, *Environmental Reviews*, vol. 6, n°1, p. 65-79.
- SILLIMAN, J. E., MEYERS, P. A. & EADIE, B. J., (1998), Perylene: an indicator of alteration processes or precursor materials?, *Organic Geochemistry*, vol. 29, n°5-7, p. 1737-1744.
- SMALLA, K., WIELAND, G., BUCHNER, A., ZOCK, A., PARZY, J., KAISER, S., ... BERG, G., (2001), Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, n°10, p. 4742-4751.
- SMIRNOFF, N. & CUMBES, Q. J., (1989), Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes, *Phytochemistry*, vol. 28, n°4, p. 1057-1060.
- SMITH, M. R., (1991), The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria, In : C. RATLEDGE (éd.), *Physiology of Biodegradative Microorganisms*, Springer Netherlands, p. 191-206.
- SONG, F., HAN, X., ZHU, X. & HERBERT, S. J., (2012), Response to water stress of soil enzymes and root exudates from drought and non-drought tolerant corn hybrids at different growth stages, *Canadian Journal of Soil Science*, vol. 92, n°3, p. 501-507.
- SONG, H., WANG, Y.-S., SUN, C.-C., WU, M.-L., PENG, Y.-L., DENG, C. & LI, Q. P., (2011), Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on antioxidant system activities and proline content in *Kandelia candel*, *Oceanological and Hydrobiological Studies*, vol. 40, n°3, p. 9.
- STERCKEMAN, T., GOSSIAUX, L., GUIMONT, S., SIRGUEY, C. & LIN, Z., (2018), Cadmium mass balance in French soils under annual crops: Scenarios for the next century, *Science of The Total Environment*, vol. 639, p. 1440-1452.
- STERCKEMAN, T., OUVREARD, S. & LEGLIZE, P., (2011), Phytoremédiation des sols.

- STRABLE, J. & SCANLON, M. J., (2009), Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology, *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2009, n°10, p. pdb.emo132.
- STRÖM, L., OWEN, A. G., GODBOLD, D. L. & JONES, D. L., (2005), Organic acid behaviour in a calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling, *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 37, n°11, p. 2046-2054.
- STUBBS, V. E. C., STANDING, D., KNOX, O. G. G., KILLHAM, K., BENGOUGH, A. G. & GRIFFITHS, B., (2004), Root Border Cells Take Up and Release Glucose-C, *Annals of Botany*, vol. 93, n°2, p. 221-224.
- SUN, B., GAO, Y., LIU, J. & SUN, Y., (2012), The impact of different root exudate components on phenanthrene availability in soil, *Soil Science Society of America Journal*, vol. 76, n°6, p. 2041-2050.
- SZTEKE, B., JEDRZEJCZAK, R., NIEPLOCHA, J. & TYCH, W., (1988), Influence of the environmental factors on cadmium content in strawberry fruit, *Fruit Science Reports (Poland)*.
- TANG, C., HAN, X. Z., QIAO, Y. F. & ZHENG, S. J., (2009), Phosphorus deficiency does not enhance proton release by roots of soybean [*Glycine max* (L.) Murr.], *Environmental and Experimental Botany*, vol. 67, n°1, p. 228-234.
- TANG, C.-S. & YOUNG, C.-C., (1982), Collection and Identification of Allelopathic Compounds from the Undisturbed Root System of Bigalga Limpograss (*Hemarthria altissima*), *Plant Physiology*, vol. 69, n°1, p. 155-160.
- TAYLOR, S. R. & MCLENNAN, S. M., (1995), The geochemical evolution of the continental crust, *Reviews of Geophysics*, vol. 33, n°2, p. 241-265.
- TESTER, M. & LEIGH, R. A., (2001), Partitioning of nutrient transport processes in roots, *Journal of Experimental Botany*, vol. 52, n°suppl 1, p. 445-457.
- TIAN, W., ZHAO, J., ZHOU, Y., QIAO, K., JIN, X. & LIU, Q., (2017), Effects of root exudates on gel-beads/reeds combination remediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 135, p. 158-164.
- TIEHM, A., STIEBER, M., WERNER, P. & FRIMMEL, F. H., (1997), Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil, *Environmental Science & Technology*, vol. 31, n°9, p. 2570-2576.
- TRAINA, S. J., (1999), The Environmental Chemistry of Cadmium, In : M. J. MCLAUGHLIN et B. R. SINGH (éd.), *Cadmium in Soils and Plants*, Springer Netherlands, p. 11-37.
- UREN, N. C., (2007), Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants, In : *The Rhizosphere*, CRC Press vol. 1-0, , p. 1-21.
- UREN, N. C. & REISENAUER, H. M., (1988), The role of root exudates in nutrient acquisition, *Advances in Plant Nutrition*, p. 79-114.
- US EPA, (1984), Method 610: polynuclear aromatic hydrocarbons, p. 25.

