



## 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-memoires-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



**Rapport de stage de  
deuxième année de Master *BioMANE*  
(Biotechnologies Microbiologie Aliment  
Nutrition Environnement)  
Spécialité Microbiologie  
Environnementale et Sanitaire**

**Structure d'accueil :  
Laboratoire Interdisciplinaire des  
Environnements Continentaux (LIEC)  
Faculté des Sciences et Techniques, F-54506  
VANDOEUVRE-LES-NANCY  
UMR 7360 CNRS-Université de Lorraine**

**Evaluation de la diversité métabolique de dégradation  
des HAPs et de leurs métabolites par les communautés  
microbiennes de divers sols de friches industrielles**

Rapport de stage présenté par :

**HERMON Louis**

Directeur de stage : Dr. Aurélie Cébron (Chargée de Recherche CNRS)

## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. C. Leyval qui m'a permis de réaliser ce stage au sein du Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux UMR 7360 CNRS Université de Lorraine.

Je remercie ma directrice de stage, Dr. Aurélie Cébron pour son très bon encadrement et pour m'avoir permis de réaliser ce stage dans de bonnes conditions et dans la bonne humeur. Je la remercie pour sa gentillesse, sa disponibilité, son écoute, sa patience, son aide et ses conseils et pour tout ce qu'elle m'a appris. J'ai passé un stage très agréable.

Je remercie également Amélia Bourceret et Thierry Beguiristain, Johanne Cennerazzo, Charlotte Berthelot, Laurence Lacercat, François Thomas et Romain Vallée pour leur sourire, leur bonne humeur et leur aide précieuse. Je les remercie pour les bons moments passés ensemble.

Merci à Christine, Geraldine, Caroline, Cécile, Asfaw, Hervé et Damien pour les discussions qu'on a pu avoir ensemble, pour votre ouverture d'esprit et votre bonne humeur.

Je remercie Patrick Billard et Christian Mustin pour leur aide et leurs conseils sur toute la mise au point de la fluorescence et l'utilisation du SAFAS.

Je remercie tout le personnel du LIEC pour la bonne ambiance générale du laboratoire, c'est un plaisir d'effectuer un stage dans ce cadre de travail.

Enfin, je remercie ma famille pour leur présence et leur soutien de tous les jours.

# Table des Matières

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>7</b>
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
I.1. CONTEXTE	9
I.2. LES COMPOSES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	10
I.2.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	10
Définition	10
Origine	11
Propriétés physico-chimiques	11
Propriétés fluorescentes des HAPs	11
Toxicité	12
I.2.2. Les composés aromatiques polycycliques (CAPs) polaires	12
I.2.3. La contamination des sols et les procédés de bioremédiation	12
I.3. BIODEGRADATION MICROBIENNE DES HAPs	13
I.3.1. Voies métaboliques de dégradation des HAPs	13
Biodégradation en aérobiose par les bactéries du sol	14
Dégradation par les champignons	15
Impact de la rhizosphère sur le potentiel métabolique de dégradation des microorganismes	15
I.3.2. Les techniques d'étude des microorganismes dégradants les HAP	16
Techniques moléculaires	16
La PCR quantitative	16
Puces à ADN	16
Couplage entre diversité des microorganismes dégradants et leur fonction	17
Mise en culture et isolement	17
Stable Isotope Probing (SIP)	17
Etude du métabolisme d'une communauté en microplaque Biolog	18
<b>II. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>20</b>
II.1. LES SOLS ETUDIÉS	20

II.1.1. Caractéristiques .....	20
II.1.2. Préparation des inoculum de sol .....	20
II.2. DIVERSITE METABOLIQUE EN MICROPLAQUES .....	20
II.2.1. Microplaques Biolog™ MT2 .....	21
II.2.2. Composés aromatiques utilisés.....	21
II.2.3. Mesures en fluorescence.....	21
II.2.4. Conditions d'incubation des microplaques et mesures au spectrophotomètre .....	22
II.3.5. Traitement des données .....	22
II.3. ANALYSE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	23
II.3.1. Extraction d'ADN.....	23
II.3.2. PCR quantitative en temps réel .....	23
II.4. EXPERIENCE EN FLACONS .....	23
II.4.1. Mise en place de l'expérience.....	24
II.4.2. Mesure de minéralisation.....	24
II.4.3. Analyses.....	25
II.5. EXPERIENCE EN PRESENCE DE PLANTE .....	25
II.5.1. Mise en place de l'expérience.....	25
II.5.2 Echantillonnage et analyses.....	26
II.6. ANALYSES STATISTIQUES.....	26
<b>III. RESULTATS .....</b>	<b>26</b>
III.1. EXPERIENCE EN FLACONS .....	26
III.1.1. Mesure du taux de minéralisation .....	27
III.1.2. Mesures Biolog .....	27
III.1. 3. Quantification des gènes codant les ARNr 16S, 18S et les HAP-dioxygénases.....	30
III.2. EXPERIENCE EN PRESENCE DE PLANTES .....	31
III.2.1. Biomasse végétale .....	31
III.2.2. Mesures en absorbance.....	31
III.2. 3. Mesures en fluorescence .....	32
Mise au point.....	32
Mesures sur les inocula de sol.....	32
III.2. 4. Relation absorbance/fluorescence pour les puits « phénanthrène » .....	33
<b>IV. DISCUSSION.....</b>	<b>33</b>
IV.1. BIAIS METHODOLOGIQUES ET LIMITES DE LA METHODE .....	33

IV.2. IMPACT D'UNE RE-CONTAMINATION SUR LE PROFIL METABOLIQUE DE DEGRADATION DE COMPOSES AROMATIQUES .....	34
IV.2.1. Faible impact de la re-contamination sur la communauté bactérienne.....	34
IV.2.2. Une minéralisation rapide et une diminution de la diversité métabolique : cas du phtalate, du fluorène et du 9-fluorène.....	36
IV.2.3. Une minéralisation rapide et une augmentation de la diversité métabolique : cas du Phénanthrène.....	37
IV.2.4. Une minéralisation faible et une augmentation de la diversité métabolique : cas du Pyrène et du 1-hydroxy-2-naphtoate.....	38
IV.2.5. Une absence de minéralisation : cas du 2,3-dihydroxynaphtalène.....	39
IV.3. IMPACT DU TYPE DE SOL ET DE LA PRESENCE DE PLANTES SUR LE PROFIL METABOLIQUE DE DEGRADATION DES COMPOSES AROMATIQUES.....	39
IV. 3.1. Impact de la présence de plantes et effet rhizosphère.....	40
Conclusion.....	41
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>42</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>48</b>

## Liste des Tableaux et Figures

<b>Figure 1 :</b> Structure des 16 HAP prioritaires définis par l'US-EPA .	10 bis
<b>Figure 2 :</b> Voies métaboliques de dégradation bactérienne de quatre HAPs.	14 bis
<b>Figure 3 :</b> Illustration schématique de la rhizosphère et des microorganismes associés...	15 bis
<b>Figure 4 :</b> Plan de la microplaque Biolog MT2	21 ter
<b>Figure 5 :</b> Pots plantés et non plantés avec le ray-grass après 3 semaines d'incubation en chambre phytotronique	26 bis
<b>Figure 6 :</b> Courbes de minéralisation des sols recontaminés et sols Témoin	27 bis
<b>Figure 7 :</b> Mesure moyenne de la différence de DO <sub>595nm</sub> des puits des microplaques Biolog entre les conditions sol re-contaminé et sol Témoin	28 quater
<b>Figure 8 :</b> Concentration en ADN des sols re-contaminés et des sols Témoin	30 bis
<b>Figure 9 :</b> Comparaison du nombre de copies des gènes codant les ARNr 16S et ARNr 18S, les HAP-dioxygénases des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif ainsi que les ratios de ces gènes rapportés au nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S, dans les sols re-contaminés et les sols témoins	30 ter
<b>Figure 10 :</b> Masses sèches des parties aériennes et racinaires du ray-grass issus des sols en condition plantée	31 bis
<b>Figure 11 :</b> Comparaison de l'évolution de l'absorbance et de la fluorescence et courbe de régression linéaire entre l'absorbance et la fluorescence des puits phénanthrène inoculés avec les sols de Neuves-Maisons plantés et non plantés pendant 21 jours d'incubation	33 ter
<b>Tableau I :</b> Caractéristiques des sols, leurs teneurs en 8 HAPs étudiés ainsi que leurs teneurs en HAPs totaux	20 bis
<b>Tableau II :</b> Caractéristiques des sols, leurs teneurs en 8 HAPs étudiés.	21 bis
<b>Tableau III :</b> Amorces, températures d'hybridation, nombre de cycles d'amplification et taille des fragments attendus du protocole qPCR	23 bis
<b>Tableau IV :</b> Valeurs moyennes d'absorbance à 595 nm pour les puits des microplaques Biolog contenant les 30 composés aromatiques et inoculées avec les inocula issus des sols re-contaminés ou non	28 bis - 28 ter

**Tableau V** : Mesure moyenne de l'absorbance à 595 nm des microplaques Biolog inoculées avec les inocula des différents sols en condition plantée et non plantée après 3 semaines d'incubation..... 32 bis

**Tableau VI** : Longueurs d'onde d'excitation et d'émission et paramètres du spectrophotomètre établis à partir des spectres de fluorescence réalisés en Uvettes définis pour la détection de composés..... 33 bis

**Tableau VII** : Mesure de l'intensité de fluorescence (en Unité arbitraire de fluorescence) après 21 jours d'incubation des puits contenant des composés inoculés avec les sols..... 33 bis

## Abréviations

°C = degré Celsius

1-hyd-2Naph = 1-hydroxy-2-naphtoate

1-hyPyr = 1-hydroxypyrène

2,3 diNaph = 2,3-dihydroxynaphtalène

BenzAntONE = 7H-benz(de)anthracène-7-one

9,10-PheONE = 9,10-Phenanthrène quinone

9FluONE = 9-fluorène

9-PheOL = 9-phénanthrol

ADN = Acide desoxyribo-nucléique

ADNr = Acide desoxyribo-nucléique ribosomique

Antquinone = Anthraquinone

ARN = Acide ribonucléique

BaP = Benzo(a)pyrène

BSA = Bovine serum albumine

BenzAntDIONE = Benz(a)anthracène-7,12-dione

C = Nombre de cycles d'amplification du protocole PCR

CAP = Composé aromatique polycyclique

DbA = Dibenzo(a,h)anthracène

DMSO = Diméthylsulfoxyde

DO = Densité optique

ETM = Élément trace métallique

FSC = Forward scatter

g = gramme

GISFI = Groupement d'Interêt Scientifique pour les Friches Industrielles

HAP = Hydrocarbure aromatique polycyclique

HOM = Homécourt

J = Joeuf

j = Jours

L = Litres

mol = Mole

NM = Neuves-Maisons

nm = Nanomètre ( $10^{-9}$ m)

PAH-RHD = Polycyclic Aromatic Hydrocarbon – Ring Hydroxylating Dioxygenase

p = p-value

pb : Paires de bases

PCR = Polymerase Chain Reaction

ppm = parties par million

protocatéchu = protocatéchuate

qPCR = quantitative Polymerase chain reaction

rpm = Rotations par minute

TH = Températures d'hybridation

TF = Taille des produits PCR attendue

UF = Unité arbitraire de fluorescence

UMR = Unité Mixte de Recherche

US-EPA = US-Environmental Protection Agency

$\mu$ l = microlitre ( $10^{-6}$  litre)

# **I. Introduction**

## **I.1. Contexte**

Les composés aromatiques polycycliques (CAPs) sont molécules caractérisées par la présence d'au moins deux cycles benzéniques. Parmi ces CAPs, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont largement étudiés en raison de leur persistance dans l'environnement et de leur caractère toxique, mutagène et cancérigène (Cerniglia & Heitkamp, 1989 ; Reynaud and Deschaux, 2006). Les HAPs sont des polluants d'origine anthropique issus de processus de combustion incomplète et de pyrolyse de la matière organique. Ils sont présents dans les sols, notamment au niveau de sites industriels utilisant ou ayant utilisé des procédés de combustion (ex : cokeries, usines de production de goudron) (Harvey, 1991). Leur faible solubilité dans l'eau limite leur lessivage vers les milieux aquatiques. Par ailleurs, comme ils ont une forte affinité avec la matière organique et la fraction argileuse des sols, leur biodisponibilité et leur biodégradation y sont limitées (Volkering *et al.* 1992, 1993). Du fait de leur caractère persistant et de leur toxicité, ils sont inscrits sur la liste des polluants prioritaires par l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (US-EPA, Environmental Protection Agency) (Keith et Telliard, 1979). Aujourd'hui, ils font également partie des listes de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) et de la Communauté Européenne. En revanche, aucun autre CAP (oxygéné, nitré ou métabolite de dégradation des HAPs) n'est surveillé au niveau environnemental, alors que ces composés sont plus mobiles et souvent plus toxiques que les HAPs.

Plusieurs traitements de remédiation des sols existent pour éliminer les HAPs. Les procédés de remédiation chimiques (oxydation), thermiques (incinération, désorption) et biologiques peuvent conduire soit à une dégradation complète des HAPs soit à leur transformation partielle en sous-produits de dégradation, généralement plus solubles et parfois plus toxiques (Gan et al., 2009). La bioremédiation est un procédé de traitement biologique faisant appel au potentiel des organismes vivants (plantes, microorganismes). Pour la contamination par les HAPs, les traitements de bioremédiation utilisent les capacités de biodégradation des polluants par les microorganismes (bactéries et champignons) du sol. Cette méthode de remédiation biologique est moins coûteuse que les méthodes de remédiation chimiques et thermiques et présente l'avantage de ne pas déstructurer le sol traité (Habe et Omori, 2003).

L'efficacité de cette dégradation dépend de la diversité structurale et surtout fonctionnelle des communautés microbiennes du sol (Lu *et al.*, 2011). En effet, à la suite d'une pollution, les communautés microbiennes s'adaptent et les microorganismes capables de dégrader le polluant sont sélectionnés. Toutefois les propriétés physico-chimiques des sols et la présence de plantes, influencent le développement des communautés microbiennes. Il est donc essentiel de pouvoir estimer le potentiel métabolique de biodégradation d'une communauté microbienne d'un sol, pour prédire le devenir de la pollution.

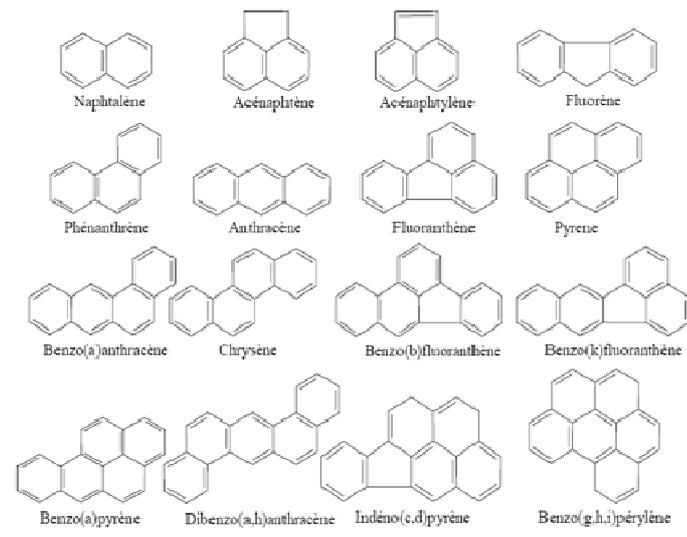
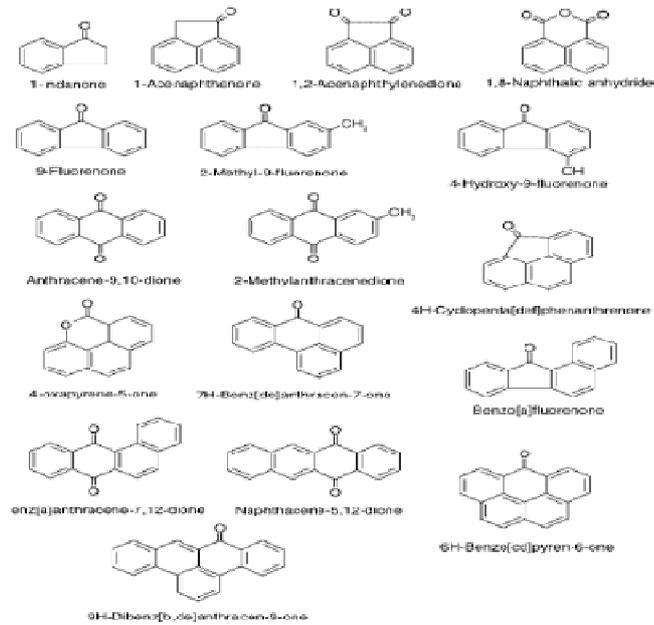
Mon stage s'inscrit dans le cadre du projet ANR RhizOrg qui vise à étudier la répartition spatio-temporelle des HAP et des microorganismes dégradants dans la rhizosphère des plantes. Mon stage concerne une étape de mise au point de l'étude fonctionnelle des microorganismes du sol. Au cours de ce stage, l'objectif était de mettre au point une technique permettant de caractériser *in vitro* le potentiel métabolique de dégradation de différents composés aromatiques (HAPs, CAPs, métabolites intermédiaires et produits finaux de dégradation) des communautés microbiennes de différents sols pollués. Cette technique, basée sur l'utilisation de microplaques Biolog MT2 MicroPlate™, doit permettre de mesurer la biodégradation de 30 substrats aromatiques grâce des mesures d'absorbance (croissance et activité microbienne) et de fluorescence pour certains composés.

## **I.2. Les composés aromatiques polycycliques**

### **I.2.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques**

#### **Définition**

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des composés chimiques définis par la présence d'au moins deux noyaux benzéniques liés entre eux de façon covalente et constitués uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène (Figure 1A). Selon le nombre de cycles, ils sont classés en HAPs légers (jusqu'à trois cycles) ou lourds (au-delà de trois cycles). Parmi la grande diversité de HAPs, 16 composés ont été inscrits sur la liste des polluants prioritaires par l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (US-EPA) (Figure 1A).

**A****B**

**Figure 1** : Structure des 16 HAP prioritaires définis par l'US-EPA (A) et structure de certains CAPs oxygénés (B).

## Origine

Les HAPs peuvent avoir de nombreuses origines, celles-ci sont regroupées en trois catégories (Wilcke., 2000) :

- Pyrolytiques : Formation par combustion incomplète de matières organiques d'origine naturelle (incendies, volcanisme) ou anthropique (activité domestique ou industrielle). Cette source est responsable de la majorité des émissions de HAP dans l'atmosphère.
- Diagénetiques : Formation par transformation par les organismes vivants.
- Pétrogéniques : Formation à partir des produits pétroliers ou des dérivés des produits pétroliers. Cette source est responsable d'émissions localisées et chronique (activité portuaire, raffinerie, lessivage des infrastructures routières) ou accidentelle (marée noire).

## Propriétés physico-chimiques

Les HAPs ont une faible volatilité et une très faible solubilité dans l'eau, étant inversement proportionnelles au poids moléculaire de la molécule (i.e. nombre de noyaux benzéniques) (McKay et Calcott, 1998). Ils sont fortement hydrophobes (fort coefficient de partage octanol/eau) et sont donc solubles dans de nombreux solvants organiques. Dans les sols, ces propriétés induisent leur concentration dans les fractions organiques les rendant très faiblement biodisponibles pour les microorganismes telluriques.

## Propriétés fluorescentes des HAPs

L'absorption d'une lumière de courte longueur d'onde par de nombreux composés organiques conduit à une émission de fluorescence. Chaque molécule possède son propre spectre de fluorescence, qui peut être décomposé en spectre d'excitation (ensemble des longueurs d'onde excitant la molécule) et d'émission (ensemble des longueurs d'ondes émises lors de la relaxation des photons) (Lakowicz, 2007).

Les HAPs possèdent des spectres de fluorescence très caractéristiques, les composés cycliques absorbent généralement dans l'UV et chaque cycle possède ces propres longueurs d'ondes d'excitation et d'émission (Mulas *et al.*, 2006). Chaque composé aromatique polycyclique possède ainsi son propre spectre d'émission et d'excitation, ce qui peut permettre sa détection et son identification par des méthodes de spectroscopie de fluorescence. Depuis de nombreuses années ces propriétés sont utilisées pour le dosage des HAPs en solution en HPLC grâce à des détecteurs fluo/UV (Blankenhorn *et al.* 1992). Directement sur les sols la détection de HAPs basée sur la fluorescence a montré de bonnes

capacités de discrimination et une bonne sensibilité, et a été utilisée pour caractériser la pollution (Alberts et Takacs 2004; Cory et McKnight 2005).

### Toxicité

La toxicité des HAPs et leur impact sur le fonctionnement des écosystèmes et sur la santé humaine sont généralement proportionnels au nombre de cycles benzéniques du composé.

Dans les sols contaminés, les HAPs peuvent être absorbés par les végétaux au niveau des racines et être internalisés dans les parties aériennes (Oguntimehin *et al.*, 2008). Ils peuvent ainsi, par consommation des végétaux, être ingérés par les animaux et transférés puis bioaccumulés le long de la chaîne trophique (Vaughan, 1983).

### I.2.2. Les composés aromatiques polycycliques (CAPs) polaires

Les CAPs polaires sont des composés aromatiques polycycliques contenant des atomes de soufre, d'azote et/ou d'oxygène associés aux cycles (Figure 1B). Ils sont de ce fait plus polaires que les HAPs, ce qui leur confère un caractère plus hydrophile et sont ainsi plus mobiles dans l'environnement que les HAPs dont ils sont issus. Les CAPs polaires sont beaucoup moins étudiés que les HAPs puisqu'ils ne font pas partie des listes des polluants prioritaires dont le suivi sanitaire est recommandé. Pourtant leur toxicité est souvent bien supérieure à celle des HAPs.

