



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

LIMOS, UMR 7137 CNRS/UHP

UFR STMP

École doctorale

Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement

Discipline : Géosciences

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Nancy

Brice Louvel

Étude en microcosmes de l'effet du ray-grass et de
ses exsudats racinaires sur la dissipation des HAP et les
communautés bactériennes dégradantes

Soutenance prévue le 18 octobre 2010

Mme Sabine HOUOT, DR INRA Paris Grignon	Rapporteur
M. Robert DURAN, Pr., Université de Pau et des Pays de l'Adour	Rapporteur
M. Christophe MOUGEL, CR INRA, Dijon	Examineur
M. Jean-Louis MOREL, Pr. ENSAIA, INPL Nancy Université	Examineur
M. Jean-Claude BLOCK, Pr., UHP, Nancy Université	Examineur
Mme Corinne LEYVAL, DR CNRS, Nancy Université	Directrice de thèse

Je dédicace ce travail à ma femme Elsa, fleur de ma vie, pour son soutien et ses encouragements depuis le lycée. Je souhaite remercier profondément ma famille qui m'a toujours soutenu et donné les moyens de suivre de passionnantes études. Mille mercis à Clarisse Balland et Emile Bobou-Bi ainsi qu'à Afi Jeanne Bongoua et Coralie Biache pour ces années nancéenne teintées d'une douce allégresse.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matières Organiques dans les Sols (LIMOS) de Nancy. Je tiens à remercier en premier lieu Corinne Leyval, directrice du laboratoire et de thèse, d'avoir accepté d'encadrer ce travail jusqu'à son aboutissement et pour la grande liberté qu'elle m'a laissée dans mon travail.

J'exprime ma reconnaissance à Aurélie Cébron, Thierry Beguiristain et Christian Mustin, pour leurs conseils réguliers et pour m'avoir fait partager leurs expériences dans la bonne humeur. Je remercie Denis Merlet et David Billet pour les échanges sur la chromatographie liquide ainsi que Géraldine Kitzinger et Hervé Marmier pour leurs compétences analytiques. J'exprime ma gratitude envers Djihad Oulkadi pour son travail et sa gentillesse, et pour sa contribution lors de son stage de Master. Le LIMOS a ainsi été le lieu de belles rencontres et je tiens à remercier Chantal Ginsburger, Colette Munier-Lamy, Laetitia Despouy, Christine Friry et Geneviève Magnin pour leurs bienveillances. J'ai aussi passé de bons moments avec les futurs docteurs, Cécile Caupert, Marie Stauffer, Xiaobai Zhou, Fabient Laurent et Norbert Ondo Zue Abaga. Je remercie les anciens du LIMOS, notamment Maire-Paule Norini, Paul-Olivier Redon et Arsène Sanon qui m'ont apporté de précieux conseils.

Durant ces quatre années, j'ai été heureux de bénéficier de la grande entraide entre les laboratoires. Ainsi, je souhaite remercier vivement Pierre Faure et l'ensemble du laboratoire G2R pour l'accueil et l'aide analytique qu'ils m'ont apportée, ainsi que Gilles Bessaque pour son aide précieuse en début de thèse. J'ai aussi eu la chance de m'essayer pendant plusieurs mois à la synthèse du phénanthrène avec Christine Gerardin et Pascal Lemièrre dans feu le laboratoire LCPOC. Je remercie Christian France-Lanord et Caroline Guilmette pour les analyses isotopiques au CRPG. Je remercie Jacques Banvoy qui a toujours été présent pour le fonctionnement et la maintenance du phytotron.

Un remerciement particulier à Annette Hofmann qui m'a initié à la recherche ainsi qu'à Jacques Berthelin qui m'a prodigué de précieux conseils lors de mon stage de master.

Je souhaite remercier Mme Houot, directrice de recherche à l'INRA de Paris Grignon et M. Duran, Professeur à l'Université de Pau, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir participer à mon jury de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également M. Mougel, chargé de recherche à l'INRA de Dijon, M. Jean-Louis Morel, professeurs à l'ENSAIA INPL de l'université de Nancy et M. Jean-Claude BLOCK, Professeur UHP de l'université de Nancy, qui ont accepté d'être membres du jury.