- US-EPA, (2000a), A citizen's guide to phytoremediation, United States - Environment Protection Agency.
- US-EPA, (2000b), Introduction to phytoremediation, United States - Environment Protection Agency.
- VAN ASSCHE, F. & CLIJSTERS, H., (1990), A biological test system for the evaluation of the phytotoxicity of metal-contaminated soils, *Environmental Pollution*, vol. 66, n°2, p. 157-172.
- VAN DER ENT, A., BAKER, A. J. M., REEVES, R. D., CHANEY, R. L., ANDERSON, C. W. N., MEECH, J. A., ... MULLIGAN, D. R., (2015), Agromining: Farming for Metals in the Future?, *Environmental Science & Technology*, vol. 49, n°8, p. 4773-4780.
- VANČURA, V., PŘIKRYL, Z., KALACHOVÁ, L. & WURST, M., (1977), Some Quantitative Aspects of Root Exudation, *Ecological Bulletins*, n°25, p. 381-386.
- VÁŇOVÁ, L., KUMMEROVÁ, M., KLEMŠ, M. & ZEŽULKA, Š., (2009), Fluoranthene influences endogenous abscisic acid level and primary photosynthetic processes in pea (*Pisum sativum* L.) plants in vitro, *Plant Growth Regulation*, vol. 57, n°1, p. 39-47.
- VASSILEV, A., LIDON, F. C., DO CÉU MATOS, M., RAMALHO, J. C. & YORDANOV, I., (2002), Photosynthetic performance and some nutrients content in Cd and Cu-treated Barley (*Hordeum vulgare* L.) plants, vol. 25, n°11, p. 2343-2360.
- VASSILEV, A., PEREZ-SANZ, A., CUYPERS, A. & VANGRONSVELD, J., (2007), Tolerance of Two Hydroponically Grown Salix Genotypes to Excess Zinc, *Journal of Plant Nutrition*, vol. 30, n°9, p. 1471-1482.
- VASSILEV, A., TSONEV, T. & YORDANOV, I., (1998), Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cadmium contamination in soil during ontogenesis, *Environmental Pollution*, vol. 103, n°2, p. 287-293.
- VAUGHN, K. C. & CAMPBELL, W. H., (1988), Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves, *Plant Physiology*, vol. 88, n°4, p. 1354-1357.
- VÖGELI-LANGE, R. & WAGNER, G. J., (1990), Subcellular Localization of Cadmium and Cadmium-Binding Peptides in Tobacco Leaves Implication of a Transport Function for Cadmium-Binding Peptides, *Plant Physiology*, vol. 92, n°4, p. 1086-1093.
- VRANOVA, V., REJSEK, K., SKENE, K. R., JANOUS, D. & FORMANEK, P., (2013), Methods of collection of plant root exudates in relation to plant metabolism and purpose: A review, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 176, n°2, p. 175-199.
- WANG, Q., LIU, X., ZHANG, X., HOU, Y., HU, X., LIANG, X. & CHEN, X., (2016), Influence of tea saponin on enhancing accessibility of pyrene and cadmium phytoremediated with *Lolium multiflorum* in co-contaminated soils, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, n°6, p. 5705-5711.
- WANG, Z., YANG, C., PARROTT, J. L., FRANK, R. A., YANG, Z., BROWN, C. E., ... HEWITT, L. M., (2014), Forensic source differentiation of petrogenic, pyrogenic, and biogenic hydrocarbons in