Les CAPs nitrés (CAP-N) sont dans l'environnement généralement associés aux HAPs dont ils dérivent. Ils peuvent être formés par nitration au cours de la combustion incomplète de la matière organique ou formés à partir des HAPs préexistants dans l'atmosphère par des photo-réactions (Perraudin, 2004). Ils sont moins abondants mais peuvent atteindre des toxicités 100.000 fois supérieures à celles des HAPs (Feilberg et Nielsen, 2000).

Les oxy-HAPs (CAPs-O) sont des CAPs contenant des groupements alkyles ou hydroxyles. Ces composés peuvent être formés lors des voies de dégradation microbiennes (Lundstedt *et al.*, 2007). Certaines études montrent que de nombreux CAP-O présentent une toxicité avérée pour les organismes aquatiques et terrestres (Lundstedt *et al.* 2007).

### I.2.3. La contamination des sols et les procédés de bioremédiation

La base de données BASOL répertorie 1230 sols contaminés par les HAPs en France. En Lorraine, 6000 hectares sont contaminés par les HAPs, ce qui constitue une très large surface de contamination. L'essentiel des sites contaminés sont d'anciennes zones industrielles désaffectées, devenues aujourd'hui des friches industrielles. Ces zones fortement contaminées sont étudiées dans une perspective de remédiation. Selon le niveau de contamination et le type de risque lié à la pollution, et le coût du traitement, le mode de gestion et de traitement des sols peut varier. Les procédés de remédiation les plus communément utilisés sont l'incinération, la désorption thermique et l'oxydation chimique *in situ* (Colombano *et al.* 2010). Ces traitements sont néanmoins coûteux et ont un impact important sur les propriétés des sols. Les processus de biodégradation des HAPs, dans les sols, bien qu'il s'agisse de processus plus lents, peuvent être utilisés pour suppléer ces techniques physico-chimiques de remédiation. En effet, les traitements de bioremédiation sont des procédés moins coûteux qui conservent l'intégrité des sols (Leyval, 2005). Ils reposent sur l'atténuation de la toxicité des polluants via biotransformation, minéralisation ou immobilisation de ces polluants. Parmi ces techniques, la biostimulation (stimulation de l'activité de dégradation de la microflore indigène) (Scullion, 2006), la bioaugmentation (inoculation dans le sol d'organismes dégradeurs) (Pandey *et al.*, 2009) et la phytoremédiation (remédiation utilisant les propriétés de dépollution des végétaux combinées aux fonctions des microorganismes rhizosphériques) (Abhilash *et al.*, 2009) sont applicables dans le cadre d'une pollution aux HAPs.

### **I.3. Biodégradation microbienne des HAPs**

#### **I.3.1. Voies métaboliques de dégradation des HAPs**

Les microorganismes présents dans les sols sont capables de métaboliser une grande diversité de composés organiques. Une partie de ces microorganismes est capable de dégrader partiellement voire complètement les HAPs (Bamforth et Singleton, 2005). La biodégradation microbienne constitue ainsi un mécanisme majeur de la dégradation des HAPs dans les sols (Peng *et al.*, 2008). Bien que les bactéries dénitrifiantes, sulfatoréductrices ou méthanogènes, soient capables de dégrader les HAPs en anaérobioses (Meckenstock et Mouttaki, 2011), elles constituent une fraction minoritaire dans les sols. En revanche, la dégradation des HAPs y est presque essentiellement réalisée par des bactéries aérobies (Haritash et Kaushik, 2009) et des

champignons capables d'utiliser les HAPs comme seule source de carbone ou de les dégrader par co-métabolisme (Peng *et al.*, 2008).

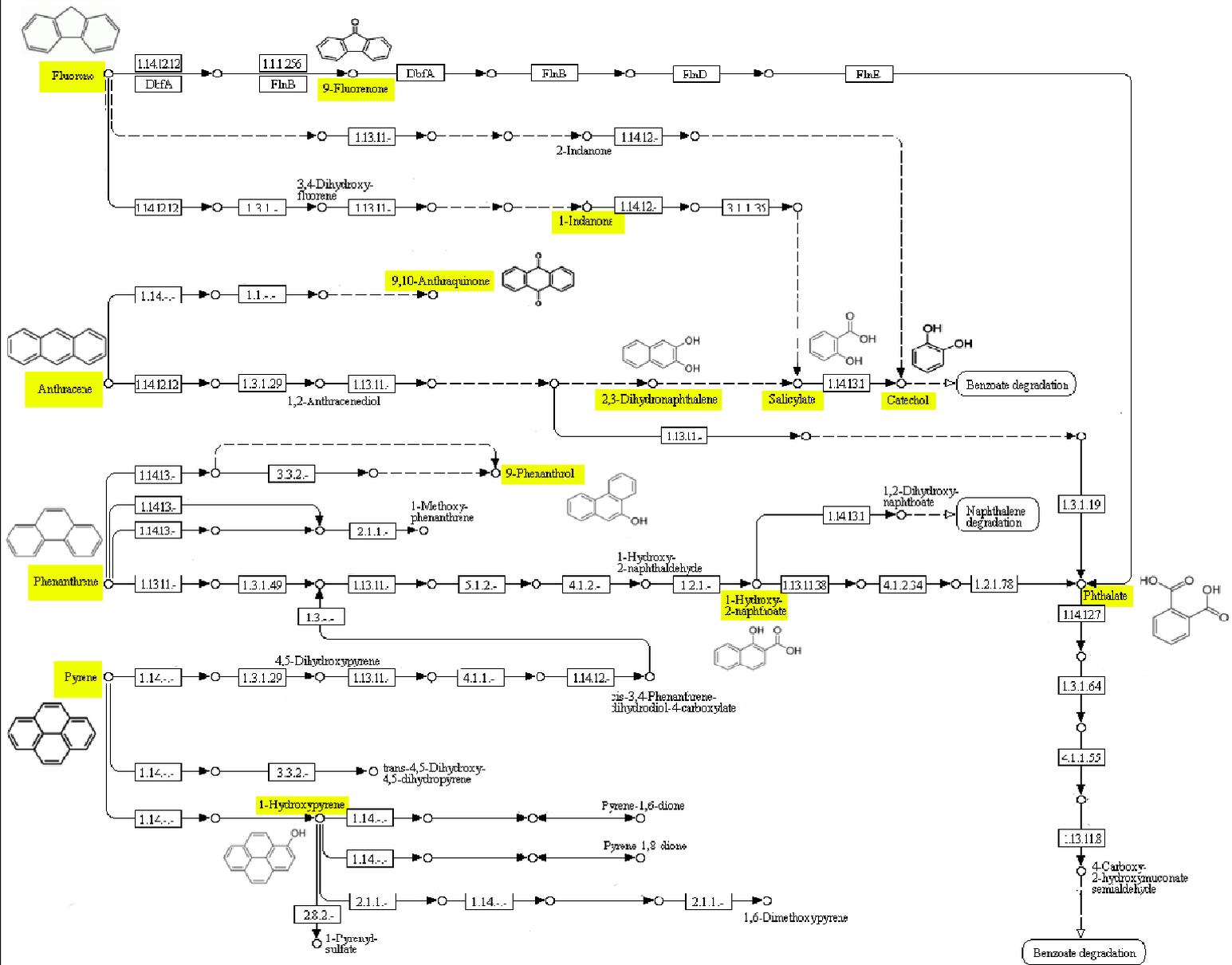
### Biodégradation en aérobie par les bactéries du sol

De nombreuses souches de bactéries sont connues pour leur capacité à dégrader les HAPs, notamment au sein des Protéobactéries (parmi les plus étudiées on retrouve les genres *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*), des Firmicutes (principalement le genre *Bacillus*) et des Actinobactéries (*Arthrobacter*, *Mycobacterium*) (Johnsen *et al.*, 2004). Ces bactéries sont souvent capables de métaboliser les HAPs, puisqu'elles peuvent utiliser comme seule source de carbone pour leur croissance un ou plusieurs HAPs (Peng *et al.*, 2008). Ceci concerne en particulier les HAPs de faible poids moléculaire (NAP, PHE, ANT, Figure 1A). Les HAPs de haut poids moléculaire sont plus souvent dégradés par co-métabolisme, c'est-à-dire qu'ils sont dégradés mais ne sont pas directement utilisés comme substrat pour leur croissance (Criddle, 1993). La biodégradation des HAPs consiste en la réduction du nombre de cycle de la molécule par ouverture enzymatique de ces cycles, pour aboutir dans certaines voies métaboliques à des composés monocycliques (catéchol, phtalate) qui seront ouverts à leur tour pour former des composés pouvant être utilisés dans le métabolisme central via le cycle de Krebs (Figure 2).

La biodégradation aérobie des HAPs par les bactéries se décompose en deux grandes étapes : la voie haute, depuis le HAP parent jusqu'à l'acide carboxylique dérivé, suivie par la voie basse aboutissant à un composé pouvant être intégré au cycle de Krebs (Johnsen *et al.*, 2008). La première étape de la voie haute consiste en l'intégration des 2 atomes d'une molécule d'oxygène dans l'un des noyaux aromatiques, aboutissant à l'ouverture d'un des cycles de la molécule. Cette étape est catalysée par une « PAH-ring hydroxylating dioxygenase » (ou PAH-RHD). Elle aboutit à la formation de cis-dihydrodiol (Habe et Omori, 2003). Le cycle est ensuite ré-aromatisé par une di-hydrodiol déshydrogénase pour former un intermédiaire di-hydroxyle transformé en acide carboxylique par une cascade enzymatique.

Au cours de la voie basse l'acide carboxylique issu de la voie haute est transformé en catéchol puis clivé pour aboutir, à la suite d'une cascade enzymatique, à la formation de pyruvate qui sera intégré au niveau du cycle de Krebs.

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DEGRADATION



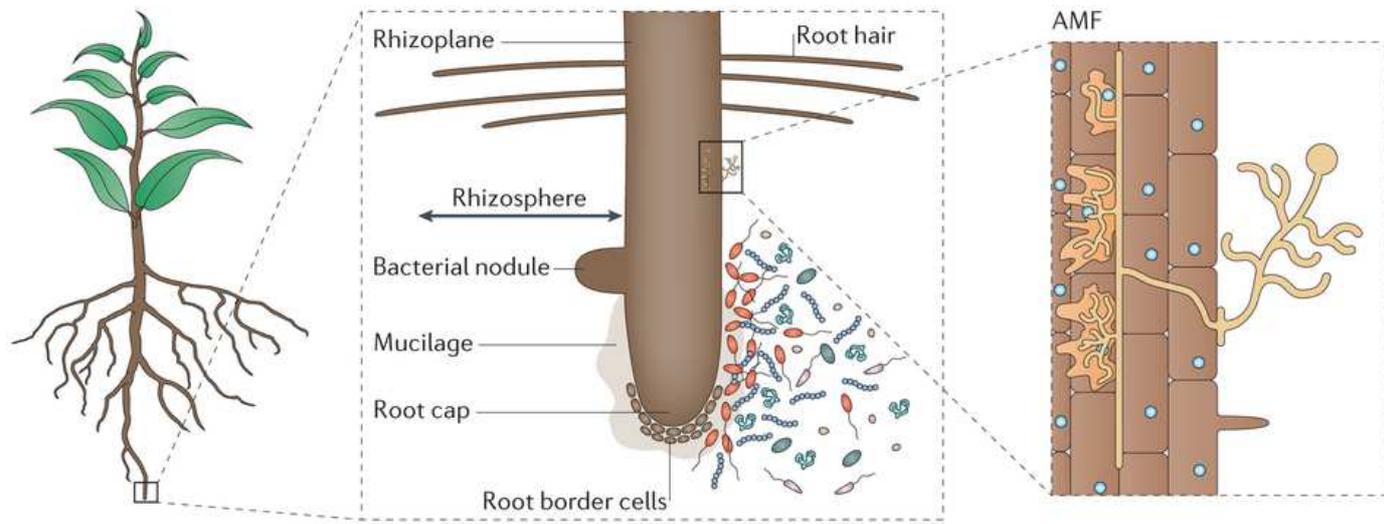
**Figure 2 :** Représentation simplifiée des voies métaboliques de dégradation bactérienne de quatre HAPs, d'après Kanehisa Laboratories [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00624+C11429](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00624+C11429). En jaune sont figurés les composés aromatiques utilisés au cours du stage, leur structure a été ajoutée à la figure.

### Dégradation par les champignons

De très nombreuses souches de champignons appartenant à différents taxons sont connues pour dégrader les HAP : Basidiomycètes, Ascomycètes, Deutéromycètes et Zygomycètes. Dans la grande majorité des cas, les champignons dégradent les HAP par co-métabolisme. Les voies enzymatiques de dégradation des HAP par les champignons sont différentes de celles de bactéries (Valentin *et al.*, 2006). Les mécanismes de dégradation par les champignons les mieux connus sont la détoxification par le cytochrome P450 et la excrétion d'enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation de la lignine (champignons lignolytiques notamment les champignons Basidiomycètes de la pourriture blanche), mais il existe de nombreux autres mécanismes (excrétion d'espèces oxygénées réactives) (Thion, 2012). Les champignons peuvent dégrader une large gamme de HAPs même ceux de haut poids moléculaire et générer des métabolites intermédiaires de dégradation de type quinones qui pourront être plus ou moins facilement dégradés par la suite selon leur structure (Peng *et al.*, 2008).

### Impact de la rhizosphère sur le potentiel métabolique de dégradation des microorganismes

La rhizosphère correspond à la région du sol directement sous l'influence des racines. Elle constitue un lieu d'échanges permanents entre le végétal, les nombreux microorganismes tellurique et les substrats organiques du sol (Hiltner, 1904) (Figure 3). Il a été montré que la présence de plantes pouvait stimuler les capacités de dégradation des microorganismes du sol (Liu *et al.*, 2014). En effet, au niveau de la rhizosphère, l'excrétion par les végétaux d'exsudats de nature diverse (sucres, acides aminés, vitamines) constituant des sources de nutriments carbonés et azotés peut stimuler l'activité de dégradation des microorganismes au voisinage des racines. Des molécules surfactantes peuvent également être excrétées au niveau des racines permettant la solubilisation de certains HAPs et facilitant leur dégradation par les microorganismes (Joner *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2013). L'efficacité de biodégradation peut encore être améliorée par l'excrétion d'analogues structuraux de HAPs par les plantes, pouvant induire l'expression génique d'enzymes impliquées dans la dégradation des HAPs chez les microorganismes du fait de leur similitude structurale partielle avec ces polluants. (Crowley *et al.*, 2000 ; Singer *et al.*, 2003). L'ensemble de ces processus est appelé « effet rhizosphère » (Berendsen *et al.*, 2012). Une dégradation des HAPs peut être en effet observée lorsqu'un apport d'exsudats racinaires est effectué sur un sol non végétalisé. Ainsi,



**Figure 3** : Illustration schématique de la rhizosphère et des microorganismes associés, d'après Philippot *et al.*, (2013) Nature Reviews Microbiology.

l'incorporation d'exsudats de maïs, obtenus à partir de cultures hydroponiques, a pour effet d'augmenter la dégradation du pyrène marqué au  $^{14}\text{C}$  dans des sols non végétalisés (Yoshitomi et Shann, 2001)

### I.3.2. Les techniques d'étude des microorganismes dégradants les HAP

#### Techniques moléculaires

##### La PCR quantitative

A partir de gènes connus impliqués dans les processus métaboliques d'intérêt, les techniques d'amplification par PCR permettent de mettre en évidence la présence de ces gènes au sein des communautés microbiennes. En ciblant ces gènes d'intérêt à l'aide d'amorces spécifiques, la PCR quantitative permet de détecter et de quantifier le nombre de copies de ces gènes et renseigne sur leur représentation parmi les microorganismes de la communauté. Elle se base sur l'utilisation d'un agent intercalant de l'ADN (SYBR Green) pour détecter et quantifier les amplicons au cours d'une réaction PCR (Boyer et Combrisson, 2013). Outre la quantification de gènes très conservés pour estimer l'abondance de l'ensemble d'une communauté (ADNr 16S pour les bactéries), la PCR quantitative permet de quantifier des gènes fonctionnels codant pour des enzymes impliquées dans les voies de dégradation des composés aromatiques, telles que les PAH-RHD (Cébron *et al.*, 2008). Par ailleurs, cette technique permet de mettre en évidence l'activité des microorganismes si les transcrits de ces gènes sont quantifiés à partir des ADNc générés par reverse transcription.

##### Puces à ADN

L'analyse du métatranscriptome d'une communauté donne accès à une information sur le niveau d'expression des gènes ciblés (taux de transcrits) et de leur activité au sein de la communauté. La technique d'analyse par puce à ADN (ou DNA-chip ou DNA-microarray) permet de comparer l'expression de gènes ciblés dans plusieurs conditions. Les ADNc de chaque condition testée sont marqués par un fluorochrome. Les ADNc sont ensuite hybridés sur une puce contenant des fragments d'ADN (sondes) dont la séquence correspond aux gènes dont on veut étudier l'expression. L'intensité du signal fluorescent de chaque sonde est proportionnelle à l'intensité d'expression du gène. Ainsi on a pu montrer que l'addition de phénanthrène dans un sol non pollué activait au sein de la communauté microbienne du sol

l'expression de nombreux gènes impliqués dans différentes voies métaboliques notamment des gènes du métabolisme des composés aromatiques mais aussi de respiration et de réponse au stress (de Menezes *et al.*, 2012).

Bien que très informatives, ces techniques moléculaires sont limitées à l'analyse des espèces bactériennes dont les génomes et/ou séquences de gènes fonctionnels sont disponibles sur les bases de données publiques (GenBank ou Fungene). Par ailleurs, ces techniques renseignent peu sur l'identité des microorganismes, elles ne ciblent que les gènes fonctionnels qui peuvent être partagés par un grand nombre de bactéries appartenant à des genres différents (transferts horizontaux de gènes fonctionnels portés par des plasmides) (DeBruyn *et al.*, 2012).

### Couplage entre diversité des microorganismes dégradants et leur fonction

#### Mise en culture et isolement

L'utilisation de milieux de cultures sélectifs (contenant les CAPs comme seule source de carbone) permet l'isolement de microorganismes sinon dégradants, du moins tolérants aux CAPs et est souvent utilisée comme méthode préliminaire à l'analyse par des méthodes moléculaires des microorganismes. Elle permet aussi la mise en évidence de leur capacité effective à dégrader le composé dans le milieu (halos de décoloration autour des colonies sur milieu solide contenant le polluant) et permet d'étudier le métabolisme et d'identifier les voies de dégradation de ces microorganismes (Hilyard *et al.*, 2007).

Toutefois, les étapes d'isolement de souches capables de métaboliser les HAP sont laborieuses car leur croissance est lente et leur potentiel de biodégradation (souvent porté par des gènes plasmidiques) est difficile à maintenir *in vitro*. Par ailleurs, une faible proportion de ces microorganismes est cultivable dans les milieux gélosés conventionnellement utilisés.

#### Stable Isotope Probing (SIP)

Le DNA stable-isotope probing (DNA-SIP) est une technique permettant d'identifier les microorganismes métaboliquement actifs d'une communauté, par assimilation de substrats carbonés marqués au  $^{13}\text{C}$ . Cette technique, indépendante de la mise en culture, est l'une des seules à permettre l'identification moléculaire des microorganismes impliqués dans la biodégradation de polluants, elle fait donc le lien entre diversité et fonction. Son principe est basé sur l'incorporation dans l'ADN des microorganismes, de l'isotope stable provenant du substrat marqué conduisant à un changement de densité de l'acide nucléique. Après

l'incubation et biodégradation du substrat marqué, les ADN sont extraits et soumis à un gradient de densité, séparant les acides nucléiques de différentes densités. L'ADN des fractions lourdes (ADN marqué au  $^{13}\text{C}$ ) peut ensuite être analysé (PCR ciblant l'ADNr 16S et séquençage) pour identifier les microorganismes métaboliquement actifs de la communauté (Uhlík et al, 2013). Cette technique est notamment utilisée pour identifier les microorganismes actifs dans la dégradation des HAPs ; Cébron *et al.* (2011) ont montré en utilisant du phénanthrène marqué au  $^{13}\text{C}$ , que les exsudats racinaires modifiaient la diversité des microorganismes dégradants le phénanthrène dans un sol pollué par les HAPs. D'autre part, Singleton *et al.* (2006) ont montré qu'une fraction importante de Protéobactéries non cultivables était associée à la dégradation du pyrène dans les sols contaminés au HAPs. Toutefois, comme cette technique est très onéreuse (100 mg de phénanthrène marqué au  $^{13}\text{C}$  coûte 3800 €) et nécessite la synthèse à façon de composés marqués, elle ne permet pas d'étudier la biodégradation d'une large gamme de polluants.