Introduction

1.	Synthèse bibliographique.....	1
1.1.	Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques	1
1.1.1.	Structures moléculaires et propriétés chimiques.....	1
1.1.2.	Toxicité et effets cancérigènes	2
1.1.3.	Sources et distribution dans l'environnement	3
1.2.	HAP dans les sols.....	4
1.2.1.	L'atmosphère et la solution du sol	4
1.2.2.	La fraction minérale	4
1.2.3.	Matière organique naturelle	5
1.2.4.	Matière organique anthropique.....	7
1.2.5.	Phénomène de vieillissement des HAP	8
1.2.6.	Biodisponibilité des HAP du sol.....	8
1.3.	Biodégradation des HAP	10
1.3.1.	Acquisition des HAP par les bactéries	11
1.3.2.	Mécanisme d'action des arènes dioxygénases	12
1.3.3.	Voies métaboliques de dégradation	13
1.3.4.	Localisation des gènes codant les HAP-dioxygénases.....	14
1.3.5.	Régulation de l'expression des gènes codant les HAP-dioxygénases.....	14
1.3.6.	Diversité des genres bactériens dégradant les HAP et des gènes codant une HAP-dioxygénase.....	15
1.3.7.	Co-métabolisme des substrats	19
1.4.	La rhizosphère : un milieu complexe.....	21
1.4.1.	Propriétés physiques et chimiques de la rhizosphère.....	21
1.4.2.	Composition des exsudats racinaires.....	21
1.4.3.	Propriétés biologiques de la rhizosphère.....	23
1.4.4.	Devenir des HAP dans la rhizosphère	24
1.5.	Traitement biologique des HAP dans les sols	27
1.5.1.	Bioremédiation des HAP	27
1.5.2.	L'atténuation naturelle	27
1.5.3.	La bioaugmentation	27
1.5.4.	La biostimulation.....	28
1.5.5.	La phytoremédiation	28
2.	Objectifs de l'étude	29

3.	Matériels et Méthodes	32
3.1.	Matériels	32
3.1.1.	Substrats et Sols.....	32
3.1.2.	HAP modèles	35
3.1.3.	Plantes et exsudats racinaires.....	36
3.1.4.	Inoculum bactérien	36
3.2.	Méthodes	37
3.2.1.	Lavage et stérilisation du matériel.....	37
3.2.2.	Ajout de HAP modèle	37
3.2.3.	Inoculum bactérien	37
3.2.4.	Dispositifs expérimentaux – Principes et choix.....	38
3.2.5.	Dispositif de production et prélèvement des exsudats racinaires.....	43
3.3.	Analyses.....	45
3.3.1.	Analyses des exsudats.....	45
3.3.2.	Dosage du dioxyde de carbone.....	46
3.3.3.	Dosage du carbone organique dissous.....	46
3.3.4.	Analyses des HAP.....	47
3.3.5.	Analyses isotopiques du carbone ¹³ C	54
3.4.	Analyses biomoléculaires.....	55
3.4.1.	Extraction de l'ADN	55
3.4.2.	Méthode SIP et séparation du ¹² C-ADN et ¹³ C-ADN.....	56
3.4.3.	Quantification des gènes.....	57
3.4.4.	Structure des communautés	60
3.4.5.	Identification des espèces bactériennes	62
3.4.6.	Analyses de la structure des communautés bactériennes.....	62
3.5.	Analyses Statistiques	63
3.5.1.	Analyses de la variance	63
3.5.2.	Analyses multidimensionnelles de la structure des communautés bactériennes.....	63
3.5.3.	Représentations graphiques	63
4.	Etude en dispositifs à compartiments de l'effet du gradient racinaire de ray-grass sur le devenir du phénanthrène dans du sable et les bactéries dégradantes.....	64
4.1.	Description de l'expérience.....	64
4.1.1.	Dispositifs à compartiments	64
4.1.2.	Analyses de l'expérience en dispositifs à compartiments avec le sable	65
4.2.	Résultats	66