- Canadian oil sands environmental samples, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 271, p. 166-177.
- WEIR, T. L., PARK, S.-W. & VIVANCO, J. M., (2004), Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals, *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 7, n°4, p. 472-479.
- WENG, L., TEMMINGHOFF, E. J. M., LOFTS, S., TIPPING, E. & VAN RIEMSDIJK, W. H., (2002), Complexation with dissolved organic matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil, *Environmental Science & Technology*, vol. 36, n°22, p. 4804-4810.
- WILCKE, W., (2000), Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil — a review, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 163, n°3, p. 229-248.
- WILD, E., DENT, J., THOMAS, G. O. & JONES, K. C., (2005), Direct Observation of Organic Contaminant Uptake, Storage, and Metabolism within Plant Roots, *Environmental Science & Technology*, vol. 39, n°10, p. 3695-3702.
- WILD, S. R. & JONES, K. C., (1992), Organic chemicals entering agricultural soils in sewage sludges: screening for their potential to transfer to crop plants and livestock, *Science of The Total Environment*, vol. 119, p. 85-119.
- WILLATS, W. G. T., MCCARTNEY, L. & KNOX, J. P., (2001), In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, vol. 213, n°1, p. 37-44.
- WILLIAMS, L. E., PITTMAN, J. K. & HALL, J. L., (2000), Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1465, n°1, p. 104-126.
- WITTENMAYER, L. & MERBACH, W., (2005), Plant responses to drought and phosphorus deficiency: contribution of phytohormones in root-related processes, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 168, n°4, p. 531-540.
- WITTIG, R., BALLACH, H.-J. & KUHN, A., (2003), Exposure of the Roots of *Populus nigra* L. cv. Loenen to PAHs and its Effect on growth and water balance, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 10, n°4, p. 235.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, (2010), Exposure to cadmium : a major public health concern. Preventing Disease through Healthy Environments, vol 27, World Health Organization.
- WU, F. & ZHANG, G., (2002), Genotypic variation in kernel heavy metal concentrations in barley and as affected by soil factors, *Journal of Plant Nutrition*, vol. 25, n°6, p. 1163-1173.
- WU, H., HAIG, T., PRATLEY, J., LEMERLE, D. & AN, M., (2000), Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum aestivum*, *Journal of Chemical Ecology*, vol. 26, n°9, p. 2141-2154.