#### Etude du métabolisme d'une communauté en microplaque Biolog

La technique en microplaque Biolog est une méthode de culture permettant la mise en évidence de la capacité des microorganismes à métaboliser ou à oxyder une gamme de différents substrats carbonés. Elle se présente sous forme de microplaque 96 puits, dont chaque puits contient un réactif (tétrazolium) se colorant en violet lors de réaction d'oxydoréduction dans le milieu, ainsi qu'un milieu de culture minimum sans source de carbone optimisé pour la culture d'un large spectre de bactéries. Les microplaques Biolog EcoPlates contiennent 3 répliquats de 31 substrats carbonés différents (polymères, carbohydrates, acides carboxyliques, acides aminés, amines et composés phénoliques) ; ces plaques sont couramment utilisées en écologie microbienne pour caractériser la diversité métabolique d'une communauté microbienne. Le tétrazolium est un réactif qui se colore en violet suite à sa réduction par l'activité de respiration des microorganismes, il permet de témoigner de l'activité de dégradation du substrat carboné dans les puits par changement de couleur correspondant à l'oxydation du substrat, cette modification de couleur peut être quantifiée par mesure de l'absorbance à 595nm. Ainsi en apportant un inoculum bactérien dans la plaque, le tétrazolium permet de doser l'activité métabolique de dégradation de l'inoculum pour les différents composés contenus dans la plaque. En observant les profils de dégradation des 31 substrats des microplaques Biolog EcoPlates, cette technique permet de réaliser un typage métabolique de l'inoculum (Bochner, 1989 ; Garland, 1991). Les

microplaques Biolog Ecoplates sont également utilisées pour caractériser le profil métabolique de dégradation de communautés microbiennes de sol. Sofu *et al.*, (2014) ont caractérisé le profil métabolique des communautés microbiennes de sol d'une oliveraie cultivée avec des pratiques de développement durable. Les microplaques Biolog MT2 microplates sont des microplaques Biolog dont les puits ne contiennent aucune source de carbone. L'expérimentateur peut choisir les substrats servant de source de carbone à charger dans les puits de la plaque et tester le profil de dégradation de l'inoculum pour des composés choisis. Au cours de ce stage, des HAPs, des CAPs polaires et des produits intermédiaires et finaux de dégradation seront introduits dans les puits de Biolog MT microplates pour étudier le potentiel métabolique des communautés microbiennes issues de différents sols pollués à dégrader ces composés. Kadali *et al.* (2012) ont utilisé les microplaques Biolog MT2 microplates pour étudier le profil de dégradation de différents hydrocarbures de souches bactériennes en culture pure isolées pour leur capacité à se développer sur un milieu contenant du pétrole non raffiné comme seule source de carbone. Cependant, rien n'est documenté dans la littérature quant au profil métabolique de dégradation d'hydrocarbures aromatiques d'une communauté microbienne de sol.

L'objectif de ce stage a été de mettre au point une technique en microplaque Biolog MT pour évaluer le potentiel métabolique de dégradation d'un panel de 30 composés aromatiques des communautés microbiennes de divers sols pollués par les HAPs. La validation de cet outil a été réalisée en évaluant l'impact d'une re-contamination d'un sol par divers composés et l'influence de la présence de plantes.

## **II. Matériel et méthodes**

### **II.1. Les sols étudiés**

#### **II.1.1. Caractéristiques**

Les expériences ont été réalisées sur des sols industriels contaminés principalement par des HAPs mais aussi, à un degré moindre, en éléments trace métalliques (ETM). Les sols utilisés ont été collectés sur deux anciens sites industriels de Lorraine ayant connus au cours du XX<sup>ème</sup> siècle d'importantes activités sidérurgiques (cokeries, aciéries, gazomètre, etc...) et un site témoin. Les trois sols ont été caractérisés (Tableau I).

Le sol de Neuves-Maisons (54, France) a été prélevé sur le site en octobre 2004 puis a été transporté et entreposé à la station expérimentale du GISFI ([www.gisfi.fr](http://www.gisfi.fr)). Les échantillons utilisés proviennent d'un lot de ce sol qui a été séché à l'air puis tamisé à 2 mm en février 2013 et stocké depuis en fût à l'abri de la lumière.

Le sol d'Homécourt (54, France) a été prélevé dans une zone fortement contaminée sur la friche industrielle d'Homécourt. Un troisième échantillonnage a été réalisé sur un site forestier de la commune de Joeuf (54, France) à proximité du site industriel d'Homécourt. Ces deux sols ont été prélevés en janvier 2014, ils ont été ensuite séchés à l'air et tamisés à 2 mm.

#### **II.1.2. Préparation des inoculum de sol**

Les communautés microbiennes des différents sols étudiés ont été extraites pour inoculer des microplaques. Dans des tubes Falcon de 15 ml, 1g de sol est mélangé avec 10 ml de solution NaCl (0,85%) stérile et 1g de billes de verre (1mm de diamètre) stériles. Les tubes sont agités par rotation complète à 60 rpm pendant une nuit. Après décantation 5 min, la solution de sol est ensuite diluée au 1/10 ou au 1/100 dans du NaCl (0,85%) stérile. Un volume de 150 µl de l'une de ces dilutions a été utilisé pour inoculer les microplaques. Des microplaques témoins sont préparées en ajoutant le même volume d'eau ultrapure stérile à la place de l'inoculum. La densité bactérienne des inocula est mesurée au cytomètre en flux (Accuri C6 Flow Cytometer, BD, USA). La mesure est effectuée sur 10000 événements en vitesse de flux moyenne, en prenant en compte le critère de taille FSC = 15000. Une mesure de blanc est effectuée sur la solution de NaCl 0,85% utilisée pour la préparation de l'inoculum.

### **II.2. Diversité métabolique en microplaques**

**Tableau I :** Caractéristiques des sols, leurs teneurs en 8 HAPs étudiés ainsi que leurs teneurs en HAPs totaux (somme des 16 HAPs de la liste US-EPA) sont indiqués.

	Neuves-Maisons	Homécourt	Joeuf
Capacité de rétention en eau (ml H <sub>2</sub> O/100 g de sol)	25,5	48,8	49,8
Rapport C/N	24,9	56,3	14,20
Carbone (C) organique (g/kg)	58	559	23
pH	7,5	7,6	6,6
Teneur en fluorène (mg/kg)	31,8	192,9	0.00
Teneur en fluoranthène (mg/kg)	131,4	290,7	0.03
Teneur en phénanthrène (mg/kg)	67,9	436,6	0.10
Teneur en anthracène (mg/kg)	38,2	138,9	0,00
Teneur en pyrène (mg/kg)	126,0	398,9	0.00
Teneur en benzoapyrène (mg/kg)	100,9	120,5	0.04
Teneur en chrysène (mg/kg)	87,5	121,5	0.06
Teneur en dibenzo(a,h)anthracène (mg/kg)	77,8	107,1	0.08
Teneur en HAP totaux (mg/kg)	1253,4	2379,1	13,4

### II.2.1. Microplaques Biolog™ MT2

Les microplaques Biolog™ MT2 plates (AWEL) ont été utilisées pour les mesures en Absorbance. Le changement de coloration (tétrazolium violet) dans les puits des microplaques Biolog est mesuré au spectrophotomètre (SAFAS, Monaco) en mesurant l'absorbance à 595 nm et le suivi de la densité microbienne est effectué en mesurant l'absorbance à 600 nm. Dans notre étude nous avons testé les potentialités métaboliques de dégradation de composés aromatiques de divers inoculum issus de sols.

### II.2.2. Composés aromatiques utilisés

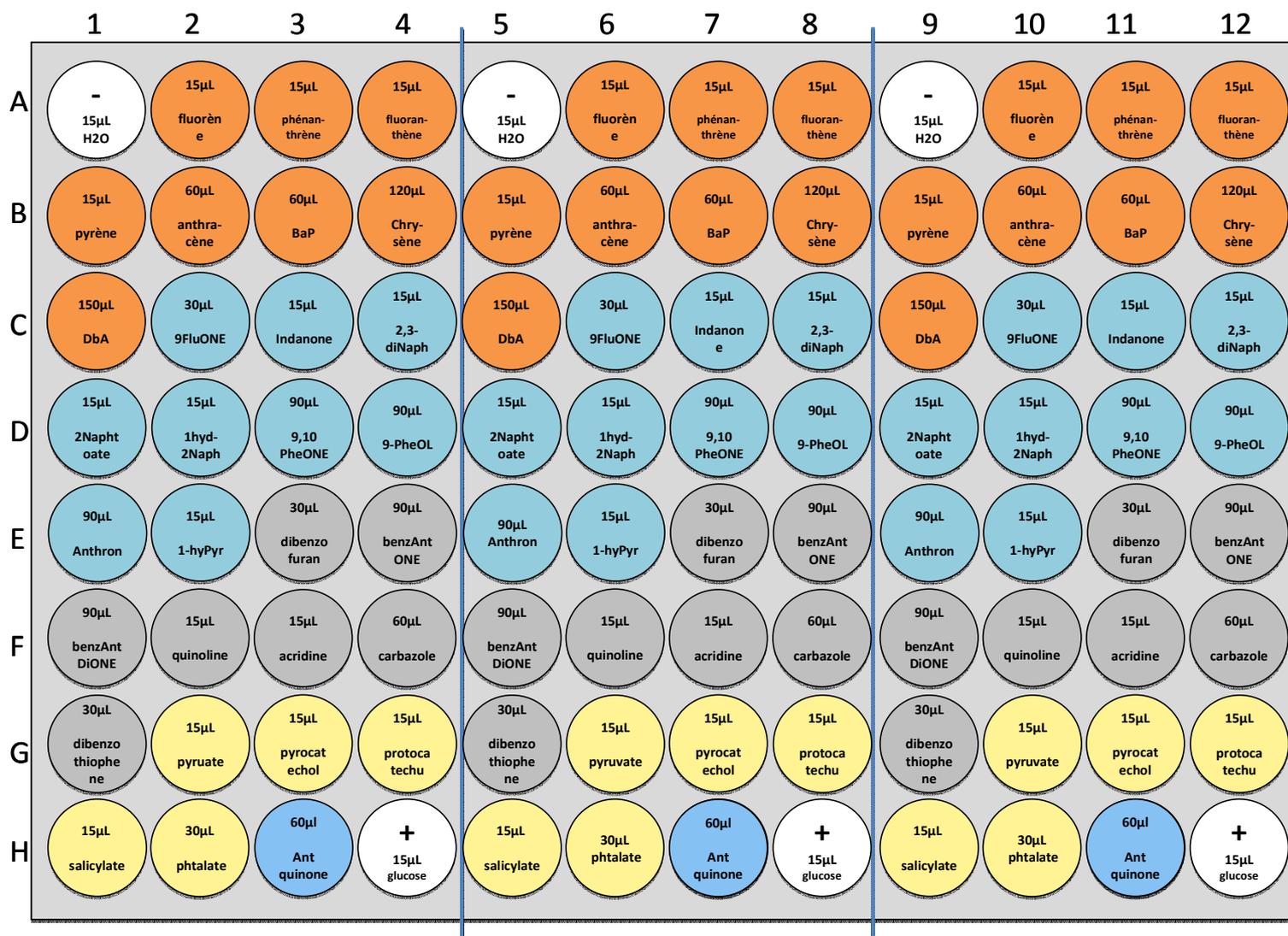
Dans chaque microplaque sont ajoutés 3 séries de 30 composés aromatiques (1 composé/puits), parmi lesquels 8 HAP, 10 métabolites intermédiaires des voies de dégradation des HAPs, 7 CAPs polaires et 5 métabolites finaux des voies de dégradation des HAPs (Tableau II et Figure 4). Deux puits l'un contenant du glucose et l'autre de l'eau ultrapure sont utilisés comme témoin positif et négatif. Des solutions stocks de substrats ont été préparées dans divers solvants choisis en fonction de la solubilité de chaque composé (Tableau II). Un volume de solution stock est ajouté aux puits de façon à apporter 0,3 mg de composé dans les puits (Figure 4). Après dépôt des substrats dissous dans les solvants organiques (hexane, acétone et éthanol), les plaques sont mises à évaporer sous hotte pour éliminer le solvant. Les substrats dissous dans l'eau sont ajoutés juste avant l'inoculation.

### II.2.3. Mesures en fluorescence

Afin de déterminer les longueurs d'ondes à utiliser pour les mesures en fluorescence, les spectres de fluorescence de chaque composé ont été réalisés au spectrophotomètre (SAFAS, Monaco) dans les cuves (Uvettes, Eppendorf). Les volumes de substrats ajoutés aux Uvettes sont identiques à ceux utilisés dans les microplaques et, après évaporation des solvants organiques, les volumes sont ajustés à 200 µl avec de l'eau ultrapure stérile. Les spectres d'émission sont réalisés en excitant à une longueur d'onde fixe et en balayant les longueurs d'ondes d'émission du composé, et les spectres d'excitation sont réalisés en se plaçant à la longueur d'onde d'émission maximale et en balayant les longueurs d'onde d'excitation. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisées pour la détection des composés en microplaques noires sont définies à partir des maxima d'excitation et d'émission des spectres obtenus (Annexe 2). Une valeur de photomultiplicateur (PM ; *i.e.* voltage établi par le

**Tableau II** : Composés utilisés dans les microplaques. Le type de composé, les masses (ou volumes) de composés et les volumes de solvant utilisés pour la préparation des solutions mères sont indiqués.

Substrats	Type de composé	Masse (ou volume) / volume de solvant
Fluorène	HAP	20mg dans 1 mL d'hexane
Phénanthrène	HAP	20mg dans 1 mL d'hexane
Fluoranthène	HAP	20mg dans 1 mL d'hexane
Pyrène	HAP	20mg dans 1 mL d'hexane
Anthracène	HAP	20mg dans 4 mL d'acétone
BaP (Benzoapyrène)	HAP	20mg dans 4 mL d'acétone
Chrysène	HAP	20mg dans 8 mL d'acétone
DbA (Dibenzo(ah)antracène)	HAP	20mg dans 10ml d'acétone
9-fluorènone	Métabolite intermédiaire	20mg dans 2 mL d'éthanol
1-indanone	Métabolite intermédiaire	20mg dans 1 mL d'éthanol
2,3-Dihydroxynaphtalène	Métabolite intermédiaire	20mg dans 1 mL d'éthanol
Acide-2-naphtoïque	Métabolite intermédiaire	20mg dans 1 mL d'éthanol
1-hydroxy-2-naphtoate	Métabolite intermédiaire	20mg dans 1 mL d'éthanol
9,10-phénanthrène quinone	Métabolite intermédiaire	20mg dans 7 mL d'éthanol
9-phénanthrol	Métabolite intermédiaire	20mg dans 2 mL d'éthanol
9,10-Anthraquinone	Métabolite intermédiaire	20mg dans 4 mL de chloroforme
1-hydroxypyrrène	Métabolite intermédiaire	20mg dans 1 mL d'éthanol
Anthrone	Métabolite intermédiaire	20mg dans 8 mL d'éthanol
Dibenzofuran	CAP polaire	20mg dans 2 mL d'éthanol
7H-benz(de)anthracène-7-one	CAP polaire	20mg dans 4 mL de chloroforme
Benz(a)antracène-7,12-dione	CAP polaire	20mg dans 4 mL de chloroforme
Quinoline	CAP polaire	20mg dans 1 mL d'éthanol
Acridine	CAP polaire	20mg dans 1 mL d'éthanol
Carbazole	CAP polaire	20mg dans 4 mL d'éthanol
Dibenzothophène	CAP polaire	20mg dans 2 mL d'éthanol
Pyruvate	Métabolite final	16 µl dans 1 ml de H <sub>2</sub> O
Pyrocatéchol	Métabolite final	20mg dans 1 ml de H <sub>2</sub> O
Protocatéchuate	Métabolite final	20mg dans 1 ml de H <sub>2</sub> O
Phtalate	Métabolite final	20mg dans 2 ml de H <sub>2</sub> O
Salicylate	Métabolite final	20mg dans 1 ml d'éthanol
Glucose	Sucre (témoin positif)	1g dans 50 ml de H <sub>2</sub> O (filtré à 0,22µm)



**Figure 4** : Plan de la microplaque Biolog MT2, le volume de solution déposé est indiqué pour chaque puits. Le code couleur illustre la nature des composés. En orange sont représentés les HAPs, en bleu les métabolites intermédiaires de dégradation, en gris les CAPs polaires, en jaune les métabolites finaux de dégradation et en blanc les témoins positifs et négatifs. BaP : benzo(a)pyrène ; DbA : dibenzo(a,h)anthracène ; 9FluONE : 9-fluorène ; 2,3 diNaph : 2,3-dihydroxynaphtalène ; 1-hyd-2Naph : 1-hydroxy-2-naphtoate ; 9,10-PheONE : 9-10-phénanthrène-quinone ; 9-PheOL : 9-phénanthrol ; 1-hyPyr : 1-hydroxypyrene ; benzAntONE : 7H-benz(de)anthracène-7-one ; benzAntDIONE : benz(a)anthracène-7,12-dione ; protocatéchu : protocatéchuate ; Antquinone : Anthraquinone.

spectrophotomètre pour la détection de photons permettant d'amplifier le signal) est déterminée pour chaque composé.

Cette analyse des spectres pour l'ensemble des composés nous a permis de choisir 9 substrats (fluorène, phénanthrène, fluoranthène, pyrène, anthracène, catéchol, 1-hydroxy-2-naphtoate, 2,3-dihydroxynaphtalène et 9-fluorènone) dont le signal a pu être efficacement détecté en fluorescence. Ces composés sont déposés dans des microplaques 96-puits Eppendorf® noires. Ces microplaques ont été utilisées pour la détection de signaux fluorescents car elles possèdent un très bon rapport signal-bruit. Les composés sont chargés dans les mêmes quantités que pour les microplaques Biolog (Figure 4). Des témoins négatifs remplis de 15µl d'eau servent pour mesurer le niveau basal de fluorescence. Pour incuber les échantillons dans les mêmes conditions que les microplaques Biolog, le milieu de culture de chaque puits d'une plaque Biolog vierge est dissous dans 50 µl d'eau ultrapure stérile et transféré dans chaque puits de la plaque noire.

#### II.2.4. Conditions d'incubation des microplaques et mesures au spectrophotomètre

Après inoculation des microplaques avec 150µl d'inoculum de sol (100 µl pour les microplaques noires), les microplaques sont mises dans un sac fermé hermétiquement et contenant 2 boîtes de Pétri remplies avec du coton imbibé d'eau. Ceci permet de maintenir une atmosphère aérobie mais saturée en eau afin d'éviter l'évaporation du contenu des puits lors de l'incubation des plaques à 24°C à l'obscurité pendant 3 à 4 semaines.

Pour les deux types de microplaque, une mesure est effectuée juste après inoculation (mesure à T=0). Les lectures sont effectuées une ou deux fois par semaines pendant 3 à 4 semaines. Le contenu des puits est homogénéisé par agitation de la plaque pendant 1 min à 500 rpm avant la lecture et la mesure est réalisée sur la plaque sans couvercle. Cinq mesures espacées chacune de 0,2 mm sont réalisées dans chaque puits, et la valeur moyenne de ces mesures est calculée. Le blanc du spectrophotomètre est réalisé pour chaque microplaque sur un puits témoin négatif contenant de l'eau et l'inoculum.

#### II.3.5. Traitement des données

Les valeurs d'absorbance/fluorescence à T=0 sont retranchées aux valeurs de toutes les mesures suivantes de la cinétique pour les microplaques inoculées et les microplaques témoin contenant de l'eau. Les valeurs de la plaque témoin sont ensuite retranchées aux valeurs des

plaques inoculées aux temps correspondants et pour chaque composé pour éliminer les variations d'absorbance dues à des phénomènes abiotiques.

## **II.3. Analyse de biologie moléculaire**

### **II.3.1. Extraction d'ADN**

Les ADN des communautés microbiennes des sols ont été extraits à l'aide du kit FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA). Ce kit permet l'extraction des ADN à partir d'un échantillon d'environ 500 mg de sol. Il comprend une étape de lyse mécanique par broyage des cellules à l'aide de billes, combinée à une lyse chimique à l'aide d'un détergent, une étape de séparation des particules de sol par centrifugation, puis de précipitation des protéines (acide acétique). Les ADN sont ensuite fixés à une matrice de silice et purifiés par une élution de la silice avec une solution à base d'éthanol. Après séchage de la matrice, les ADN sont récupérés par élution dans le DES (Dnase/Pyrogen-Free Water). La concentration en ADN et sa pureté ont été estimées au spectrophotomètre par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm.

### **II.3.2. PCR quantitative en temps réel**

Des PCR quantitatives sont réalisées sur les extraits d'ADN avec différents couples d'amorces : 968F-1401R amplifiant un fragment de 433 pb de l'ADNr 16S, Fung5F-FF390R amplifiant un fragment de 550 pb de l'ADNr 18S, PAH-RHD $\alpha$  GN F - PAH-RHD $\alpha$  GN R et PAH-RHD $\alpha$  GP F - RHD $\alpha$  GP R, amplifiant les HAP-dioxygénases des bactéries à Gram négatif et à Gram positif, respectivement (Tableau III). Pour l'amplification 1  $\mu$ l d'ADN est utilisé, il est ajouté à 19  $\mu$ l de mix qPCR (iQ SYBR Green Super Mix, BioRad) contenant le SYBR Green. Des dilutions d'un plasmide standard de concentrations connues sont utilisées pour réaliser une gamme d'étalonnage de  $10^8$  à  $10^1$  copies/ $\mu$ l.

Les composés, les volumes utilisés pour le mélange réactionnel PCR sont détaillés en Annexe 1.

## **II.4. Expérience en flacons**

Il s'agit de tester l'impact de l'ajout de divers composés aromatiques sur la diversité métabolique de la communauté microbienne du sol de Neuves-Maisons.

**Tableau III** : Amorces, températures d'hybridation, (TH), nombre de cycles d'amplification (C) et taille des fragments attendus (TF) du protocole qPCR.

ADNr 16S et 18S : gène codant les ARN ribosomiques 16S et 18S ; PAH-RHD $\alpha$  GN : gène codant les HAP-dioxygénases des bactéries Gram- ; PAH-RHD $\alpha$  GP : gène codant les HAP-dioxygénases des bactéries Gram +.