4.2.1.	Carbone organique dissous	66
4.2.2.	Dégradation du phénanthrène	67
4.2.3.	Quantification des gènes codant pour l'ARNr 16S et les HAP-dioxygénases	68
4.2.4.	Structure des communautés bactériennes.....	73
4.3.	Discussion.....	75
4.3.1.	Gradients racinaires	75
4.3.2.	Effet du temps de contact sur les bactéries totales et dégradantes.....	78
4.3.3.	Effet du vieillissement de la plante	79
4.4.	Conclusion	80
5.	Étude en dispositifs à compartiments de l'effet du gradient racinaire de ray-grass sur la dissipation des HAP dans une terre contaminée et les bactéries dégradantes	81
5.1.	Objectif de l'expérience.....	81
5.1.1.	Description de l'expérience en dispositifs à compartiments avec de la terre polluée.....	81
5.1.2.	Analyses.....	82
5.2.	Résultats	83
5.2.1.	Carbone organique dissous.....	83
5.2.2.	Dissipation des HAP.....	84
5.2.3.	Biodisponibilité des HAP	87
5.2.4.	Quantification des gènes codant pour l'ARNr 16S et les HAP-dioxygénases	89
5.2.5.	Structure des communautés bactériennes.....	92
5.3.	Discussion.....	93
5.3.1.	Dissipation et biodisponibilité des HAP	93
5.3.2.	Bactéries totales et dégradantes	96
5.4.	Conclusion	98
6.	Etude en microcosme simplifié de l'effet des exsudats racinaires de ray-grass sur la dissipation du phénanthrène et les communautés bactériennes	99
6.1.	Description de l'expérience.....	99
6.1.1.	Microcosmes avec du sable.....	99
6.1.2.	Analyses.....	100
6.2.	Résultats	101
6.2.1.	Exsudats racinaires	101
6.2.2.	Carbone organique minéralisé.....	102
6.2.3.	Dégradation du phénanthrène	104
6.2.4.	Quantification des gènes codant pour l'ARNr 16S et les HAP-dioxygénases	105
6.2.5.	Structure des communautés bactériennes.....	108

6.3.	Discussion.....	110
6.4.	Conclusion	114
7.	Effet des exsudats racinaires sur la biodisponibilité des HAP dans trois sols historiquement contaminés ..	115
7.1.	Description de l'expérience.....	116
7.2.	Résultats	117
7.2.1.	Compositions des exsudats racinaires.....	117
7.2.2.	Dissipation des HAP dans les trois sols en présence et en absence d'exsudats racinaires	118
7.2.3.	Disponibilité de HAP extraits à la cyclodextrine dans les trois sols.....	120
7.2.4.	Extraction des HAP par une solution contenant des exsudats racinaires.....	122
7.3.	Discussion.....	123
7.4.	Conclusion	126
8.	Etude des communautés bactériennes impliquées dans la dégradation du phénanthrène par l'utilisation de ¹³ C et effet des exsudats racinaires sur ces communautés.....	127
8.1.	Description de l'expérience.....	128
8.1.1.	Microcosme avec de la terre contaminée	128
8.1.2.	Analyses.....	128
8.2.	Résultats	129
8.2.1.	Devenir du ¹³ C-phénanthrène dans la terre contaminée.....	129
8.2.2.	Quantification des gènes ARNr 16S et de HAP-dioxygénase	132
8.2.3.	Structure des communautés impliquées dans la dégradation du ¹³ C-phénanthrène	136
8.3.	Discussion.....	139
8.3.1.	Identification des bactéries stimulées par la présence d'exsudats racinaires.....	139
8.3.2.	Influence des exsudats sur le taux de dégradation du phénanthrène.....	140
8.3.3.	Bactéries impliquées dans la dégradation du phénanthrène avec et sans exsudats.....	141
8.4.	Conclusion	142
9.	Discussion générale et perspectives de recherche	143
9.1.	Effets des exsudats racinaires sur les espèces bactériennes dégradant le phénanthrène	143
9.2.	Effets des exsudats racinaires sur les bactéries possédant les gènes codant une HAP-dioxygénase	145
9.3.	Devenir des HAP dans les terres de friches industrielles	146
9.3.1.	Effets des exsudats racinaires sur la dissipation des HAP	146
9.3.2.	Effets des exsudats racinaires sur la biodisponibilité des HAP	147
9.3.3.	Effet de l'ajout de phénanthrène frais sur la dissipation des HAP natifs.....	148