- WU, H., HAIG, T., PRATLEY, J., LEMERLE, D. & AN, M., (2001), Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): variation of phenolic acids in shoot tissues, *Journal of Chemical Ecology*, vol. 27, n°1, p. 125-135.
- XIAN, X., (1989), Effect of chemical forms of cadmium, zinc, and lead in polluted soils on their uptake by cabbage plants, *Plant and Soil*, vol. 113, n°2, p. 257-264.
- XIN, M., DAO-HUI, L., YI, X., YUAN-YUAN, W. & YOU-YING, T., (2009), Effects of phenanthrene on chemical composition and enzyme activity in fresh tea leaves, *Food Chemistry*, vol. 115, n°2, p. 569-573.
- XING, B. & PIGNATELLO, J. J., (1997), Dual-Mode Sorption of Low-Polarity Compounds in Glassy Poly(Vinyl Chloride) and Soil Organic Matter, *Environmental Science & Technology*, vol. 31, n°3, p. 792-799.
- YANG, Y., RATTÉ, D., SMETS, B. F., PIGNATELLO, J. J. & GRASSO, D., (2001), Mobilization of soil organic matter by complexing agents and implications for polycyclic aromatic hydrocarbon desorption, *Chemosphere*, vol. 43, n°8, p. 1013-1021.
- YAP, C. L., GAN, S. & NG, H. K., (2010), Application of vegetable oils in the treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 177, n°1, p. 28-41.
- YOSHITOMI, K. J. & SHANN, J. R., (2001), Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on 14C-pyrene mineralization, *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 33, n°12, p. 1769-1776.
- ZENG, F., CHEN, S., MIAO, Y., WU, F. & ZHANG, G., (2008), Changes of organic acid exudation and rhizosphere pH in rice plants under chromium stress, *Environmental Pollution*, vol. 155, n°2, p. 284-289.
- ZHAN, X., LIANG, X., JIANG, T. & XU, G., (2013), Interaction of phenanthrene and potassium uptake by wheat roots: a mechanistic model, *BMC Plant Biology*, vol. 13, n°1, p. 168.
- ZHAN, X., ZHANG, X., YIN, X., MA, H., LIANG, J., ZHOU, L., ... XU, G., (2012), H⁺ /phenanthrene symporter and aquaglyceroporin are implicated in phenanthrene uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) roots, *Journal of Environmental Quality*, vol. 41, n°1, p. 188-196.
- ZHAN, X.-H., MA, H.-L., ZHOU, L.-X., LIANG, J.-R., JIANG, T.-H. & XU, G.-H., (2010), Accumulation of phenanthrene by roots of intact wheat (*Triticum acstivnm*L.) seedlings: passive or active uptake?, *BMC Plant Biology*, vol. 10, n°1, p. 52.
- ZHANG, F.-Q., WANG, Y.-S., LOU, Z.-P. & DONG, J.-D., (2007), Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*), *Chemosphere*, vol. 67, n°1, p. 44-50.
- ZHANG, F.-S., RÖMHELD, V. & MARSCHNER, H., (1991), Diurnal rhythm of release of phytosiderophores and uptake rate of zinc in iron-deficient wheat, *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 37, n°4, p. 671-678.

ZHU, X. F., ZHENG, C., HU, Y. T., JIANG, T., LIU, Y., DONG, N. Y., ... ZHENG, S. J., (2011), Cadmium-induced oxalate secretion from root apex is associated with cadmium exclusion and resistance in *Lycopersicon esulentum*, *Plant, Cell & Environment*, vol. 34, n°7, p. 1055-1064.

ZICKENROTT, I.-M., WOCHER, S. K., BACHMANN, J., AHMED, M. A. & VETTERLEIN, D., (2016), An efficient method for the collection of root mucilage from different plant species—A case study on the effect of mucilage on soil water repellency, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 179, n°2, p. 294-302.

Caractérisation de la rhizodéposition du maïs (*Zea mays* L.) en réponse à la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et d'éléments traces métalliques