Cible	Amorces	Séquence 5' -> 3'	TF (pb)	TH (°C)	C	Ref.
ADNr 16S	968F	AAC GCG AAG AAC CTT AC	433	56	35	Felske et al., 1998
	1401R	CGG TGT GTA CAA GAC CC				
ADNr 18S	Fung5F	GGG AAC CAG GAC TTT TAC	550	50	35	Thion, 2012
	FF370R	GAGGTCTCGTTCGTTATCG				
PAH-RHD $\alpha$ GN	PAH-RHD $\alpha$ GN F	GAG ATG CAT ACC ACG TKG GTT GGA	306	57	45	Cébron et al., 2008
	PAH-RHD $\alpha$ GN R	AGC TGT TGT TCG GGA AGA YWG TGC MGT T				
PAH-RHD $\alpha$ GP	PAH-RHD $\alpha$ GP F	CGG CGC CGA CAA YTT YGT NGG	292	54	45	Cébron et al., 2008
	PAH-RHD $\alpha$ GP R	GGG GAA CAC GGT GCC RTG DAT RAA				

#### II.4.1. Mise en place de l'expérience

L'impact de 7 composés différents a été testé. Chaque composé est ajouté séparément à 10g de sol dans des flacons de 250 ml. Ces flacons sont réalisés en triplicats avec pour chacun un flacon témoin sans ajout de composé. Ainsi, l'expérience compte 28 flacons.

Une contamination à 5000 mg/kg de sol est réalisée sur 1/10 du sol (contamination finale à 500 mg/kg de sol) avec les 7 composés suivants : fluorène, phénanthrène, pyrène, 2,3-dihydroxynaphtalène, 1-hydroxy-2-naphtoate, 9-fluorènone et phtalate. Pour cela, 1 g de sol sec est contaminé avec 1 ml d'une solution à 5 mg/ml de chloroforme. Pour les flacons témoins et pour ceux contaminés avec du phtalate, 1 g de sol sec est mélangé à 1 ml de chloroforme. Les sols additionnés de chloroforme sont laissés 4h sous une hotte pour permettre l'évaporation du solvant.

Dans les flacons 9 g de sol sec sont mélangés avec les 1 g de sol contaminé (traité au chloroforme). Les 10 g de sol sont humidifiés par ajout de 2 ml d'une solution Bushnell Haas Broth (Sigma-Aldrich) à 3,27 g/l stérile, hormis pour le sol contaminé au phtalate, où 5 mg de phtalate sont ajoutés aux 2 ml de Bushnell Haas Broth.

Les flacons sont fermés hermétiquement par un septum pour permettre les dosages de CO<sub>2</sub> (mesure de minéralisation). Les flacons sont incubés à 24°C à l'obscurité.

#### II.4.2. Mesure de minéralisation

Deux fois par semaine, 4 ml de l'atmosphère des flacons sont prélevés à l'aide d'une seringue et sont injectés dans un analyseur infrarouge (Binos) pour doser le taux de CO<sub>2</sub> (en ppm). Après chaque mesure les flacons sont aérés 15 min sous hotte stérile pour renouveler l'atmosphère et empêcher l'accumulation du CO<sub>2</sub>. La teneur en CO<sub>2</sub> atmosphérique est retranchée aux mesures, puis les courbes de minéralisation cumulées sont calculées au cours du temps.

Les valeurs en ppm sont converties en  $\mu\text{g}$  de  $\text{C}_{(\text{CO}_2)}$  /g sol ou en  $\mu\text{gC}_{(\text{CO}_2)}/\mu\text{gC}_{(\text{composé})}$  à l'aide des formules suivantes :

$$X_{(\mu\text{g(C)}/\text{g(sol)})} = (X_{\text{cumulé (ppm)}} \times M_{(\text{C})} \times Fd \times V_{(\text{flacon})}) / (Vm_{(\text{C})} \times m_{(\text{sol})})$$

$$X_{(\mu\text{gC(CO}_2)/\mu\text{gC(composé)})} = ((X_{\text{cumulé composé (ppm)}} - X_{\text{cumulé témoin (ppm)}}) \times Fd \times V_{(\text{flacon})} \times M_{(\text{composé})}) / (Vm_{(\text{C})} \times m_{(\text{composé})} \times nb_{(\text{composé})})$$

où  $X$  = valeur du taux de  $\text{CO}_2$ ;  $M_{(\text{C})} = 12$  g/mol (masse molaire du carbone);  $Vm_{(\text{C})} : 22,4.10^3$  l/mol (volume molaire du  $\text{CO}_2$ );  $Fd = 42,86$  (facteur de dilution du au volume de la boucle d'injection);  $V_{(\text{flacon})} = 0,315$  l (volume d'atmosphère dans le flacon);  $m_{(\text{sol})} = 10$  g;  $M_{(\text{composé})}$  : masse molaire du composé ajouté (g/mol);  $nb_{(\text{Composé})}$  = nombre d'atomes de carbone de la molécule ajoutée;  $m_{(\text{composé})} = 5 \times 10^{-3}$  g (masse de substrat ajouté).

Les courbes de minéralisation obtenues permettent de définir les temps auxquels les flacons sont arrêtés. Les temps d'incubations sont variables pour chacune des conditions car les flacons sont stoppés lorsque le substrat a été totalement minéralisé, *i.e.* lorsque la courbe de minéralisation atteint un plateau après une phase d'augmentation exponentielle. A chaque arrêt, les 3 flacons répliqués sont arrêtés ainsi qu'un flacon témoin.

### II.4.3. Analyses

A partir de 1g de sol frais des flacons, les inoculum microbiens sont préparés pour inoculer des microplaques Biolog MT2 microplates incubées pendant 4 semaines. Le reste du sol est stocké à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à utilisation pour l'extraction d'ADN.

## II.5. Expérience en présence de plante

Il s'agit de tester l'impact de la présence de plante sur les capacités métaboliques de dégradation des trois types de sols.

### II.5.1. Mise en place de l'expérience

Dans des piluliers de 30 ml percés au fond, un disque de toile à bluter de 0,5 mm de maillage est disposé au fond, puis 1 cm de sable de Fontainebleau est ajouté et 30 g des sols de Neuves-Maisons, Homécourt et Joeuf. Pour chaque sol, 6 pots sont préparés. Les sols sont ensuite humidifiés en ajoutant de l'eau distillée pour atteindre 80% de leur capacité de rétention en eau (Tableau 1). Pour chacun des sols, deux conditions avec ou sans plantes sont comparées en triplicats. A la surface du sol des conditions plantées sont ajoutées 8 graines de

Ray-Grass italien *Podium* par pot. Les pots sont placés pendant trois semaines dans un phytotron (contrôle de l'hygrométrie et de la luminosité 12 h de jour et 12 h à l'obscurité) pour permettre le développement des plantes (figure 5). L'humidité du sol est ajustée à 80% quotidiennement.

### II.5.2 Echantillonnage et analyses

Sur les pots non plantés après homogénéisation du sol, 1g de sol est prélevé pour réaliser les inocula des microplaques, Sur les pots plantés, les parties aériennes de Ray-Grass sont coupées, séchées à 60°C et pesées pour estimer leur poids sec. Les sols plantés sont placés dans des flacons contenant 10 ml de NaCl 0,85% stérile pour séparer les racines du sol. Après 3 rinçages successifs, les racines sont séchées à 60°C et pesées pour estimer leur poids sec. Le sol récupéré lors de l'étape de séparation des racines est centrifugé 5 min à 14000 rpm, le surnageant est éliminé et 1 g de sol est prélevé du culot pour réaliser l'inoculum des microplaques. Les inocula préparés ont servis à inoculer des microplaques Biolog et des microplaques Eppendorf noires.

### II.6. Analyses statistiques

Des tests t de Student (comparaison de 2 échantillons : sol additionné d'un composé vs. témoin et sol planté vs. non planté) et des ANOVA à un facteur (comparaison des 3 types de sols) ont été réalisés sur XLStat 2012 (Microsoft) pour comparer les données des microplaques (absorbance et fluorescence), les données de qPCR, les valeurs finales de minéralisation, et les biomasses végétales. Sont considérées comme significativement différentes les valeurs pour lesquelles  $p < 0,05$ .

## III. Résultats

### III.1. Expérience en flacons

Une expérience en flacons pour laquelle certains substrats ont été ajoutés au sol de Neuves-Maisons a été réalisée. L'objectif était de tester si l'ajout d'un substrat dans le sol peut



**Figure 5** : Pots plantés et non plantés avec le ray-grass après 3 semaines d'incubation en chambre phytotronique.

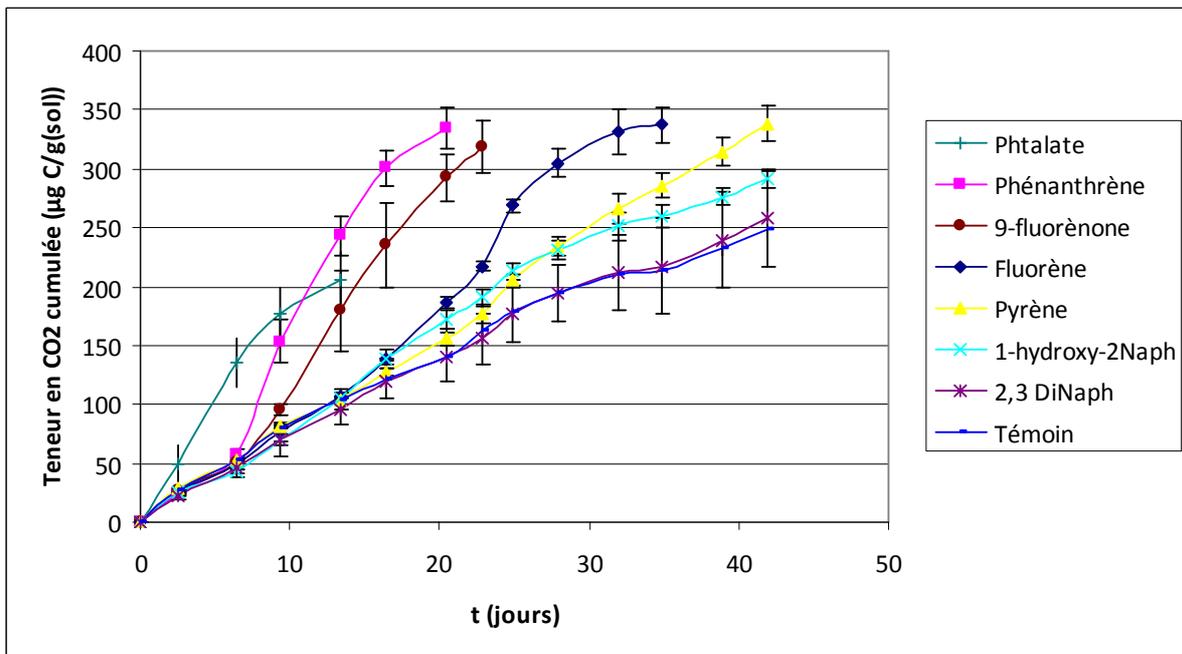
stimuler le potentiel de dégradation des communautés microbiennes indigènes vis-à-vis d'un ou de plusieurs composés testés dans la microplaque.

### III.1.1. Mesure du taux de minéralisation

Si l'on compare les vitesses de minéralisation entre les flacons contenant les re-contaminés et les flacons Témoin, la différence est due à la minéralisation du composé ajouté. Les courbes de minéralisation (Figure 6) montrent des différences de vitesse de minéralisation en fonction des composés. Ainsi les flacons sont stoppés à différents temps dès que la courbe de minéralisation ralentit. Certains composés sont très rapidement minéralisés par rapport au témoin non-recontaminé. Le phtalate est rapidement minéralisé, sa minéralisation débute dès la première semaine et 136  $\mu\text{g C/g}_{\text{sol}}$  sont libérés au bout de 6 jours. Après 13 jours, la minéralisation du phtalate atteint une phase de plateau, la quantité de  $\text{CO}_2$  libéré atteint 204  $\mu\text{g C/g}_{\text{sol}}$  (deux fois plus que le Témoin) et représente 36,4% du carbone contenu dans le phtalate et ajouté initialement dans le sol. La minéralisation du phénanthrène et du 9-fluorène débute dès 6 jours (Figure 6). Après 20 et 22 jours, respectivement 38,3% et 26,6% de carbone du phénanthrène et du 9-fluorène ont été convertis en  $\text{CO}_2$ . Lorsque la phase de plateau est atteinte pour ces composés, la quantité de  $\text{CO}_2$  libéré s'élève à plus de 300  $\mu\text{g C/g}_{\text{sol}}$ . La minéralisation du fluorène débute après 23 jours d'incubation mais le composé est rapidement minéralisé ; après 32 jours, 30% du carbone du fluorène a été minéralisé. Le pyrène et le 1-hydroxy-2-naphtoate sont lentement minéralisés mais les teneurs en  $\text{CO}_2$  dégagées sont significativement supérieures à celle du Témoin non re-contaminé. Après 39 jours, respectivement 18 et 20% du carbone du 1-hydroxy-2-naphtoate et du pyrène sont minéralisés, et environ 300  $\mu\text{g C/g}_{\text{sol}}$  ont été libérés. Le 2,3-dihydroxynaphtoate ne présente pas de différence significative de taux de minéralisation avec le Témoin. Au bout de 40 jours, seulement 2,3% du carbone du 2,3-dihydroxynaphtoate est minéralisé. Ce composé est soit non dégradé soit il est partiellement dégradé et n'est pas minéralisé en  $\text{CO}_2$ .

### III.1.2. Mesures Biolog

L'analyse des données de mesures d'absorbance dans les plaques Biolog rend compte de la diversité métabolique de dégradation des composés aromatiques par les communautés microbiennes du sol de Neuves-Maisons re-contaminé ou non (Tableau IV).



**Figure 6 :** Courbes de minéralisation représentées par les teneurs en CO<sub>2</sub> (valeurs cumulées) dans l'atmosphère des flacons où le sol de Neuves-Maisons a été re-contaminé avec divers composés ou non re-contaminé (Témoin).

Le nombre total de composés efficacement dégradés ( $Abs > 0,2$  après 3 semaines) est différents selon l'origine de l'inoculum. De plus les mesures d'absorbance montrent des différences significatives entre les sols re-contaminés et les sols Témoins pour un certains nombre de composés (Tableau IV).

Pour l'ensemble des conditions, le témoin négatif (eau) à une absorbance moyenne proche de zéro et le témoin positif (glucose) une absorbance moyenne comprise entre 0,36 et 1,38.

Après trois semaines d'incubation, les microplaques inoculées avec le sol re-contaminé avec du phtalate, du 9-fluorène et du fluorène montrent une dégradation efficace pour respectivement 5, 9 et 8 composés, alors que les inocula des sols Témoin sont capables de dégrader de 11 à 14 composés (Tableau IV). De plus, pour ces mêmes 3 conditions, les niveaux de dégradation sont significativement supérieurs ( $p < 0,05$ ) pour les sols Témoin ( $DO_{595nm}$  supérieure) que pour les sols re-contaminés.

Ainsi le sol re-contaminé au phtalate montre une  $DO_{595nm}$  inférieure à la condition Témoin pour 7 composés : fluoranthène, benzoapyrène, 1-hydroxypyrene, 1-indanone, dibenzothiophène, salicylate, et protocatéchuate (Tableau IV). Les courbes de  $\Delta DO_{595}$  (témoin – re-contaminé phtalate) en fonction du temps montrent une augmentation progressive pour les 7 composés au cours des 21 jours d'incubation, atteignant des différences entre les absorbances des témoins et des sol re-contaminés proches de 0,5 unité de DO pour le BaP, le salicylate et le protocatéchuate (Figure 7) et des valeurs plus faibles autour de 0,1 pour 1-hydroxypyrene, le dibenzithiophène, le 1-indanone et le fluoranthène.

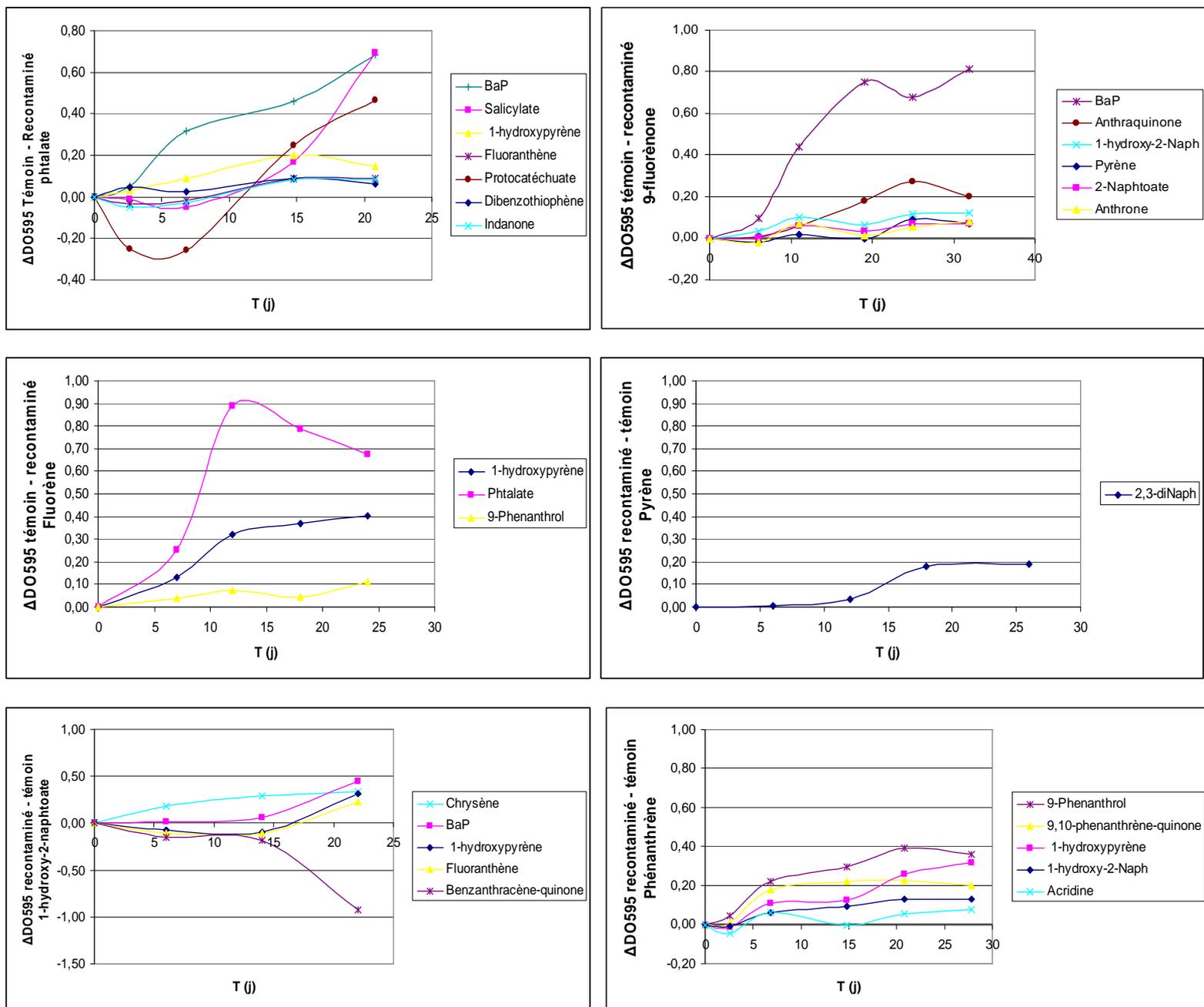
De plus, le sol re-contaminé au 9-fluorène montre une  $DO_{595nm}$  inférieure à la condition Témoin pour 6 composés : benzoapyrène (BaP), pyrène, anthrone, anthraquinone, 1-hydroxy-2-naphtoate, et 2-naphtoate (Tableau IV). Les courbes de  $\Delta DO_{595}$  (témoin – re-contaminé 9-fluorène) en fonction du temps montrent une augmentation plus ou moins forte pour les 6 composés au cours des 21 jours d'incubation (Figure 7). Pour la dégradation du BaP, la différence d'absorbance entre la condition témoin et la condition re-contaminée atteint une valeur de 0,81 unité de DO après 3 semaines d'incubation. Ces différences d'absorbance sont moins importantes pour l'anthraquinone, l'anthrone, le 1-hydroxy-2-naphtoate, le 2-naphtoate et le pyrène et atteignent des valeurs comprises entre 0,1 et 0,2 unité de DO après 3 semaines d'incubation.

Enfin, le sol re-contaminé au fluorène montre une  $DO_{595nm}$  inférieure à la condition Témoin pour 3 composés : 1-hydroxypyrene, 9-phénanthrol et phtalate (Tableau IV). Les courbes de

**Tableau IV** : Valeurs moyennes (n=2 ou 3) d'absorbance à 595 nm pour les puits des microplaques Biolog contenant les 30 composés aromatiques et inoculées avec les inocula issus des sols re-contaminés ou non. Les valeurs correspondent aux mesures obtenus après 3 semaines d'incubation des microplaques dont on a soustrait les valeurs à T0 et la valeur des puits inoculés avec de l'eau. Après transformation des valeurs, les valeurs négatives ont été remplacées par 0. Les astérisques indiquent une différence significative entre le sol re-contaminé et sol Témoin (n =3 pour chaque condition), elles sont placées au niveau de la condition ou la valeur est supérieure.