9.4. Limites de l'étude	149
9.4.1. Les dispositifs à compartiments et la durée des expériences.....	149
9.4.2. L'ajout d'exsudats racinaires	149
9.4.3. Quantification et analyses	150
9.5. Perspectives	151
9.5.1. Les ARN messagers et enzymes HAP-dioxygénases	151
9.5.2. Utilisation de ¹⁴ C-phénanthrène.....	151
10. Conclusion générale.....	152
11. Annexes	153
12. Références bibliographiques.....	163

Liste des figures

Figure 1 : Formule développée de la molécule de phénanthrène (C ₁₄ H ₁₀).....	1
Figure 2 : Evolution d'un sol brun structuré en trois horizons (A, B et C) remanié en technosol.....	4
Figure 3 : Schéma fonctionnel de l'oxydation du phénanthrène en cis-1,2-dihydroxy-3,4-dihydrophénanthrène par une HAP-dioxygénase.....	12
Figure 4: Voie de dégradation bactérienne du phénanthrène (<i>Pseudomas sp.</i> 47 p1, s7k5) d'après la base de données Biocatalysis/biodegradation (Université du Minnesota).....	13
Figure 5 : Organisation génétique du plasmique pDTG1 codant les enzymes nécessaires à la dégradation des HAP	15
Figure 6 : Schéma des dispositifs à compartiments	39
Figure 7 : Compartiment latéral utilisé dans les dispositifs à compartiments.....	40
Figure 8 : Microcosme en flacon de verre	42
Figure 9 : Dispositif de culture hydroponique pour la production des exsudats racinaires	44
Figure 10 : Concentration du carbone organique dissous (COD) dans le sable (µg. g ⁻¹)	66
Figure 11 : Concentration du phénanthrène dans le sable (µg.g ⁻¹) en fonction de la distance au tapis racinaire.....	67
Figure 12 : Concentration en phénanthrène dans les sections rhizosphériques (0-3, 3-6 et 6-9 mm) et non rhizosphériques (NP) après 3 et 6 semaines de contact dans les 6 séries d'échantillons.....	68
Figure 13 : Effet du gradient racinaire sur le nombre de copies des gènes ARNr 16S, HAP-diox GN, HAP-diox GP	69
Figure 14 : Effets du temps de contact des compartiments latéraux sur le nombre de copies de gènes ARNr 16S, HAP-diox GN et HAP-diox GP avec des plantes âgées de 7 semaines.....	70
Figure 15 : Pourcentage de gènes HAP-dioxygénase de bactéries Gram négative (HAP-diox GN) et positive (HAP-diox GP).	72
Figure 16 : Profil TTGE des communautés bactériennes dans les sections rhizosphériques (0-3, et 6-9) et non plantées (NP).....	73
Figure 17 : Analyse multidimensionnelle à partir de la présence/absence des bandes d'ARNr 16S.....	75
Figure 18 : Concentration du carbone organique dissous (µg. g ⁻¹) dans les compartiments latéraux	83
Figure 19 : Concentration en HAP (µg. g ⁻¹) extractibles sous pression à l'hexane (ASE) dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons après 3 semaines d'incubation.	85
Figure 20 : Concentration en HAP (µg. g ⁻¹) extractibles sous pression à l'hexane (ASE) dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons après 6 semaines d'incubation.	86
Figure 21 : Concentrations de HAP (µg.g ⁻¹) extraits à la cyclodextrine à partir des compartiments latéraux contenant de la terre de Neuves-Maisons.....	88