Cette thèse porte sur le fonctionnement de la rhizosphère dans un contexte de végétalisation de sols contaminés. Nous avons évalué l'impact de contaminants modèles (phénanthrène et cadmium) sur la rhizodéposition du maïs (*Zea mays* L.), afin de mieux comprendre le rôle joué par la rhizodéposition dans la tolérance de la plante à ce type de stress abiotique. Pour cela, un dispositif de culture et de collecte des rhizodépôts permettant d'évaluer la réponse du maïs à une exposition aux polluants a été mis en place. Ce développement méthodologique s'est attaché en particulier à mettre les plantes dans des conditions amenant à un fonctionnement aussi proche que possible de celui de conditions de culture normales dans un sol, tout en permettant la collecte des deux principales familles de rhizodépôts : les exsudats racinaires et le mucilage. Des outils de caractérisation des rhizodépôts récoltés ont été développés (analyses colorimétriques, LC-MS, GC-MS) afin de doser les principales familles de composés émis par les racines telles que les glucides, les acides aminés, les protéines et les acides organiques. Enfin, les rôles connus des molécules mises en évidence dans les expériences précédentes sur la dynamique des polluants ont été discutés. Cette étude a permis de mettre en évidence des modifications du profil métabolique de la rhizodéposition en présence de polluants et ce de façon différenciée selon qu'il s'agissait de polluants organiques ou métalliques. La présence de Cd entraîne chez le maïs une diminution globale des composés émis par les racines (carbone total, glucides, acides aminés). Seules les protéines ne semblent pas être affectées par la présence du métal tandis que l'exsudation d'acides organiques augmente avec l'exposition au Cd. Le phénanthrène, quant à lui, entraîne une augmentation du carbone exsudé alors qu'il entraîne au contraire une diminution du carbone secrété dans le mucilage. De plus, il induit une augmentation de l'émission des glucides simples et polymérisés, des acides gras et des protéines tandis qu'il entraîne une baisse de la diffusion d'acides organiques. En plus de la présence de polluants, le développement du maïs a été étudié en analysant parallèlement sa rhizodéposition aux stades 4, 6 et 8 feuilles. L'effet du Cd sur l'exsudation semble s'accroître à partir du stade 6 feuilles tandis que celui du phénanthrène tend au contraire à s'atténuer. L'influence des polluants sur le mucilage semble en revanche moins marquée et plus constante au cours du temps. Enfin, de nombreuses molécules rhizodéposées ont été identifiées comme pouvant jouer un rôle dans la dynamique des polluants dans le sol et par conséquent leur tolérance par la plante, notamment au travers des mécanismes de complexation ou de solubilisation.

Mots clés : mucilage, exsudat racinaire, cadmium, phénanthrène, rhizosphère

Characterization of maize (*Zea mays* L.) rhizodeposition in response to polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals exposure

This thesis focuses on the functioning of the rhizosphere in the context of revegetation of contaminated soils. We evaluated the impact of model contaminants (phenanthrene and cadmium) on maize (*Zea mays* L.) rhizodeposition to better understand the role of rhizodeposition in the plant's tolerance to this type of abiotic stress. To this end, a system of plant cultivation and rhizodeposit collection was set up to assess the response of maize to pollutant exposure. Our methodological development aimed at placing the plants in conditions as close as possible as those of soil cultivation, while allowing the collection of the two main families of rhizodeposits: root exudates and mucilage. Tools for characterizing the collected rhizodeposits were developed (colorimetric analyses, LC-MS, GC-MS) in order to determine the main families of compounds emitted by roots such as carbohydrates, amino acids, proteins and organic acids. Finally, the role of the molecules highlighted in our experiments on pollutant dynamics was discussed. This study revealed changes in the metabolic profile of rhizodeposition in presence of pollutants and those differences may vary considering the nature of the pollutant (organic or metallic). Cd caused a decrease of almost all compound emissions by maize roots (total carbon, carbohydrates, amino acids). Only proteins did not appear to be affected by the presence of the metal, while the exudation of organic acids increased with Cd exposure. Phenanthrene, on the other hand, increased the quantity of exuded carbon while it decreased the carbon secreted in the mucilage. In addition, it induced an increase in the emission of simple and polymerized carbohydrates, fatty acids and proteins while diffused organic acids decreased. In addition to the presence of pollutants, the development of maize was studied by analysing its rhizodeposition at the 4, 6 and 8-leaf stages. The effect of Cd on exudation seemed to increase from the 6-leaf stage, while that of phenanthrene tended to decrease. On the other hand, the influence of pollutants on mucilage seemed less marked and more constant over time. Finally, many rhizodeposited molecules have been identified as playing a role in the pollutants' dynamics in the soil and therefore in their tolerance by the plant, in particular through complexation or solubilisation mechanisms.

Keywords: mucilage, root exudate, cadmium, phenanthrene, rhizosphere