Nom substrat	Sol re-contaminé Phtalate	Sol Témoin Phtalate	Sol re-contaminé 9-Fluorènone	Sol Témoin 9-fluorènone	Sol re-contaminé Fluorène	Sol Témoin Fluorène
H2O	0,04	0,04	0,00	0,05	0,06	0,03
Pyrène	0,00	0,06	0,13	0,20*	0,06	0,01
DbA	0,26	0,39	0,00	0,00	0,37	0,34
2-Naphtoate	0,01	0,04	0,06	0,12*	0,00	0,00
Anthrone	0,18	0,03	0,06	0,14*	0,02	0,12
BenzANT-Dione	0,00	0,41	0,00	0,00	0,25	0,35
Dibenzothiophène	0,00	0,10*	0,07	0,11	0,00	0,00
Salicylate	0,21	0,90*	0,01	0,00	0,00	0,46
Fluorène	0,00	0,06	0,18	0,48	0,00	0,00
Anthracène	0,00	0,17	0,00	0,06	0,24	0,04
9-fluorènone	0,01	0,27	0,51	0,11	0,00	0,12
1-hydroxy-2-Naph	0,00	0,06	0,02	0,15*	0,02	0,01
1-hydroxypyrrène	0,00	0,27*	0,24	0,07	0,11	0,51*
Quinoline	0,00	0,00	0,30	0,32	0,00	0,17
Pyruvate	0,41	0,81	0,45	0,56	1,26	1,07
Phtalate	0,18	0,26	0,88	0,44	0,00	0,67*
PHE	0,05	0,16	0,00	0,00	0,00	0,26
BaP	0,09	0,69*	0,00	0,58*	0,42	0,13
Indanone	0,00	0,19*	0,00	0,04	0,00	0,09
9,10-phenanthrène-quinone	0,02	0,08	0,08	0,11	0,00	0,00
dibenzofuran	0,09	0,22	0,00	0,04	0,00	0,00
Acridine	0,00	0,11	0,00	0,05	0,00	0,03
Pyrocatechol	0,13	0,14	0,00	0,00	0,05	0,45
Anthraquinone	0,02	0,13	0,18	0,38*	0,09	0,08
Fluoranthène	0,00	0,17*	0,00	0,00	0,00	0,02
Chrysène	0,00	0,22	0,00	0,06	0,00	0,00
2,3-diNaph	0,17	0,63	0,68	0,37	0,10	0,44
9-Phenanthrol	0,00	0,06	0,33	0,32	0,01	0,10*
Benzanthracène-quinone	0,01	0,35	0,16	0,19	0,23	0,11
Carbazole	0,07	0,11	0,00	0,00	0,11	0,02
Protocatechuate	0,32	0,79*	2,04	1,78	0,99	1,44
Glucose	0,59	0,36	0,72	0,58	1,11	1,38
<b>Nombre total de composés dégradés (Abs &gt; 0,2)</b>	<b>5</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>11</b>

Nom substrat	Sol re-contaminé Phénanthrène	Sol Témoin Phénanthrène	Sol re-contaminé Pyrène	Sol Témoin Pyrène	Sol re-contaminé 1-hydroxy-2naphtoate	Sol Témoin 1-hydroxy-2naphtoate
H2O	0,04	0,00	0,00	0,02	0,14	0,18
Pyrène	0,28	0,05	0,00	0,00	0,34	0,31
DbA	0,18	0,08	0,14	0,19	0,00	0,00
2-Naphtoate	0,12	0,02	0,00	0,00	0,21	0,19
Anthrone	0,31	0,07	0,00	0,03	0,24	0,51
BenzANT-Dione	0,00	0,00	0,25	0,36	0,00	0,00
Dibenzothiophène	0,57	0,03	0,09	0,00	0,26	0,17
Salicylate	0,39	0,02	0,00	0,00	0,25	0,00
Fluorène	0,02	0,31	0,00	0,12	0,70	0,74
Anthracène	0,00	0,08	0,26	0,18	0,16	0,00
9-fluorènone	0,20	0,27	0,00	0,00	0,14	0,12
1-hydroxy-2-Naph	0,14*	0,01	0,00	0,00	0,21	0,21
1-hydroxypyrène	0,32*	0,00	0,02	0,02	0,48*	0,01
Quinoline	0,37	0,08	0,00	0,00	0,68	0,22
Pyruvate	0,03	0,26	1,36	0,79	1,67	1,58
Phtalate	0,38	0,00	0,05	0,00	0,19	0,31
PHE	0,52	0,08	0,00	0,00	0,16	0,02
BaP	0,06	0,20	0,65	0,51	0,67*	0,00
Indanone	0,54	0,00	0,00	0,00	0,08	0,05
9,10-phenanthrène-quinone	0,20*	0,01	0,00	0,00	0,26*	0,14
dibenzofuran	0,27	0,02	0,00	0,00	0,05	0,05
Acridine	0,08*	0,00	0,05	0,07	0,27	0,01
Pyrocatéchol	1,80	1,90	0,70	0,38	1,86	1,67
Anthraquinone	0,50	0,26	0,08	0,19	0,37	0,34
Fluoranthène	0,33	0,02	0,55	0,44	0,34*	0,05
Chrysène	0,33	0,13	0,25	0,79	0,50*	0,00
2,3-diNaph	0,76	0,39	0,58*	0,39	0,63	0,43
9-Phenanthrol	0,41*	0,04	0,00	0,00	0,66	0,27
Benzanthracène-quinone	0,25	0,29	0,14	0,14	0,00	0,78*
Carbazole	0,36	0,03	0,00	0,47	0,49	0,39
Protocatéchuete	0,00	0,00	0,92	0,72	0,05	0,06
Glucose	0,72	0,42	1,22	1,27	0,53	0,71
<b>Nombre total de composés dégradés (Abs &gt; 0,2)</b>	<b>21</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>21</b>	<b>14</b>



**Figure 7 :** Mesure moyenne (n=2 ou 3) de la différence de  $DO_{595nm}$  des puits des microplaques Biolog entre les conditions sol re-contaminé et sol Témoin (pour les conditions re-contaminées avec le pyrène, le 1-hydroxy-2-naphtoate et le phénanthrène) ou l'inverse (pour les conditions re-contaminées avec le 9 fluorène, le fluorène et le phtalate) pour les puits contenant les composés dont une différence significative à été observée entre ces deux conditions (cf. Tableau V). Les mesures ont été réalisées une fois par semaine pendant les 3 semaines d'incubation. BaP = Benzopyrène ; 1-hydroxy-2-naph = 1-hydroxy-2-naphtoate ; 2,3-diNaph = 2,3-dihydroxynaphtalène.

$\Delta DO_{595}$  (témoin – re-contaminé fluorène) en fonction du temps montrent une augmentation progressive pour les 3 composés au cours des 21 jours d'incubation (Figure 7). Pour la dégradation du phtalate et du 1-hydroxypyrene les différences d'absorbance entre la condition témoin et la condition re-contaminée atteignent respectivement des maximum de 0,90 et 0,40 unité de DO après 12 jours et 3 semaines d'incubation, alors que cette différence est moins marquée (0,20 unité de DO) pour la dégradation du 9-phénanthrol après 3 semaines.

Après trois semaines d'incubation, les microplaques inoculées avec le sol re-contaminé avec du phénanthrène, et du 1-hydroxy-2-naphtoate montrent une dégradation efficace pour chacun 21 composés, alors que les inocula des sols Témoin sont capables de dégrader de 9 et 14 composés (Tableau IV). De plus, pour ces mêmes conditions, les niveaux de dégradation sont significativement supérieurs ( $p < 0,05$ ) pour les sols re-contaminés ( $DO_{595nm}$  supérieure) que pour les sols Témoins.

Ainsi le sol re-contaminé au phénanthrène montre une  $DO_{595nm}$  supérieure à la condition Témoin pour 5 composés : le 1-hydroxy-2-naphtoate, le 1-hydroxypyrene, la 9,10-phénanthrène quinone, l'acridine et le 9-phénanthrol (Tableau IV). Les courbes de  $\Delta DO_{595}$  (re-contaminé phénanthrène - Témoin) en fonction du temps montrent une faible augmentation (0,1 unité de DO) pour l'acridine et le 1-hydroxy-2-naphtoate, cette augmentation est légèrement plus importante (0,2 unité de DO) pour la 9,10-phénanthrène quinone et atteint 0,3 unité de DO pour le 9 phénanthrol et le 1-hydroxypyrene après 3 semaines d'incubation (Figure 7).

De plus, le sol re-contaminé au 1-hydroxy-2-naphtoate montre une  $DO_{595nm}$  supérieure à la condition Témoin pour 4 composés : le BaP, le fluoranthène, le chrysène et le 1-hydroxypyrene (Tableau IV). Les courbes de  $\Delta DO_{595}$  (re-contaminé 1-hydroxy-2-naphtoate - Témoin) en fonction du temps montrent des augmentations plus ou moins rapides pour atteindre des valeurs de 0,2 à 0,5 unités de DO après 3 semaines d'incubation. Seul 1 composé (benzanthracène-quinone) est plus efficacement dégradé dans la condition Témoin. Pour ce composé, le  $\Delta DO_{595}$  recontaminé 1-hydroxy-2-naphtoate – Témoin diminue et atteint une valeur absolue de 0,92 unité de DO au bout des 3 semaines d'incubation (Figure 7).

Après 3 semaines d'incubation, les microplaques inoculées avec le sol re-contaminé avec du pyrene montrent une dégradation efficace pour 10 composés, et cette dégradation est presque similaire à celle du Témoin (Tableau IV). Ainsi, le sol re-contaminé au pyrene montre une  $DO_{595nm}$  supérieure à la condition Témoin uniquement pour 1 seul composé : le 2,3-

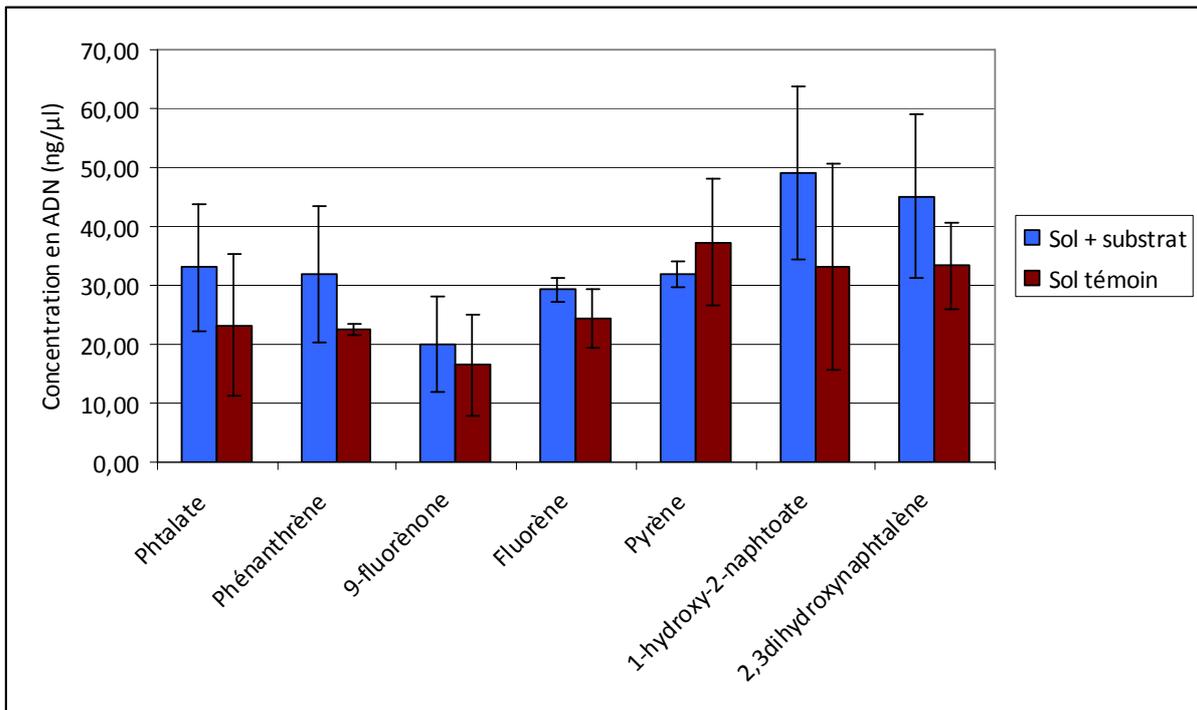
dihydroxynaphtalène. La courbe de  $\Delta DO_{595}$  (re-contaminé pyrène - Témoin) en fonction du temps montre une augmentation de 0,2 unité de DO après 3 semaines d'incubation (Figure 7).

### III.1.3. Quantification des gènes codant les ARNr 16S, 18S et les HAP-dioxygénases

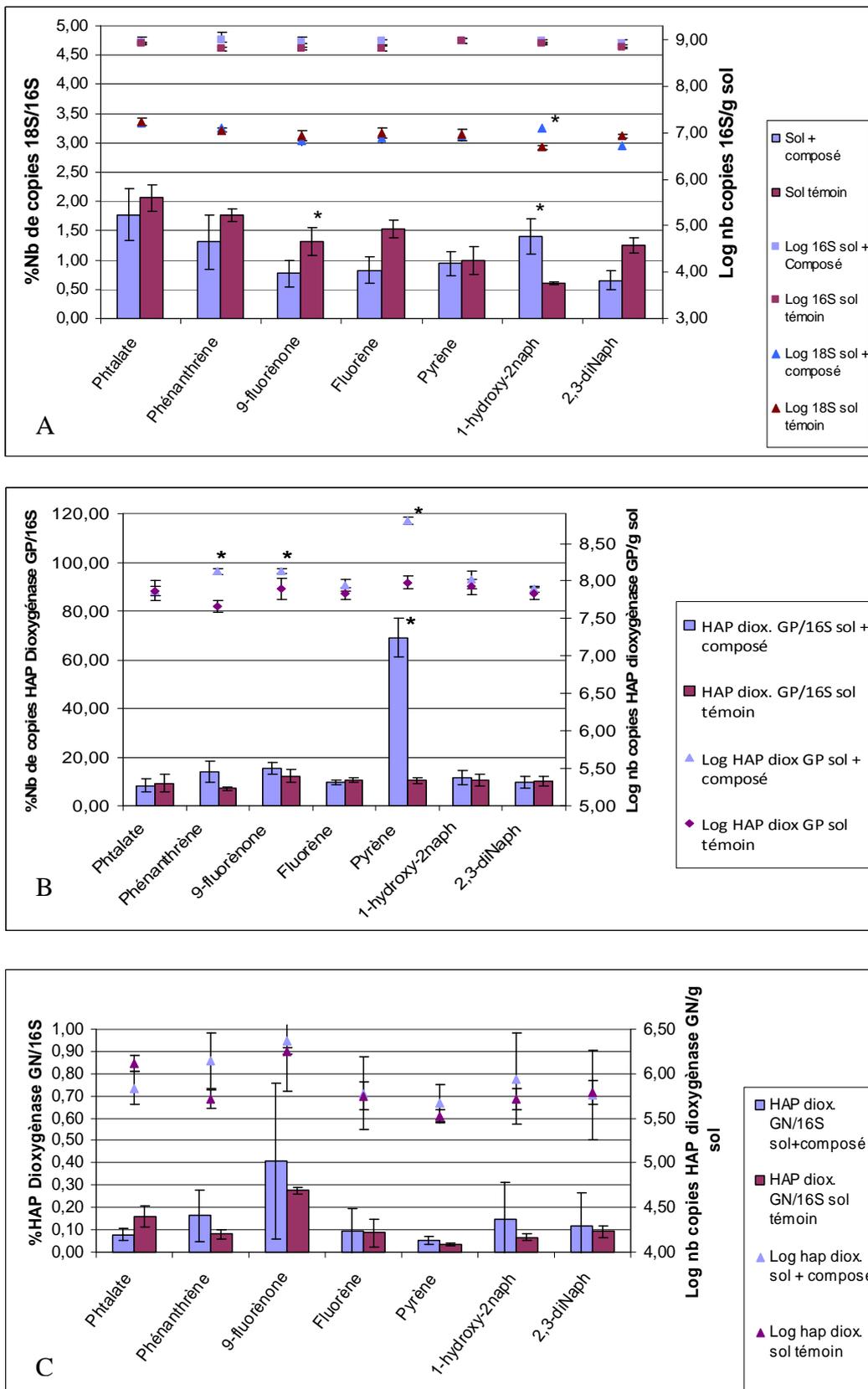
Pour l'ensemble des flacons, les ADN génomiques ont été extraits afin de quantifier en qPCR les communautés bactériennes (ADNr 16S) et fongiques (ADNr 18S) et les populations capables de dégrader les HAPs et possédant un gène codant une HAP-dioxygénase.

Les concentrations d'ADN extraits des sols re-contaminés et des sols témoin ne présentent pas de différence significative pour l'ensemble des conditions (figure 8). Le nombre de copies de l'ADNr 16S ne présente pas de différence significative entre les sols re-contaminés et leur témoin pour chacun des composés, sa valeur est proche de  $10^9$  dans chacune des conditions testées (figure 9A). Le nombre de copies de l'ADNr 18S ne présente pas de différence significative entre les sols re-contaminés et leur témoin pour chacun des composés, sa valeur est proche de  $10^7$  dans chacune des conditions testées (figure 9A). Toutefois le nombre de copies de l'ADNr 18S est significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) dans la condition re-contaminée avec du 1-hydroxy-2-naphtoate par rapport au témoin. De même, le pourcentage du nombre de copies d'ADNr 18S par rapport au nombre de copies d'ADNr 16S montre une valeur significativement supérieure d'un facteur 2 dans le sol re-contaminé avec du 1-hydroxy-2-naphtoate par rapport à son témoin et montre également une valeur significativement supérieure pour la condition témoin par rapport au sol re-contaminé avec du 9-fluorène.

Le nombre de copies de gènes codant les HAP-dioxygénases des bactéries à Gram positif (GP) est significativement plus important ( $p < 0,05$ ) dans les sols re-contaminés avec du phénanthrène, du 9-fluorène et du pyrène que dans leur témoin. De même, le pourcentage du nombre de copies de gènes codant les HAP-dioxygénases GP par rapport au nombre de copies d'ADNr 16S est presque 7 fois supérieur dans le sol re-contaminé avec du pyrène (69%) que dans son témoin (10%) et que dans toutes les autres conditions (autour de 10%) (figure 9B). En revanche, les autres composés ne modifient pas significativement le pourcentage de copies de gènes codant les HAP-dioxygénases GP.



**Figure 8** : Concentration en ADN des sols re-contaminés et des sols témoins. La concentration est estimée par mesures des absorbances à 260nm et leur pureté grâce au ratio 260nm/280nm.



**Figure 9 :** Comparaison du nombre de copies des gènes (en Log) codant les ARNr 16S et ARNr 18S (A), les HAP-dioxygénases des bactéries à Gram négatif (GN) (B) et des bactéries à Gram positif (GP) (C) ainsi que les ratios de ces gènes rapportés au nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S, dans les sols re-contaminés et les sols témoins. Les astérisques indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les sols re-contaminés et leur témoin. 1-hydroxy-2-naph : 1hydroxy-2-naphtoate ; 2,3 diNaph : 2,3-dihydroxynaphtalène.

Le nombre de copies de gènes codant les HAP dioxygénases des bactéries à Gram négatif (GN) n'est pas significativement différent entre les sols re-contaminés et leurs témoins pour chacun des composés testés. De même, le pourcentage du nombre de copies de gènes codant les HAP dioxygénases GN par rapport au nombre de copies d'ADNr 16S ne montre pas de différence significative entre les sols re-contaminés et leurs témoins (figure 9C).

## **III.2. Expérience en présence de plantes**

### **III.2.1. Biomasse végétale**

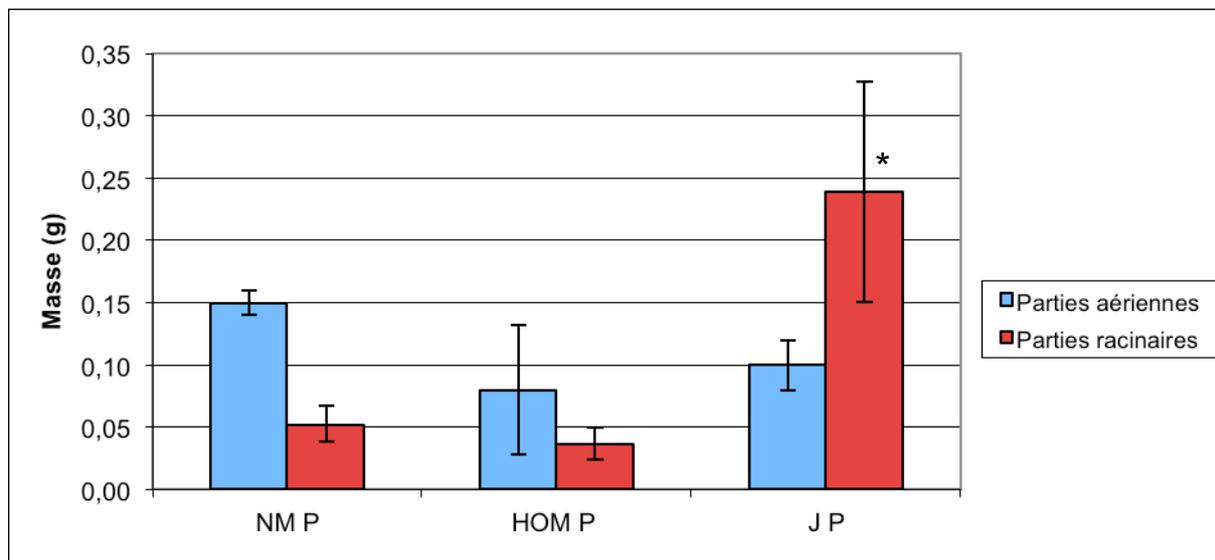
A l'issue des 3 semaines de culture en phytotron, les pots ont été arrêtés. Pour comparer les trois types de sols, nous avons récoltés les parties aériennes et racinaires des pots plantés avec le Ray-Grass pour en estimer les masses sèches. Les masses sèches des parties aériennes du Ray-Grass ne présentent pas de différence significative entre les trois sols. En revanche la masse sèche des parties racinaires du Ray-Grass cultivé sur le sol de Joeuf est significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) d'un facteur proche de 5 par rapport aux sols de Neuves-Maisons et de Homécourt (Figure 10).

### **III.2.2. Mesures en absorbance**

A l'issue des 3 semaines de culture, des échantillons des 3 sols plantés et non plantés ont servi à la préparation des inocula pour ensemercer les microplaques Biolog et tester le potentiel métabolique de dégradation des composés aromatiques des diverses conditions.