Figure 22 : Nombre de copies des gènes ARNr 16S, HAP-diox GN et HAP-diox GP dans le sol de Neuves-Maisons	91
Figure 23 : Structure des communautés bactériennes révélée par analyse TTGE des terres contaminées de Neuves-Maisons.....	92
Figure 24 : Cinétique de libération du C du CO ₂ (µg.g ⁻¹ de sable) dans les microcosmes avec du sable	103
Figure 25 : Concentration en phénanthrène résiduel dans les microcosmes	104
Figure 26 : Nombre de copies du gène codant la petite sous-unité de l'ARN ribosomal 16S.....	105
Figure 27 : Nombre de copies du gène codant une HAP-dioxygénase de bactéries à Gram négatif	106
Figure 28 : Pourcentage du nombre de copies de gène codant une HAP-dioxygénase.....	107
Figure 29 : Analyse par gel TTGE de la structure des communautés bactériennes dans les microcosmes avec et sans PHE	109
Figure 30 : Concentrations en HAP (µg.g ⁻¹) extractibles à l'ASE au dichlorométhane dans les terres contaminées des anciens sites industriels.	119
Figure 31: Concentrations en HAP (µg.g ⁻¹) extractibles à la cyclodextrine dans les terres contaminées des anciens sites industriels.	121
Figure 32 : Suivi de la minéralisation de la terre contaminée de Neuves-Maisons par mesure du ¹² CO ₂	129
Figure 33 : Delta ¹³ C pour mille du carbone de la terre contaminée de Neuves-Maisons	130
Figure 34 : Delta ¹³ C pour mille dans la matière organique extraite de la terre de Neuves-Maisons.....	131
Figure 35 : Concentration en ¹³ C-phénanthrène (µg.g ⁻¹) mesuré en GC-MS dans la terre contaminée de Neuves-Maisons.....	131
Figure 36 : Nombre de copies du gène codant la petite sous-unité de l'ARN ribosomal 16S par microlitre en fonction du gradient de densité de CICs avec ¹³ C-phénanthrène.	132
Figure 37 : Pourcentage du nombre de copies de gène codant une HAP-dioxygénase (GN) dans les microcosmes enrichie en ¹³ C-phénanthrène.	134
Figure 38 : Pourcentage du nombre de copies de gène codant une HAP-dioxygénase (GP) dans les microcosmes enrichie en ¹³ C-phénanthrène.	135
Figure 39 : Analyse par gel électrophorèse TTGE de la structure des communautés bactériennes dans les microcosmes enrichis en ¹³ C-phénanthrène avec et sans exsudats racinaires.....	137
Figure 40 : Arbre phylogénétique basé sur les alignements des séquences de l'ADNr 16S pour les bactéries présentes dans les échantillons de terre de Neuves-Maisons avec du ¹³ C-PHE et avec ¹³ C-PHE+exsudats....	138

Liste des tableaux

Tableau 1: Diversité des genres bactériens en fonction des HAP dégradés.....	17
Tableau 2 : Diversité des gènes de dégradation des HAP décrits dans la littérature.....	18
Tableau 3 : Composition chimique des exsudats racinaires en sucres, acides organiques et acides organiques.....	22
Tableau 4 : Caractéristiques agronomiques, physico-chimiques des sols contaminés étudiés.	33
Tableau 5 :Teneurs en hydrocarbures aromatiques polycycliques des sols contaminés étudiés.	34
Tableau 6 : Concentration des HAP (mg.kg ⁻¹) extraites au butanol à partir de la terre de Neuves-Maisons.....	49
Tableau 7 : Gradient d'acétonitrile pour l'éluion des HAP.....	53
Tableau 8 : Longueur d'onde (nm) d'excitation du détecteur UV couplé à l'HPLC.....	53
Tableau 9 : Gradient de méthanol pour l'éluion des HAP par HPLC.....	53
Tableau 10 : Amorces utilisées pour la PCR en temps réel.....	58
Tableau 11 : Mélange réactionnel pour la PCR en temps réel.	59
Tableau 12 : Programme d'amplification de la PCR en temps réel.....	59
Tableau 13 : Mélange réactionnel pour la PCR avec la "queue GC".	60
Tableau 14 : Cycle PCR en présence d'une "queue GC"	61
Tableau 15 : Composition du gel d'acrylamide pour l'électrophorèse TTGE.....	61
Tableau 16 : Age des plantes en fonction du temps d'incubation des compartiments latéraux (semaines) des 6 séries d'échantillons utilisées.	65
Tableau 17 : Identification des espèces bactériennes de la série 13/3 sem.....	74
Tableau 18 : Rapport du nombre de copies des gènes dans les sections rhizosphériques (0-3) et non plantées.....	77
Tableau 19 : Modalités et effectifs des compartiments latéraux contenant de la terre contaminée de Neuves-Maisons sans (NM) et avec phénanthrène (NM+PHE).....	82
Tableau 20 : Pourcentage du nombre de copies de gènes HAP-dioxygénases GN et GP par rapport au nombre de copies du gène ARNr 16S pour le sol de Neuves-Maisons sans (a) et (b) avec ajout de phénanthrène.	90
Tableau 21 : Rapport du nombre de copies des gènes dans les sections rhizosphériques (0-3) et non plantées (R/S) sans(NM) et avec (NM+PHE) ajout de phénanthrène.	96
Tableau 22 : Modalités effectuées et temps d'incubation (jours) pour les microcosmes avec du sable.....	100
Tableau 23 : Concentrations des acides organiques et des éléments minéraux ajoutés dans la poudre d'exsudats racinaires lyophilisés	101
Tableau 24 : Identification par séquençage et comparaison avec la banque de données NCBI des fragments d'ADN codant pour la petite sous-unité 16S de l'ARNr.....	109

Tableau 25 : Concentrations des acides organiques et des éléments minéraux dans la poudre d'exsudats racinaires lyophilisés à T0 (mg.g^{-1} d'exsudats racinaires).....	117
Tableau 26 : Concentrations en HAP de la terre Elf ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de terre) dans la solution du sol et dans les extraits à la cyclodextrine avec et sans exsudats racinaires.	122
Tableau 27 : Répartition des HAP en fonction de leurs nombres de cycles aromatiques dans les extraits au dichlorométhane (i) et à la cyclodextrine (ii) et répartition relative des HAP extraits à la cyclodextrine par rapport aux HAP extraits au dichlorométhane (iii).....	125

Liste des annexes

Annexe 1 : Concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles sous pression à l'hexane (ASE) dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons dans les sections rhizosphériques (0-3, 3-6 et 6-9 mm) et non plantées (NP).....	153
Annexe 2 : Concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles sous pression à l'hexane (ASE) dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons avec ajout de phénanthrène dans les sections rhizosphériques (0-3, 3-6 et 6-9 mm) et non plantées (NP).....	154
Annexe 3: Concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles à la cyclodextrine dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons sans (a) et avec (b) ajout de phénanthrène (dans les sections rhizosphériques (0-3 mm) et non plantées (NP).....	155
Annexe 4 : Test de Newman-Keuls sur les concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles à la cyclodextrine dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons avec et sans phénanthrène dans les sections rhizosphériques (0-3 mm) et non plantées (NP)..	156
Annexe 5 : Concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles sous pression au dichlorométhane (ASE) dans les terres contaminées des anciens sites industriels de (a) Neuves-Maisons, (b) Homécourt et (c) Elf	157
Annexe 6 : Concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles à la cyclodextrine dans les terres contaminées des anciens sites industriels de (a) Neuves Maisons, (b) Homécourt et (c) Elf au début de l'expérience	158
Annexe 7 : Test de Newman-Keuls sur les concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles à la cyclodextrine dans les microcosmes contenant les terres de Neuves-Maisons (NM), Homécourt (Hom) et Elf	159
Annexe 8 : Concentrations en HAP de la terre de Elf ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de terre) dans la solution du sol (a) et dans les extraits à la cyclodextrine (b) après 4 heures d'incubation	160
Annexe 9 : Test de Newman-Keuls sur les concentrations en HAP de la terre Elf ($\mu\text{g.g}^{-1}$) dans la solution du sol après 4 heures d'incubation et dans les extraits à la cyclodextrine.	161
Annexe 10 : Concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles sous pression au dichlorométhane (ASE) dans la terre de Neuves-Maisons après un ajout de ^{13}C -phénanthrène.....	162