La comparaison de la valeur moyenne ( $n=3$ ) de l'absorbance à 595 nm après 21 jours d'incubation des microplaques Biolog inoculées avec les extraits microbiens des sols entre la condition plantée et non plantée montre pour le sol de Neuves-Maisons une dégradation moyenne plus importante du fluorène et de la 1-indanone pour les inocula des sols non plantés et une dégradation moyenne plus importante du glucose pour les inocula des sols plantés (Tableau V).

Pour le sol de Homécourt une dégradation moyenne plus importante du pyrène, du salicylate (très importante, supérieure d'un facteur 140), du 9-fluorène et du 1-hydroxy-2-naphtoate est observée pour les inocula des sols plantés, alors que pour l'anthracène, le phtalate,



**Figure 10** : Masses sèches des parties aériennes et racinaires du ray-grass issus des sols en condition plantée. Les valeurs significativement différentes entre les trois sols sont matérialisées par un astérisque. NM : sol de Neuves-Maisons ; HOM : sol de Homécourt, J : sol de Joeuf ; P : sol en condition plantée.

l'anthraquinone, la benzanthracène-quinone, le carbazole et le glucose la dégradation moyenne est significativement supérieure pour les inocula des sols non planté. Pour le sol de Joeuf une dégradation moyenne plus importante du pyruvate, 1-hydroxy-2-naphtoate, de la 1-indanone l'acridine et le chrysène est observée pour les inocula des sols plantés.

La comparaison des mesures moyennes d'absorbance entre les 3 sols montre que les inocula des sols de Homécourt et de Joeuf ont une absorbance supérieure à celui de Neuves-Maisons pour le puits contenant du dibenzothiophène. Le puits contenant du pyruvate a une absorbance supérieure pour le sol de Homécourt, ayant lui-même une absorbance supérieure au sol de Joeuf. Le sol de Homécourt montre également une absorbance plus importante que les sols de Neuves maisons et de Joeuf pour le puits contenant du phtalate, avec une valeur d'absorbance importante pour le sol non planté (1,84).

Le sol de Neuves-Maisons montre une valeur d'absorbance plus importante pour le puits contenant le composé phénanthrène que pour les deux autres sols, la valeur atteignant 0,64 unités de DO dans le sol planté. Le sol de Joeuf présente une absorbance plus importante dans le puits contenant du glucose que les deux autres sols.

### III.2. 3. Mesures en fluorescence

#### Mise au point

Des spectres d'émission et d'excitation ont été réalisés pour chacun des composés (Annexe 2). Les pics d'excitation et d'émission obtenus à partir des spectres permettent de définir les paramètres de détection pour 9 composés qui ont ensuite été testés en microplaques (Tableau VI). Ainsi, ont été définis les couples de longueurs d'onde excitation/émission pour lesquels le composé présente une intensité de fluorescence significative, et les paramètres de réglage du spectrophotomètre (bandes passantes et PM) ont été optimisés.

#### Mesures sur les inocula de sol

Le potentiel de dégradation de 9 composés a également été testé par détection en fluorescence grâce à l'utilisation de microplaques noires. Ces composés étant fluorescents, s'ils sont

**Tableau V** : Mesure moyenne (n=3) de l'absorbance à 595 nm des microplaques Biolog inoculées avec les inocula des différents sols en condition plantée et non plantée après 3 semaines d'incubation. La valeur d'absorbance à T=0 ainsi que les valeurs d'absorbance des puits de la microplaque inoculée avec de l'eau aux temps correspondant ont été retranchées. Les valeurs des puits significativement différentes ( $p < 0,05$ ) entre la condition sol planté et sol non planté sont indiquées par des astérisques placés au niveau de la valeur supérieure. Les composés dont l'absorbance est significativement différentes entre les trois sols ont été discriminés par groupes statistiques (lettre majuscules). NM : sol de Neuves-Maisons ; HOM : sol de Homécourt, J : sol de Joeuf ; P : sol en condition plantée ; NP : sol en condition non plantée. DbA : dibenzo(a,h)anthracène, BenzANT-Dione : Benzanthracène-7,12-dione ; 1-hydroxy-2-naph : 1-hydroxy-2-naphtoate ; BaP : benzoapyrène ; 9,10-pheONE : 9,10-phenanthrène-quinone ; 2,3-diNaph : 2,3-dihydroxynaphtalène.

Nom substrat	NM P	NM NP	NM	HOM P	HOM NP	HOM	J P	J NP	J
H2O	0,04	0,05		0,08	0,01		0,11	0,11	
Pyrène	0,01	0,02		0,11*	0		0,13	0,01	
DbA	0	0		0,25	0,07		0	0,03	
2-Naphtoate	0	0,02		0,08*	0,01		0,03	0,01	
Anthrone	0	0		0	0		0,05	0,01	
BenzANT-Dione	0	0		0	0,08		0,07	0,21	
Dibenzothiophène	0,04	0,08	<b>B</b>	0,31	0,30	<b>A</b>	0,22	0,42	<b>A</b>
Salicylate	0,07	0,03		0,71*	0,05		0,03	0,02	
Fluorène	0,07	0,14*		0,12	0,04		0,08	0,16	
Anthracène	0	0		0,01	0,15*		0,11	0,12	
9-fluorènone	0,15	0,20		0,12*	0		0,07	0	
1-hydroxy-2-naphtoate	0,03	0,08		0,20*	0,07		0,08*	0,01	
1-hydroxypyrene	0,17	0,17		0,10	0,21		0,17	0,16	
Quinoline	0,13	0,04		0,15	0,06		0,06	0,03	
Pyruvate	0,74	0,50	<b>AB</b>	1,13	0,78	<b>A</b>	0,47*	0,06	<b>B</b>
Phtalate	0,11	0,22	<b>B</b>	0,83	1,84*	<b>A</b>	0,11	0,09	<b>B</b>
Fluoranthène	0	0		0	0		0,05	0,07	
BaP	0	0		0	0,14		0,16	0	
1-Indanone	0,03	0,10*		0,06*	0		0,11*	0	
9,10-phenanthrène-quinone	0	0,02		0	0,16		0,04	0	
Dibenzofuran	0,04	0,08		0,06	0,20		0,20	0,10	
Acridine	0,03	0,08		0,14	0,05		0,13*	0	
Pyrocatechol	0	0		0	0		0	0	
Anthraquinone	0,06	0,07		0	0,10*		0,05	0,01	
Phénanthrène	0,64	0,40	<b>A</b>	0,09	0,01	<b>B</b>	0,02	0,25	<b>AB</b>
Chrysène	0,09	0,07		0,13	0,14		0,33*	0,08	
2,3-diNaph	0	0,03		0	0		0	0	
9-Phenanthrol	0,02	0,04		0,08	0,07		0	0	
Benzanthracène-quinone	0,01	0		0,04	0,37*		0,12	0,07	
Carbazole	0	0,01		0	0,27*		0,07	0,01	
Protocatechuate	0,97	1,09		1,06	1,21		1,30	1,05	
Glucose	1,08*	0,86	<b>B</b>	1,32	1,89*	<b>B</b>	1,72	1,84	<b>A</b>
<b>Nombre total de composés dégradés Abs &gt; 0,2</b>	4	6		8	9		6	5	

dégradés au cours de l'incubation en microplaques, l'intensité de fluorescence mesurée devrait théoriquement diminuer (Tableau VII).

La fluorescence diminue de façon importante dans les puits contenant du phénanthrène et inoculés avec l'inoculum du sol de Neuves-Maisons en condition plantée et non plantée. La valeur d'intensité de fluorescence du sol de Neuves-Maisons pour le puits phénanthrène est significativement différente ( $p < 0,05$ ) de celles des sols de Homécourt et de Joeuf.

La fluorescence du fluorène, du 1-hydroxy-2-naphtoate et du catéchol diminue pour les 3 inocula de sols dans toutes les conditions.

Les intensités de fluorescence des puits contenant de l'anthracène ou du fluoranthène ne diminuent pas voire augmentent dans presque toutes les conditions.

#### III.2. 4. Relation absorbance/fluorescence pour les puits « phénanthrène »

La forte augmentation d'absorbance et la forte diminution de fluorescence observées dans les puits contenant du phénanthrène inoculées avec les sols de Neuves-Maisons planté et non planté suggèrent une relation entre ces deux mesures, rendant compte du potentiel de biodégradation du phénanthrène. Ainsi la diminution de fluorescence mesurée dans les microplaques noires est proportionnelle à l'augmentation de l'absorbance mesurée dans les microplaques Biolog pour les inocula du sol de Neuves-Maisons (figure 11A). Les courbes de tendance montrent un  $R^2$  relativement élevé (0,79) pour les sols de Neuves-Maisons planté et non planté confondus (figure 11B).

### **IV. Discussion**

L'utilisation de microplaque Biolog MT2® pour étudier le profil métabolique de dégradation de composés aromatiques par les microorganismes du sol est très peu décrite dans la littérature.

Les expériences réalisées au cours de cette étude sont des expériences de mise au point dont l'objectif était de valider l'utilisation de la microplaque Biolog MT2® chargée en composés aromatiques pour caractériser le profil de dégradation de communautés microbiennes vis-à-vis de ces composés dans divers sols.

#### **IV.1. Biais méthodologiques et limites de la méthode**

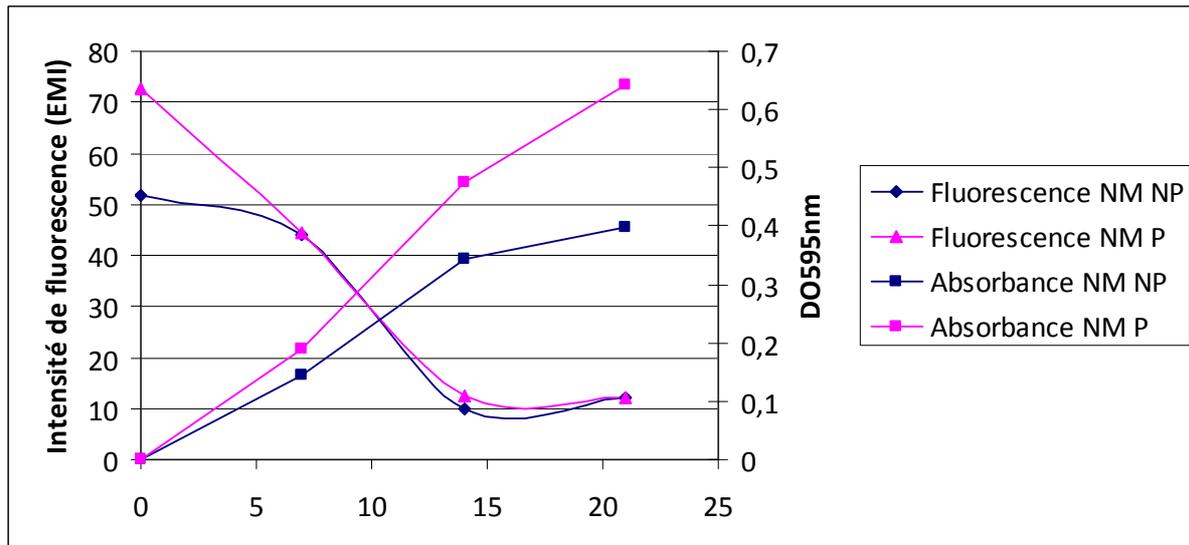
**Tableau VI :** Longueurs d'onde d'excitation et d'émission et paramètres du spectrophotomètre établis à partir des spectres de fluorescence réalisés en Uvettes définis pour la détection de composés. PM : photomultiplicateur.

	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	Bande passante excitation	Bande passante émission	PM (Volts)
Fluorène	290	320	10	10	450
Fluoranthène	380	462	15	15	600
Phénanthrène	340	366	10	10	550
Pyrène	340	385	15	15	400
Anthracène	300	420	15	15	400
Catéchol	322	345	15	15	450
1-hydroxy-2-naphtoate	340	415	15	15	450
2,3-dihydroxynaphtalène	320	340	15	15	350
9-fluorènone	322	363	15	15	650

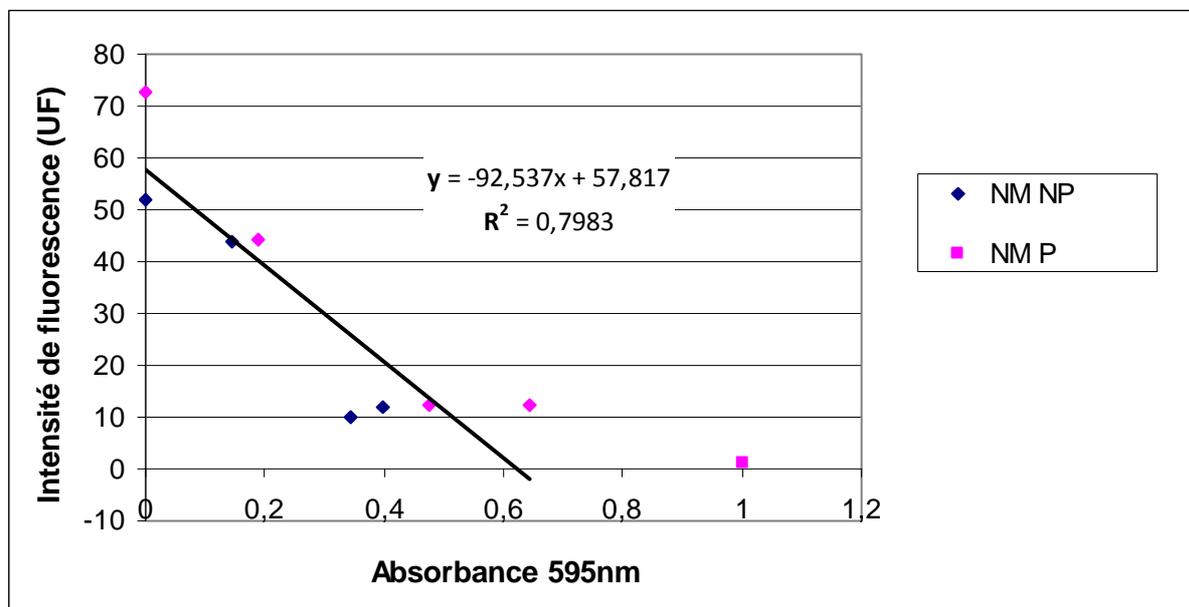
**Tableau VII :** Mesure de l'intensité de fluorescence (en Unité arbitraire de fluorescence) après 21 jours d'incubation des puits contenant des composés inoculés avec les sols. Les mesures de fluorescence ont été effectuées en utilisant les couples d'excitation/émission précédemment décrits. L'intensité de fluorescence à T=0 ainsi que l'intensité de fluorescence correspondante au bruit de fond de la microplaque ont été retranchées. Les valeurs significativement différentes ( $p < 0,05$ ) entre les sols ont été indiquées par un astérisque. NM : sol de Neuves-Maisons ; HOM : sol de Homécourt, J : sol de Joeuf ; P : sol en condition plantée ; NP : sol en condition non plantée.

Composés utilisés	NM P	NM NP	HOM P	HOM NP	J P	J NP
Fluorène	-20,08	-25,73	-18,61	-16,93	-11,25	-11,66
Phénanthrène	-62,19*	-41,94*	-15,46	1,99	2,75	-5,43
Fluoranthène	7,11	6,24	1,17	-1,53	9,78	6,76
Pyrène	-1,64	-1,93	-1,46	-2,67	-3,14	0,57
Anthracène	-0,118	1,10	2,54	2,99	2,92	13,42*
Catéchol	-6,90	-4,55	-2,72	-6,17	-6,04	-8,40
1-hydroxy-2-naphtoate	-19,35	-23,13	-22,87	-19,62	-25,33	-23,04
2,3-dihydroxynaphtalène	-1,34	-4,77	-1,65	-3,37	-6,61	2,50

A



B



**Figure 11** : Comparaison de l'évolution de l'absorbance et de la fluorescence (A) et courbe de régression linéaire entre l'absorbance et la fluorescence (B) des puits phénanthrène inoculés avec les sols de Neuves-Maisons plantés et non plantés pendant 21 jours d'incubation des microplaques à 24°C. L'équation de la droite de tendance de la courbe de régression ainsi que le coefficient de détermination ( $R^2$ ) est indiqués sur la figure (B). NM : sol de Neuves-Maisons ; HOM : sol de Homécourt, J : sol de Joeuf ; P : sol en condition plantée ; NP : sol en condition non plantée.

Au cours de la mise au point méthodologique de la technique, plusieurs biais expérimentaux ont été rencontrés. Au cours de la cinétique certains puits témoins négatifs (contenant de l'eau et aucun composé carboné), inoculés avec les inocula de sol se sont colorés et ont montré des absorbance à 595 nm supérieures à 0,2 unités de DO, probablement parce que une/des source(s) de carbone ont été apportées dans l'inoculum de sol malgré des dilutions au 1/10 ou au 1/100 des suspensions de sol. Certains composés ont présenté une absorbance à 595 nm négative, ce qui indique que ces composés ont une absorbance inférieure au puits utilisé comme témoin négatif (puits contenant de l'eau) où le blanc (zéro) du spectrophotomètre est réalisé. Un certain nombre de composés (DbA, Benzantracène-7,12-dione, pyrocatechol), se colorent au cours du temps même dans les puits inoculés avec de l'eau stérile. Ces composés se transforment au contact de l'air (oxydation abiotique) en composés colorés qui présentent des absorbances à 595 supérieures à 0,2 et jusqu'à 1 (pyrocatechol) après 3 semaines d'incubation. Ces niveaux élevés d'absorbance qui évoluent au cours de l'incubation, rendent difficilement perceptible le changement d'absorbance du à l'oxydation du tétrazolium violet. Enfin, des problèmes de variabilité ont également été constatés, les mesures d'absorbance à 595 nm pouvant être très variable entre les triplicats biologiques d'une même condition. Les mesures en fluorescence ont également montré des biais. D'abord, certains composés aromatiques présentent une faible fluorescence et sont difficilement détectables. De plus, de nombreux composés dont le couple de longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été définis en cuves Uvettes montrent une fluorescence très faible et sont difficilement détectés en utilisant ces longueurs d'ondes dans les microplaques. D'autre part, de nombreux composés détectés en fluorescence lorsqu'ils sont inoculés avec de l'eau stérile montrent une fluorescence plus faible à T=0 lorsqu'ils sont inoculés avec un inoculum microbien, rendant plus difficile l'évaluation de la diminution de fluorescence.

## **IV.2. Impact d'une re-contamination sur le profil métabolique de dégradation de composés aromatiques**

### **IV.2.1. Faible impact de la re-contamination sur la communauté bactérienne**

Des études ont montré qu'une pré-exposition des communautés microbiennes de sol à des hydrocarbures pouvait augmenter l'efficacité de la dégradation de ces composés par les microorganismes (Spain and VanVeld, 1983, Aeolin et al., 1989). Ainsi, dans un environnement non contaminé, une pollution induit une modification et l'adaptation de la communauté microbienne. En revanche, dans les sols de friches industrielles pollués depuis plusieurs décennies les communautés microbiennes sont déjà adaptées aux polluants, ainsi les modifications de la communauté microbienne devraient être moins marquées à la suite d'une pollution fraîche.

Six composés sur les 7 testés ont été minéralisés. Des microorganismes capables de dégrader le phtalate, le phénanthrène, le 9-fluorène, le fluorène, le pyrène et le 1-hydroxy-2-naphtoate seraient donc présents au sein de la communauté microbienne du sol de Neuves-Maisons et l'ajout de concentrations importantes de ces composés dans le sol stimulerait l'activité de ces populations et donc augmenterait la dégradation de la communauté vis-à-vis de ces composés. Cependant, lorsque l'on compare le potentiel de dégradation de ces composés entre les sols re-contaminés et les sols témoins dans les microplaques Biolog, aucune différence significative n'est observée. La densité et/ou diversité des populations fonctionnelles impliquées dans la dégradation des composés ajoutés aux sols n'a sans doute pas changé, en revanche son activité a été accrue par l'apport du composé servant de substrat. De plus, les concentrations en ADN extrait de ces sols et les quantifications du nombre de copies d'ADNr 16S ne sont pas significativement différentes entre les sols re-contaminés et les sols témoins. Ceci suggérerait donc également que l'ajout d'un composé ne modifie pas l'abondance bactérienne dans le sol.

La quantification des gènes codant les HAP-dioxygénases des bactéries à Gram négatif n'est pas modifiée par l'ajout d'un composé aromatique dans le sol. Les bactéries à Gram négatif ont été décrites comme principalement impliquées dans la dégradation des HAPs de bas poids moléculaire tels que le fluorène, le fluoranthène et le phénanthrène (Peng *et al.* 2008) et plusieurs espèces notamment de *Pseudomonas* (Janbandhu et Fulekar, 2011) et *Sphingomonas* (Xia et al., 2005) ont été décrites comme dégradant le phénanthrène. De plus Martin *et al.*, (2011) montrent un changement des communautés microbiennes aboutissant à la dominance des  $\beta$ -protéobactéries dans un sol lors d'une contamination au phénanthrène. Toutefois, Cébron et al. (2011) ont montré que dans certaines conditions, les bactéries à Gram positif pouvaient être impliquées dans la dégradation de phénanthrène dans le sol de Neuves-Maisons. Ainsi, l'absence de changement de l'abondance du nombre de copies de gènes codant les HAP dioxygénases des bactéries à Gram négatif lors de l'ajout d'un composé

aromatique peut s'expliquer par le fait que les bactéries du sol de Neuves-Maisons sont déjà adaptées à la présence des polluants aromatiques du fait de l'ancienneté de la contamination du sol et que leur densité est suffisante pour dégrader efficacement les composés apportés, ou par le fait qu'elles ne sont pas directement impliquées dans la dégradation de ces composés.

#### IV.2.2. Une minéralisation rapide et une diminution de la diversité métabolique : cas du phtalate, du fluorène et du 9-fluorène

L'évolution du taux de minéralisation des sols re-contaminés en phtalate, 9-fluorène et fluorène montre une minéralisation rapide de ces composés. Les quantités de CO<sub>2</sub> libérées lorsque la minéralisation atteint une phase de pallier est plus importante pour le sol amendé en composés 9-fluorène et fluorène. La minéralisation du fluorène et du 9-fluorène libèrerait d'avantage de CO<sub>2</sub> que celle du phtalate, ce qui semble cohérent au vu de la structure de ces composés (2 cycles benzénique et 1 cycle à 5 carbones) et de la place de ces composés dans les voies de dégradation. En effet, le phtalate étant un métabolite intermédiaire ne comportant qu'un seul cycle benzénique, il libère forcément moins de CO<sub>2</sub> au cours de sa dégradation complète. De plus, le phtalate est le composé le plus rapidement dégradé au cours des incubations en flacons. La communauté microbienne du sol multi-contaminé de Neuves-Maisons semble bien adaptée à ce composé qui est un intermédiaire dans un grand nombre de voies métaboliques de dégradation de composés aromatiques. Le 9-fluorène est un métabolite formé suite à la dégradation du fluorène (Monna et al., 1993), il est plus rapidement minéralisé que son précurseur ce qui indique qu'il serait plus facilement dégradable par les microorganismes du sol. Le fluorène est également minéralisé mais plus tardivement à partir de 22 jours d'incubation, probablement après croissance et/ou activation de la population spécialisée dans sa dégradation. La minéralisation du fluorène dans les sols pollués au HAPs à déjà été mise en évidence (Grifoll *et al.*, 1995). En outre, aucune différence significative de dégradation du phtalate, du fluorène et du 9-fluorène n'est observée en plaque Biolog lorsque l'on compare les inocula adaptés aux composés provenant des sols re-contaminés par rapport aux inocula des sols témoin. Ainsi l'ajout de ces composés dans les sols n'a pas accru la densité de la population impliquée dans leur dégradation.

L'ajout des composés phtalate, fluorène et 9-fluorène au sol semble entraîner une diminution du profil de dégradation de la communauté microbienne du sol de Neuves-

Maisons. Bien que ces 3 composés aient été efficacement dégradés dans le sol (minéralisation), ces résultats suggèreraient un effet de toxicité de ces composés ou de leurs dérivés notamment sur les populations microbiennes impliquées dans la dégradation des composés aromatiques. Ce phénomène de toxicité induirait un déclin de tout ou partie des microorganismes impliqués dans la dégradation de composés aromatiques. En effet, la toxicité du fluorène a déjà été étudiée sur les microorganismes du sol (Sverdrup *et al.*, 2002), cependant rien n'est documenté quant à la toxicité du phtalate ou du 9-fluorènone vis-à-vis des microorganismes des sols. Une autre hypothèse qui expliquerait la diminution du potentiel de dégradation de différents composés dans le cas d'une re-contamination du sol serait un effet d'inhibition de certains composés ou de leurs produits de dégradation sur d'autres voies métaboliques de dégradation des microorganismes dans le sol. Le phtalate est un métabolite final de dégradation commun à la plupart des voies de dégradation des HAPs et le 9-fluorènone un métabolite s'accumulant (« dead end ») lors de la dégradation du fluorène (Casellas *et al.*, 1997). La forte concentration de ces composés dans le sol pourrait inhiber certaines voies métaboliques, réduisant alors l'activité de ces microorganismes et par voie de conséquence leur représentativité dans la communauté. Casellas *et al.* (1998) ont mis en évidence un phénomène allant dans ce sens en montrant que l'addition de 9-fluorènone dans des cultures bactériennes capables de dégrader le fluorène inhibait la dégradation du fluorène. D'après nos résultats, le 9-fluorènone dans le sol inhiberait le potentiel métabolique de dégradation des communautés microbiennes vis-à-vis de 3 HAP (fluoranthène, anthracène, et benzoapyrène) et de 3 métabolites (1-hydroxy-2-naphtoate, pyrocatechol et acide-2-naphtoïque). Par ailleurs, l'addition de 9-fluorènone induit une diminution du ratio champignon/bactéries par rapport au sol témoin. Cette diminution est due à une légère augmentation du nombre de copies d'ADNr 18S alors que le nombre de copie d'ADNr 16S diminue. Sepic *et al.* (2003) mettent en évidence la toxicité de ce composé sur différents indicateurs écotoxicologiques eucaryotes mais aucune toxicité n'est constatée sur les procaryotes, la modification des communautés ne serait pas due à la toxicité du composé.

#### IV.2.3. Une minéralisation rapide et une augmentation de la diversité métabolique : cas du Phénanthrène

La minéralisation du phénanthrène est très rapide par rapport aux autres HAP testés (fluorène et pyrène). D'autres études ont montré une minéralisation rapide du phénanthrène dans des sols pollués aux HAPs (Efroymsen et Alexander, 1994 ; Cébron et al. 2011). De plus Lee *et*

*al.*, (2003) montrent que la re-contamination d'un sol à 25 mg kg<sup>-1</sup> accélérerait sa vitesse de minéralisation et Aeolin *et al.* (1989) ont montré que l'augmentation de la concentration en phénanthrène dans un aquifère stimulait sa dégradation.

La re-contamination au phénanthrène augmente le potentiel de dégradation des communautés microbiennes pour le 1-hydroxy-2-naphtoate, le 1-hydroxypyrene, la 9,10-phénanthrène-quinone, l'acridine et le 9-phénanthrol. Le 9-phénanthrol, le 1-hydroxy-2-naphtoate et la 9,10-phénanthrène-quinone sont des composés intermédiaires de la voie de dégradation du phénanthrène, l'ajout de phénanthrène au sol peut activer et/ou sélectionner les microorganismes possédant les voies métaboliques de dégradation de ces composés.

#### IV.2.4. Une minéralisation faible et une augmentation de la diversité métabolique : cas du Pyrène et du 1-hydroxy-2-naphtoate

Le pyrène et le 1-hydroxy-2-naphtoate sont minéralisés mais à des vitesses plus faibles. La minéralisation du pyrène dans le sol a déjà été mise en évidence dans des sols pollués aux HAPs et montre des vitesses de minéralisation plus faible que celles du phénanthrène (Johnsen et Karlson, 2005).

La re-contamination au pyrène améliore le potentiel de dégradation du 2,3-dihydroxynaphtalène et la re-contamination au 1-hydroxy-2-naphtoate améliore le potentiel de dégradation du fluoranthène, du BaP, du chrysène et inhibe le potentiel de dégradation de la benzantracène-quinone par la communauté microbienne du sol de Neuves-Maisons. L'ajout de ces composés stimulerait donc la sélection et l'enrichissement de microorganismes capables de dégrader d'autres composés aromatiques (Leahy et Colwell, 1990).

Par ailleurs, l'augmentation du nombre de copies du gène de l'ARNr 18S dans le sol amendé en 1-hydroxy-2-naphtoate par rapport au sol témoin indique une augmentation significative de la communauté fongique dans le sol contaminé au 1-hydroxy-2-naphtoate. Ce composé favoriserait donc également la croissance fongique et pourrait être une source de carbone métabolisable par certains champignons. Cependant très peu de données relatives à l'effet de ce composé sur les microorganismes du sol sont décrites dans la littérature.

Dans le sol amendé en pyrène, le nombre de copies de gènes codant les HAP-dioxygénases des bactéries Gram à positif augmente fortement. Ce résultat corrobore avec le fait que la dégradation du pyrène et des autres HAPs de haut poids moléculaire est principalement due à

l'activité de bactéries gram positives appartenant à la famille des actinomycètes (Peng *et al.* 2008) et en particulier aux genres bactériens *Mycobacterium* (Mahantiya *et al.*, 2008) et *Rhodococcus* (Martinkova *et al.*, 2009). Les HAPs de haut poids moléculaire sont moins solubles et plus hydrophobes que les HAPs de plus bas poids moléculaire, de ce fait ils sont plus facilement adsorbés et séquestrés sur les particules de sols et donc moins disponibles pour la biodégradation par les microorganismes du sol (Haritash et Kaushik, 2009 ; Pandey *et al.* 2009). L'ajout d'une concentration importante de pyrène a permis d'augmenter sa fraction biodisponible et de sélectionner des microorganismes adaptés à sa dégradation. Ainsi, l'ajout de pyrène pourrait sélectionner les microorganismes portant des gènes codant des HAP-dioxygénases. Cependant, même si une augmentation du nombre de gènes de HAP-dioxygénases est observée dans le sol re-contaminé au pyrène, l'évaluation du potentiel métabolique en microplaque Biolog ne permet pas de confirmer une augmentation du potentiel de dégradation des composés aromatiques de haut poids moléculaire dans ce sol.

#### IV.2.5. Une absence de minéralisation : cas du 2,3-dihydroxynaphtalène

Le composé 2,3-dihydroxynaphtalène ne semble pas être minéralisé dans le sol de Neuves-Maisons bien que la dégradation de ce métabolite ait déjà été décrite, notamment chez une souche de *Nocardia* dégradant le naphthalène (Zeinali *et al.* 2008). Toutefois il est possible qu'il soit partiellement dégradé sans être complètement minéralisé, ce qui n'induirait pas de modification d'activité.

### **IV.3. Impact du type de sol et de la présence de plantes sur le profil métabolique de dégradation des composés aromatiques**

#### IV. 3.1. Impact des propriétés des sols

Parmi les trois sols testés au cours de cette expérience, les sols de Neuves-Maisons et de Homécourt sont fortement pollués par les HAPs et le sol de Joeuf est très faiblement pollué par les HAPs (Tableau I). La comparaison des sols entre eux montre des profils de dégradation différents, probablement dues aux propriétés physico-chimiques des sols et notamment de leur teneur en différents HAPs et composés aromatiques. La dégradation du

dibenzothiophène semble être plus importante dans les sols de Homécourt et de Joeuf ; le sol d'Homécourt présente une meilleure dégradation du phtalate que les deux autres sols et la dégradation du phénanthrène est plus importante dans le sol de Neuves-Maisons que dans les deux autres sols. Ceci indiquerait que la diversité métabolique de la communauté serait à la fois conditionnée par les propriétés physico-chimiques du sol et l'exposition des microorganismes aux polluants. Zhang *et al.* (2013) et Cébron *et al.* (2008) ont montré qu'une pollution chronique en HAPs entraînait la sélection de communautés microbiennes spécialisées possédant des gènes de dégradation des HAPs.

#### IV. 3.1. Impact de la présence de plantes et effet rhizosphère

L'effet de la présence ou non de plantes dans les sols semble modifier le profil de dégradation de plusieurs composés. De plus, bien qu'il ait été montré que la présence de plantes pouvait stimuler l'efficacité de dégradation des HAPs (Berendsen *et al.*, 2012), une augmentation du potentiel de dégradation des composés aromatiques n'est pas toujours observée pour les sols plantés dans les tests en microplaques Biolog. Dans le sol de Neuves-Maisons, une augmentation significative de la dégradation du fluorène dans le sol non planté suggère un effet inhibiteur de la présence de plantes sur la dégradation de ce composé.

La présence de plantes dans le sol de Homécourt favoriserait la dégradation des composés salicylate, pyrène, 9-fluorènone, indanone et 1-hydroxy-2-naphtoate mais inhiberait la dégradation des composés phtalate, anthraquinone, benzanthracène-quinone, carbazole et glucose.

Dans le sol de Joeuf la présence de plantes semble améliorer la dégradation des composés 1-hydroxy-2-naphtoate, pyruvate, acridine et chrysène.

La dégradation plus importante des composés dans les sols non plantés par rapport aux sols plantés peut s'expliquer par le fait que l'apport d'exsudats racinaires parmi lesquels des éléments nutritifs (sucres simples, acides aminés) entraînerait la sélection de microorganismes dégradant les sources de carbones facilement dégradables, qui seraient alors prépondérants par rapport aux microorganismes dégradants les HAPs et leurs métabolites dans la communauté microbienne du sol.

L'augmentation de l'efficacité de dégradation de certains composés dans les sols plantés peut s'expliquer par une stimulation de l'efficacité de dégradation des communautés microbiennes par les exsudats racinaires des plantes. Des molécules surfactantes produits par les plantes

peuvent améliorer la disponibilité des composés organiques (Chen *et al.*, 2013) et par conséquent l'activité des microorganismes dégradeurs, qui pourraient voir leur densité augmenter. Des analogues structuraux produits par les plantes peuvent également activer les voies métaboliques des microorganismes impliqués dans la dégradation de certains composés aromatiques (Crowley *et al.*, 2000 ; Singer *et al.*, 2003).

## Conclusion

Malgré les nombreux biais expérimentaux, l'analyse du profil métabolique de dégradation des communautés microbiennes en microplaque Biolog montre des résultats complémentaires avec les autres données mesures réalisées sur les sols (taux de minéralisation et les analyses moléculaires).

Cette méthode a permis de mettre en évidence certains changements métaboliques de dégradation lorsqu'un composé aromatique est ajouté au sol et sous l'influence de la présence de plantes. Bien que le panel de composés testés ne soit pas exhaustif, la méthode a permis en outre de différencier le profil de dégradation de différents sols et d'évaluer l'impact de plusieurs polluants sur la diversité métabolique d'un sol. Enfin, l'apport des données de fluorescence permet de confirmer l'activité de dégradation des inocula dans les microplaques et a permis de confirmer la dégradation du phénanthrène dans le sol de Neuves-Maisons.

## **Bibliographie**

Abhilash P. C., Jamil S. and Singh. (2009). Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnology Advances*. **27**(4): 474-488.

Alberts J.J., Takacs M. and Schalles J. (2004). Ultraviolet-visible and fluorescence spectral evidence of natural organic matter changes along an estuarine salinity gradient. *Estuaries* **27**(2): 296-310

de Menezes A., Clipson N. and Doyle E. (2012). Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. *Environmental Microbiology*. **14**(9), 2577–2588.

Alkio M., Tabuchi T.M., Wang X. and Colon-Carmona A. (2005). Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany* **56**(421): 2983-94.

Bamforth S.M. and Singleton I. (2005) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biot.* **80**: 723 – 736.

Benedek T., Vajna B., Tánicsics A., Márialigeti M., Lányi V. and Máthé I. (2013). Remarkable impact of PAHs and TPHs on the richness and diversity of bacterial species in surface soils exposed to long-term hydrocarbon pollution. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **29**(11): 1989-2002.

Berendsen L, Pietersen M.J., and Bakker P (2012)The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.***17**(8):478-86.

Blankenhorn I., Meijer D., and van Delft R.J. (1992). Inter-laboratory comparison of methods used for analysing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil samples. *Fresenius J Anal Chem.* **343**:497-504.

Bochner, B. R. (1989). Sleuthing out bacterial identities. *Nature* **339**: 157-158.

Boyer M. and Combrisson J. (2013). Analytical opportunities of quantitative polymerase chain reaction in dairy microbiology. *International Dairy Journal*. **30**(1): 45–52.

Casellas M., Grifoll M., Sabaté J. and Solanas A.M. (1998). Isolation and characterization of a 9 fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Can. J. Microbiol.* **44** : 734–742.

Casellas M., Grifoll M., Bayona, J.M. and Solanas A.M. (1997). New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(1) : 819–826.

Cébron A., Louvel B., Faure P., France-Lanord C., Chen Y., Murrell J. C., and Leyval C (2011). Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene degraders in PAH-polluted soil but not phenanthrene degradation rates. *Environmental Microbiology*. **13**(3) : 722-736.

Cébron A., Norini M.P., Beguiristain T. and Leyval C. (2008). Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD alpha) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*. **73**(2): 148-159.

Cerniglia C.E. and Heitkamp M.A. (1989). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment. Varanasi U ed, pp. 41–68. Press, Boca Raton, FL.

Chen K., Zhu Q., Qian Y., Song Y., Yao J. and Choi M.M. (2013). Microcalorimetric investigation of the effect of non-ionic surfactant on biodegradation of pyrene by PAH-degrading bacteria *Burkholderia cepacia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **98**: 361-367.

Cory R.M. and McKnight D.M. (2005). Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology*. **39**(21): 8142-8149

Criddle, C.S. (1993) The kinetics of cometabolism. *Biotechnology and Bioengineering*. **41** (11): 1048-1056.

Crowley, D. E., Luepromchai E. and Singer A. (2000). Metabolism of Xenobiotics in the Rhizosphere. *Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms*. **777** : 333-352.

DeBruyn J.M., Mead T.J., and Sayler G.S. (2012) Horizontal transfer of PAH catabolism genes in *Mycobacterium*: evidence from comparative genomics and isolated pyrene-degrading bacteria. [Environ Sci Technol](#). 46(1):99-106.

Feilberg A. and Nielsen T. (2000). Effect of aerosol chemical composition on the photodegradation of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*. **34**(5): 789-797.

Gan S., Lau E.V. and Ng H.K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *172*(2–3): 532–549.

Garland J.L. and Mills A.L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. And Environ. Microbiol*. **57**: 2351-2359.

Habe H. and Omori T. (2003) Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **67**: 225-243.

Haritash A.K. and Kaushik C.P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater*. **169**(1):1–15.

Harvey RG (1991). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity. Cambridge University Press, Cambridge.

Hiltner, L. 1904. Ueber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gärungs- und Bräuerindustrie. Arbeiten Deutscher Landwirtschafts Gesellschaft. **98** : 59-78.

Hilyard E.J., Jones-Meehan J.M., Spargo B. J. and Hill R.T. (2008). Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments. Applied and Environmental Microbiology. **74**(4): 1176-1182.

Schnoor J.L., Licht L.A., McCutcheon S.C., Wolfe N.L. and Carreira L.H. (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. Environ. Sci. Technol., **29**(7) : 318–323.

Janbandhu A.I. and Fulekar M.H. (2011). Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. Journal of Hazardous Materials. **187**: 333–340.

Johnsen A.R., Wick L.Y and Harms H. (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution. **133**(1) : 71-84.

Joner E.J., Johansen A., Loibner A.P., de la Cruz M.A., Szolar O.H., Portal J.M. and Leyval C. (2001). Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. Environmental Science & Technology. **35**(13): 2773-2777.

Kadali K.K., Simons K.L., Skuza P.P., Moore R.B. and Ball A.S. (2012). A complementary approach to identifying and assessing the remediation potential of hydrocarbonoclastic bacteria. Journal of Microbiological Methods. **88**(3): 348-355.

Keith L.H and Telliard W.A. (1979). Priority pollutants. I. A perspective view. Environ Sci Technol **13**: 416–423.

Lakowicz J.R. (2007) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer, 3<sup>o</sup> edition.

Lee P.H., Doick K.J. and Semple K.T. (2003). The development of phenanthrene catabolism in soil amended with transformer oil. FEMS Microbiol Lett. **228**(2): 217-23.

Leyval C., Girard M.-C., Walter C., Remy J.-C., Berthelin J., Morel J.-L. (2005) Pollutions organiques agricoles, urbaines ou industrielles : Cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Chapitre 19 in Sols et environnement. DUNOD, 816.

Liu R., Xiao N., Wei S., Zhao L. and An J. (2014). Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. Science of The Total Environment **473–474** : 350–358

Lu X.Y., Zhang T. and Fang H.H. (2011). Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. Appl. Microbiol. Biotechnol. **89**(5):1357-71.

Lundstedt S., White P.A. and Lemieux C. L. (2007). Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. *AMBIO*. **36**(6): 475-485.

Martin F., Torelli S., Le Paslier D., Barbance A., Martin-Laurent F., Bru D., Geremia R., Blake G., Jouanneau Y. (2011). Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene. *Environ Pollut*. **162**: 345-53.

McKay D. and Calcott D. (1998). Partitioning and Physical Chemical Properties of PAHs. *The Handbook of Environmental Chemistry*. **3**: 325-345.

Meckenstock, R. U. and Mouttaki, H. (2011). Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*. **22**(3): 406-414.

de Menezes A., Clipson N., Doyle E. (2012) Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. *Environ Microbiol*. **14**(9): 2577-88.

Monna L., Omori T. and Kodama T. (1993). Microbial Degradation of Dibenzofuran, Fluorene, and Dibenzo-p-Dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. *Appl Environ Microbiol*. **59**(1): 285-289.

Mulas, G., Mallocci, G., Joblin, C. and Toubanc, D. (2006). Estimated IR and phosphorescence emission fluxes for specific polycyclic aromatic hydrocarbons in the Red Rectangle. *Astronomy and Astrophysics* **446**(2): 537.

Oguntimehin I., Nakatani N. and 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*. **154**(2): 264-271.

Pandey J., Chauhan A. and Jain R. K. (2009). Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. *FEMS Microbiology Review* **33**(2): 324-375.

Peng R.H., Xiong A.S., Xue Y., Fu X.Y., Gao F., Zhao W., Tian Y.S. and Yao Q.H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 927-955.

Perraudin E., (2004). Réactivité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) adsorbés sur des particules modèles d'intérêt atmosphérique : mesures cinétiques, développements analytiques et analyse des produits d'oxydation. Thèse de Doctorat en sciences chimiques, Université de Bordeaux 1.

Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P. and van der Putten W.H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*. **11**(11) : 789-799.