Listes des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNr : Acide DésoxyriboNucléique ribosomique
ANOVA : Analyse de la variance
APS : Ammonium PerSulfate
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique
ASE : Accelerated Solvent Extraction, extraction accélérée par solvant
BH : Bushnell-Haas
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
Bp : Paire de Base
BSA : Sérum d'Albumine Bovine
CRPG : Centre de Recherche Pétrographiques et Géochimique
CT : Cycle Threshold
CTAB : CetylTrimethylAmmonium Bromide
DcM : Dichlorométhane
DMSO : DiMéthylSulfOxide
dNTP : DésoxyNucléoside TriPhosphate
EA-IRMS : Elemental analyzer - isotopic ratio mass spectrometer
EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EPA : Environmental Protection Agency
ETM : Eléments en Traces Métalliques
G2R : Laboratoire Géologie et Gestion des Ressources minérales et énergétiques
GC-FID : Gas Chromatography - Flame Ionization Detector
GC-MS : Gas Chromatography - Mass spectrometry
GISFI : Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HAP-diox : HAP - dioxygénase
HPLC : High Performance Liquide Chromatography
ICP-AES : Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry
Kow : coefficient de partage octanol/eau
LIMOS : Laboratoire des Interactions Microorganismes Minéraux Matière Organique dans les Sols
L.Q. : Limite de Quantification
MDS : analyse multidimensionnelle
MeOH : Méthanol
MO : Matière Organique
NB : Nutrient Both
N.D. : Non Déterminé
NDO : Naphtalène DiOxygénase
NPP : Nombre le Plus Probable
PAH-RHD α : Polycyclic Aromatic Hydrocarbon - Ring Hydroxylating Dioxygenase α
PCB : Peedee Belemnite
PCB : PolyChloro-Byphényles
PCR : Polymerase Chain React

Listes des abréviations (suite)

PLE : Extraction liquide sous pression
pH : Potentiel Hydrogène
PVPP : Polyvinylpyrrolidone
RPM : Rotation par minute
R/S : rapport Rhizosphérique / Sol
SDS : Sodium Dodecyl Sulphate
TAE : Tris base 2 M, Acide acétique glacial 1 M, EDTA pH = 8,50 mM
Taq polymerase : Thermophilus aquaticus polymerase
TEMED : N, N, N, N, TEtraMethylEthyleneDiamine
Tm : Température de dénaturation
TTGE : Temporal Temperature Gradient Electrophoresis
UV : Ultra Violet

Liste des abréviations des hydrocarbures aromatiques polycycliques

NAP : Naphtalène
ACY : Acénaphtylène
ACT : Acénaphène
FLO : Fluorène
PHE : Phénanthrène
ANT : Anthracène
FLA : Fluoranthène
PYR : Pyrène
B(a)ANT : Benzo[a]anthracène
CHY : Chrysène
B(b)FLA : Benzo[b]fluoranthène
B(k)FLA : Benzo[k]fluoranthène
B(a)PYR : Benzo[a]pyrène
dB(a,h)ANT : Dibenzo[a,h]anthracène
B(ghi)PER : Benzo[g,h,i]pérylène
ind-PYR : Indéno(1,2,3-c,d)pyrène