- Reynaud S. and Deschaux P. (2006). The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquat Toxicol.* **77** : 229–238
- Scullion J. (2006) Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften* **93**(2) : 51-56
- Sepic E., Bricelj M. and Leskovsek H. (2003). Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. *Chemosphere.* **52** : 1125–1133.
- Singer A. C., Crowley D. E. and Thompson I. P. (2003). Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology.* **21**(3): 123-30.
- Singleton D. R., Sangaiah R., Gold A., Ball L.M. and Aitken M.D. (2006). Identification and quantification of uncultivated Proteobacteria associated with pyrene degradation in a bioreactor treating PAH-contaminated soil. *Environmental Microbiology.* **8**(10) : 1736-1745.
- Sofa A., Ciarfaglia A., Scopa A., Camele I., Curci M., Crecchio C ; Xiloyannis C. and Palese A. M. (2014). Soil microbial diversity and activity in a Mediterranean olive orchard using sustainable agricultural practices. *Soil Use and Management.* **30**(1): 160-167.
- Spain J. C. and VanVeld P. A., (1983). Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum and chemical structure. *Applied and Environmental Microbiology.* **45**: 428-435.
- Sverdrup L. E., Ekelund F., Krogh P. H., Nielsen T. and Johnsen K. (2002). Soil microbial toxicity of eight polycyclic aromatic compounds: effects on nitrification, the genetic diversity of bacteria, and the total number of protozoans. *Environmental Toxicology and Chemistry, Environ Toxicol Chem.* **21**(8):1644-50.
- Tao X. Q., Lee G. N., Dang Z., Yang C. and Yi X. Y. (2007). A phenanthrene degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils. *Process Biochemistry.* **42**(3): 401–408.
- Thion C. (2012) Influence des interactions Bactéries-Champignons sur la dissipation des HAPs dans la rhizosphère. Thèse de Doctorat de l'Université de Lorraine, Nancy.
- Uhlik O., Leewis M. C., Strejcek M., Mackova M., Leigh M.B. and Macek T. (2013). Stable isotope probing in the metagenomics era: A bridge towards improved bioremediation. *Biotechnology Advances.* **31**(2) : 154-165.
- Valentin L., Feijoo G., Moreira M.T. and Lema J.M. (2006). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. *Int. Biodeter. Biodegr.* **58**: 15 – 21.
- Vaughan B.E. (1983) State of research: Environmental pathways and food chain transfer. *Health Perspectives.* **54**: 353-371.

Volkering F., Breure A. M. and van Andel J. G. (1993). Effect of microorganisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene. *Appl Microbiol Biotechnol.* **40**: 535–540.

Wilcke W. (2000). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil — a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.* 163(3) : 229–248.

Xia Y., Min H., Rao G., Lv Z. M., Liu J., Ye Y. F. and Duan X. J. (2005). Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Spingomonas paucibilis* strain ZX4. *Biodegradation.* **16**(5) : 393–402.

Yoshitomi, K. J. and Shann, J. R. (2001) Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on C-14-pyrene mineralization. *Soil Biology and Biochemistry.* **33**(12): 1769-1776

Zafra G., Absalón A. E., Cuevas M. D. and Cortés-Espinosa D. V. (2014). Isolation and Selection of a Highly Tolerant Microbial Consortium with Potential for PAH Biodegradation from Heavy Crude Oil-Contaminated Soils. *Water Air Soil Pollut* **225**:1826.

Zeinali M., Vossoughi M. and Ardestani S. K. (2008). Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism. *Chemosphere.* **72**(6): 905-909.

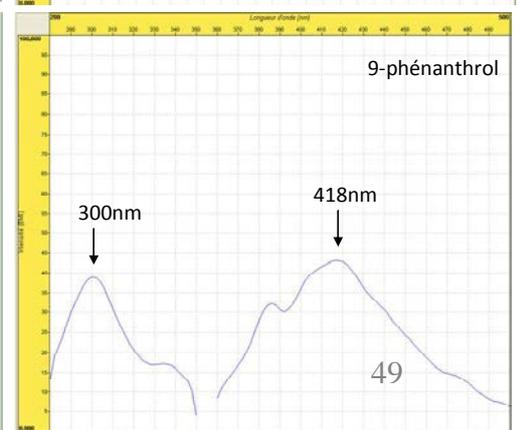
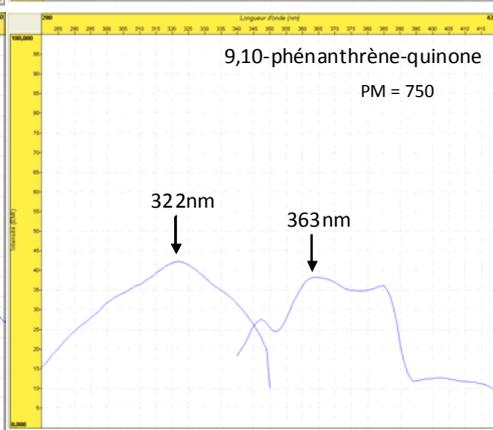
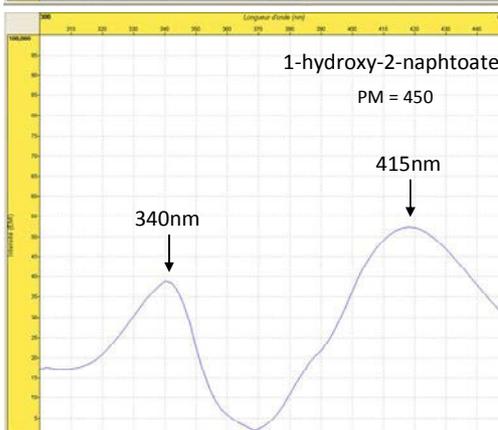
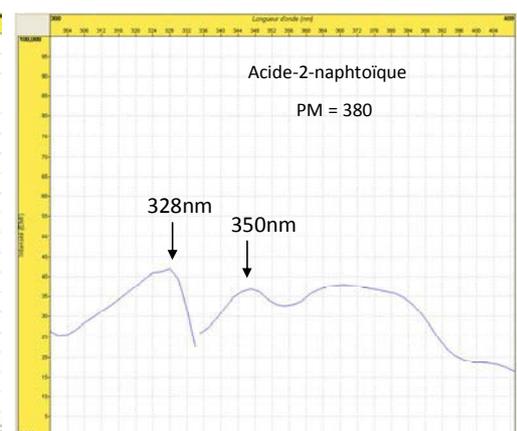
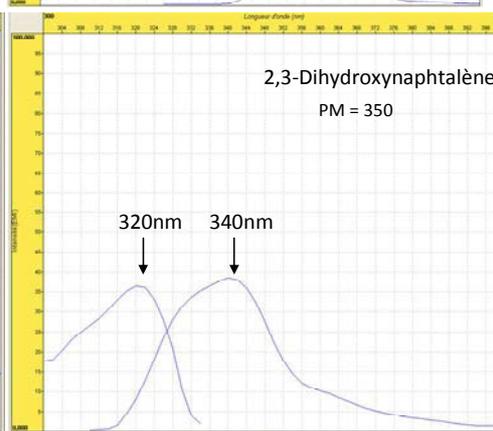
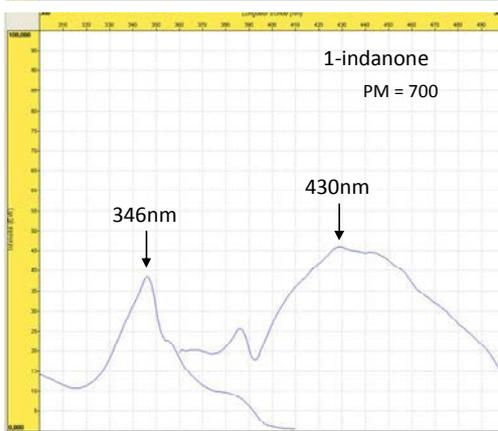
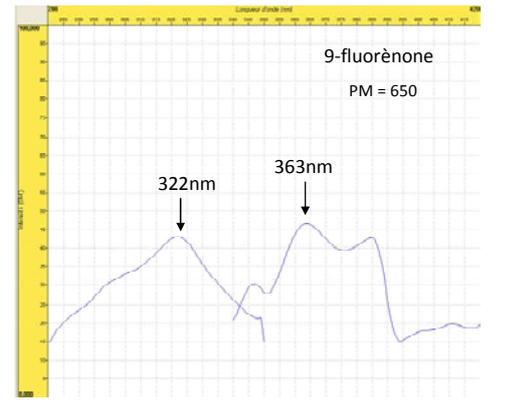
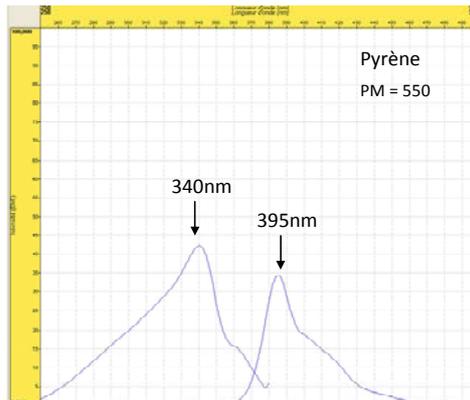
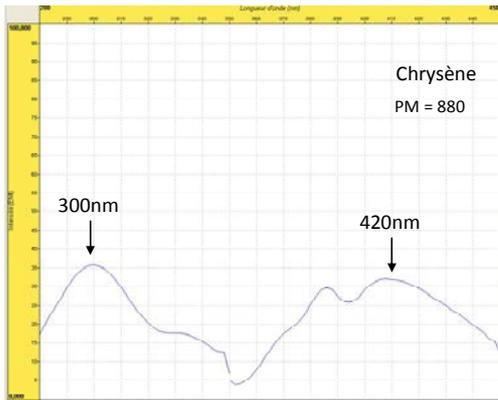
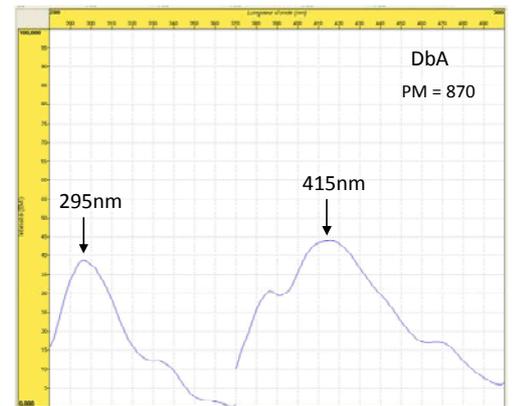
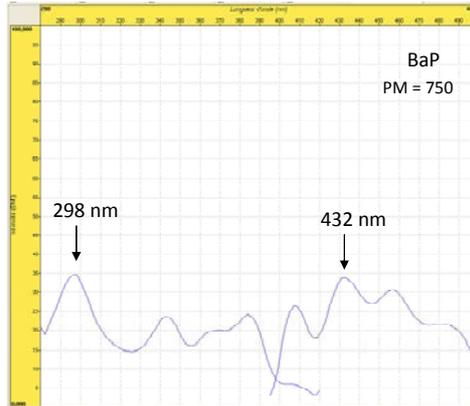
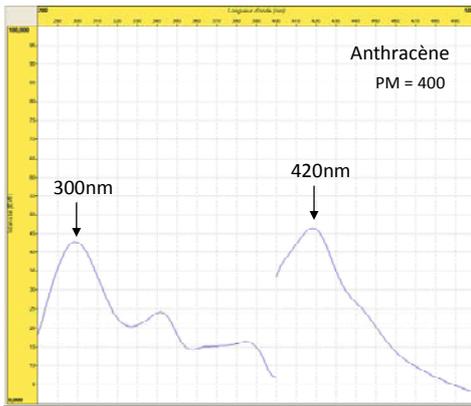
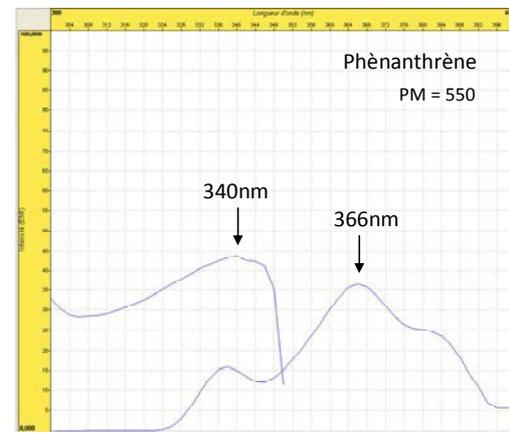
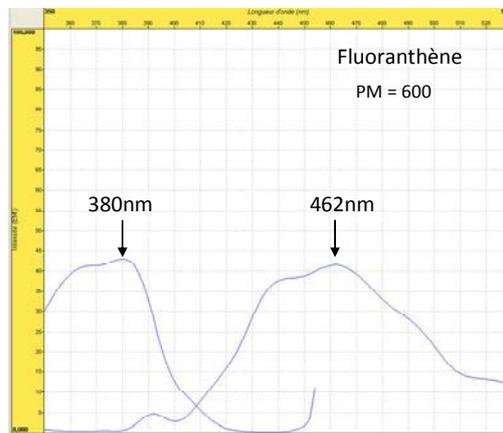
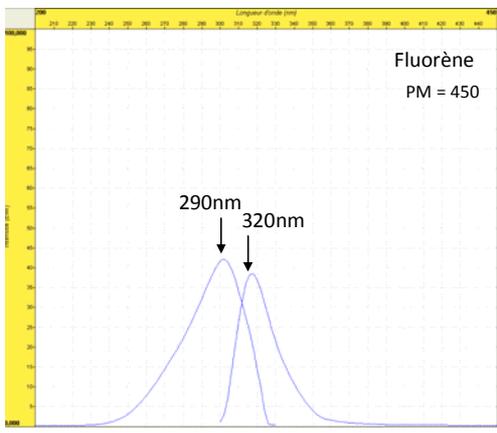
## Annexe

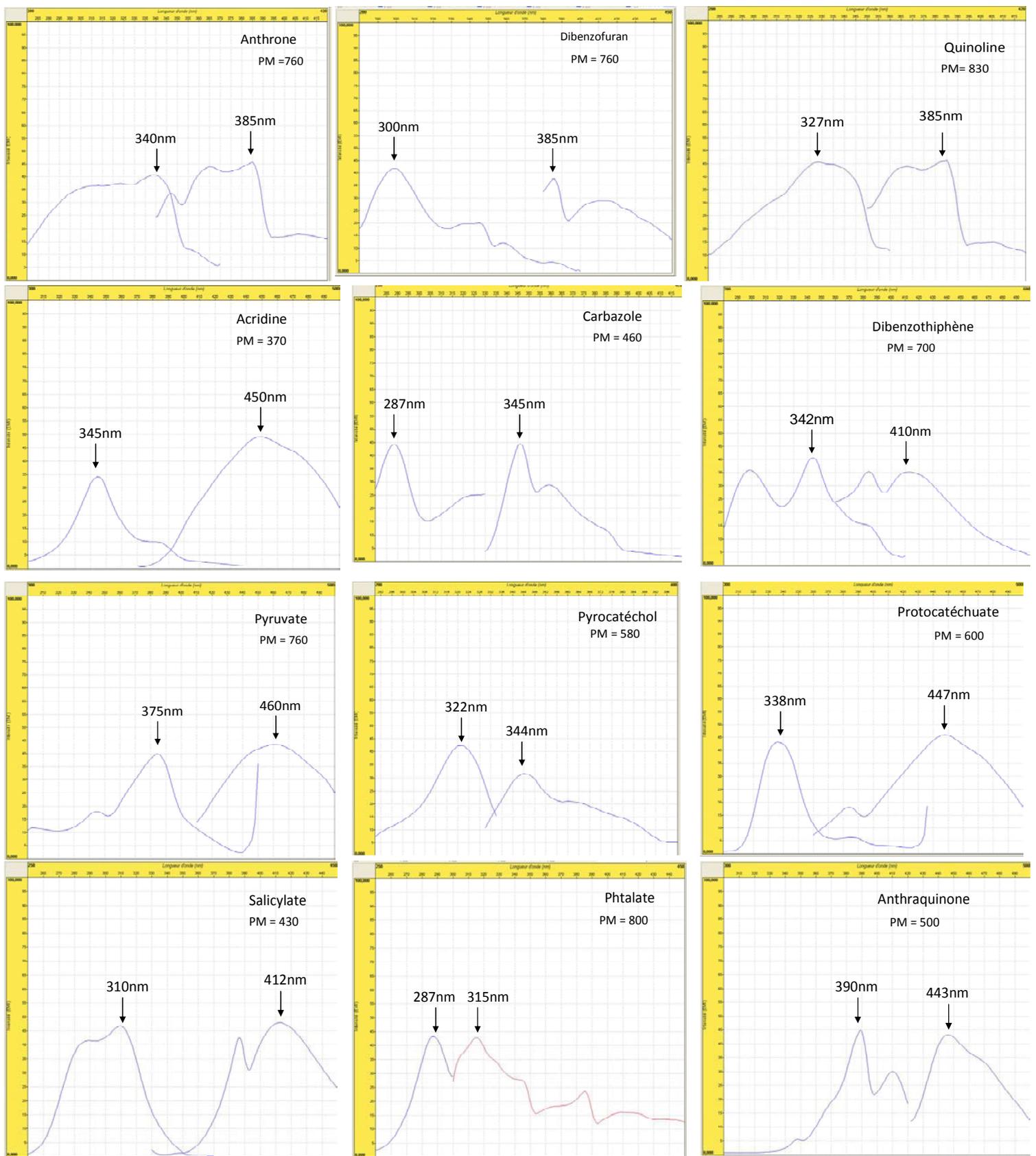
Composé	Volume (pour 1 réaction)
iQ SYBR GREEN Supermix (BioRad)	10 $\mu$ l
Amorce F (10 $\mu$ M)	0,8 $\mu$ l
Amorce R (10 $\mu$ M)	0,8 $\mu$ l
BSA 3%	0,6 $\mu$ l
DMSO	0,4 $\mu$ l
T4gp32 (QBiogene)	0,08 $\mu$ l
H2O (Qsp 19 $\mu$ l)	6,32 $\mu$ l
ADN	1 $\mu$ l

**Annexe 1** : composition du mélange réactionnel de PCR en temps réel.

BSA: Bovine serum albumine ; DMSO : diméthylsulfoxyde ; F : forward ; R : reverse

T4gp32 : Protéine isolée du bactériophage T4 permettant l'amélioration de l'efficacité de la réaction PCR.





**Annexe 2 :** Spectres d'excitation et d'émission des différents composés réalisés en cuve UVette (Eppendorf) au spectrophotomètre (SAFAS, Monaco). Les longueurs d'onde pour lesquelles l'excitation et l'émission sont maximales sont indiquées par une flèche. La valeur du photomultiplicateur (PM) défini pour la mesure du spectre est indiquée.

## **Résumé:**

La biodégradation des composés aromatiques polycycliques (CAPs) et notamment des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) est très étudiée du fait de la distribution ubiquitaire de ces composés, de leur persistance dans les sols et de leur toxicité pour la santé humaine. Au cours de ce stage, la mise au point d'une technique utilisant les microplaques Biolog MT2 à été réalisée dans le but d'évaluer le potentiel métabolique de communautés microbiennes de différents sols vis-à-vis d'un panel de composés aromatiques parmi lesquels des HAPs, des CAPs polaires et des métabolites intermédiaires et finaux de dégradation des HAPs. Cette technique a permis de tester ce potentiel métabolique pour les communautés microbiennes d'un sol re-contaminé par plusieurs composés aromatiques (HAPs ou métabolites) et de différents sols sous l'influence ou non de la présence de plantes. Bien que certains biais relatifs à l'utilisation de la microplaque Biolog aient été rencontrés, les résultats montrent que cette technique permet de mettre en évidence des changements du profil de dégradation selon les conditions testées. On constate que la re-contamination du sol avec du phtalate, du fluorène ou du 9-fluorènone diminue le potentiel métabolique de dégradation des communautés microbiennes du sol pour au moins 4 composés aromatiques et à l'inverse que la re-contamination avec du phénanthrène ou du 1-hydroxy-2-naphtoate améliore le potentiel de dégradation des communautés pour au moins 5 composés. En outre, la présence de plantes entraîne une augmentation du potentiel métabolique de dégradation dans les sols de Homécourt et Joeuf (54, France). Les résultats montrent également que 3 sols, aux niveaux de pollution en HAPs variables, possèdent des profils métaboliques différents. La spectrométrie de fluorescence a permis de confirmer le potentiel métabolique du sol de Neuves-Maisons vis-à-vis du phénanthrène. Par ailleurs ces résultats ont été mis en relation avec la quantification de divers gènes marqueurs phylogénétiques (ADNr 16S et ADNr 18S) et fonctionnels (HAP-dioxygénases). Bien que les diverses re-contaminations du sol ne modifient pas les densités bactériennes et fongiques, la re-contamination avec du pyrène entraîne une augmentation de l'abondance des HAP-dioxygénases des bactéries à Gram positif.

Mots clés : Hydrocarbures aromatiques polycycliques, sol, microplaques Biolog MT2, profil métabolique, biodégradation, fluorescence.

## **Summary:**

Biodegradation of polycyclic aromatic compounds (PACs) and particularly of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is widely studied due to the ubiquitous distribution, the persistence in soil and the toxicity to human health of these compounds. In this study, the development of a technique using Biolog MT2 microplates has been used to assess the metabolic potential of soil microbial communities for the degradation of a range of aromatic compounds including PAHs, polar PACs and intermediate and final PAHs-degradation products. This technique was used to test the metabolic degradation potential of microbial communities after the recontamination of one soil with various aromatic compound (PAHs or metabolites) and for different soils under the influence of plants. Beside several bias of the technic, the results show that this technique allows to highlight changes in degradation profile between conditions. The re-contamination with phthalate, fluorene or 9-fluorenone decreases the microbial communities metabolic degradation potential for at least 4 compounds and conversely that re-contamination with phenanthrene or 1-hydroxy-2-naphthoate improves it for 5 compounds. In addition, the presence of plants causes an increase in metabolic potential degradation both Homécourt and Joeuf soils (54, France). The results also show that three soil with different level of PAH pollution have different metabolic profiles. Fluorescence spectrometry confirmed the phenanthrene degradation potential of the microbial communities of Neuves-Maisons soil. These results were compared to the quantification of phylogenetic markers (16S rDNA and 18S rDNA) and functional (PAH-dioxygenases) genes. Even if the re-contamination of the soil did not modify the bacterial and fungal abundances, the pyrene re-contamination pyrene causes an increase of Gram-positive bacteria holding PAH-dioxygenases.

Keywords : Polycyclic aromatic hydrocarbons, soil, Biolog MT2 microplates, metabolic profile, biodegradation, fluorescence.