Introduction

Les révolutions industrielles, qui ont marqué les 18^{ème} et 19^{ème} siècles, ont été basées sur l'utilisation du charbon et du pétrole, deux roches carbonées qui ont emprisonné au cours de leurs formations des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les concentrations en HAP peuvent être extrêmement élevées autour des zones d'extraction, de purification ou d'utilisation. Les HAP font partie des polluants à surveiller dans le cadre de la directive européenne n°96/62/CE du 27 septembre 1996 et certains sont reconnus cancérogènes. En France, les sites pollués par les HAP représentent 17,8 % des 4033 sites pollués répertoriés par le Ministère de l'Ecologie de l'Energie du Développement Durable et de la Mer sur la base de données BASOL en 2010. La région Lorraine, dont l'industrie (sidérurgies, cokeries et de nombreuses petites industries) a été fleurissante jusque dans le début des années 1980, présente 93 sites pollués par les HAP dont certains sont aujourd'hui laissés à l'abandon. Dans ce contexte, la région Lorraine soutient des projets interdisciplinaires contribuant à résoudre les questions liées aux pollutions notamment via un Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (GISFI). Le Laboratoire des Interactions Microorganismes Minéraux Matière Organique dans les Sols (LIMOS) est un des partenaires du GISFI. Les recherches au LIMOS concernent plus spécifiquement des questions relatives au devenir des HAP dans la rhizosphère en relation avec les microorganismes.

C'est dans ce contexte qu'a été effectuée cette thèse au LIMOS, afin d'approfondir les connaissances sur les interactions sol-plante-bactéries-HAP qui conditionnent le devenir de ces polluants dans la rhizosphère, en s'intéressant aux bactéries impliquées dans la dégradation et à la biodisponibilité des HAP.

Le manuscrit de cette étude s'articule en différents chapitres dont le premier est une synthèse bibliographique des connaissances sur les HAP, leurs interactions avec le sol, les bactéries dégradant les HAP et une attention particulière a été portée à l'environnement de la rhizosphère. Ce chapitre conduit à la présentation des objectifs de la thèse. Un chapitre est consacré aux matériels et méthodes utilisés pour mener à bien cette étude et les chapitres suivants regroupent les résultats et discussions de cinq expériences réalisées au cours de cette thèse. Le dernier chapitre porte sur une discussion générale comprenant les limites de l'étude et des perspectives de recherche. Deux de ces chapitres font fait l'objet de publications qui sont actuellement soumises.

1. Synthèse bibliographique

La dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans la rhizosphère est un processus qui implique la biologie, la microbiologie et la pédologie. Cette synthèse bibliographique tente de réunir les connaissances nécessaires pour comprendre les interactions entre les HAP, le sol, les plantes et les microorganismes.

1.1. Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés ubiquistes et toxiques qui figurent sur la liste des polluants prioritaires de l'agence américaine de la protection de l'environnement (Keith et Telliard, 1976). Ces polluants récalcitrants sont aussi répertoriés comme des composés néfastes pour l'homme et l'environnement par l'Organisation Mondiale de la Santé et la Communauté Européenne.

1.1.1. Structures moléculaires et propriétés chimiques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure des molécules comprend au moins deux cycles aromatiques condensés. Les hydrocarbures aromatiques sont aussi appelés arène. Leur masse moléculaire varie de 100 à 400 g.mol⁻¹. La stabilité chimique des HAP est liée à la présence de systèmes d'électrons π conjugués. La liaison π entraîne une rigidité moléculaire, laquelle casse facilement et se prête à des transformations diverses (Bohme, 1992). Il existe plusieurs dizaines de HAP initiés par des réactions d'addition au niveau des sites d'insaturations et/ou à des réactions de substitution de l'hydrogène par un autre groupement fonctionnel. La dégradation des composés initiaux, généralement par oxydation, entraîne la formation des métabolites. Le naphthalène (C₁₀H₈) est le plus simple et le plus léger des HAP. Le phénanthrène (C₁₄H₁₀) est un HAP à trois cycles (Figure 1). Le coronène (C₂₄H₁₂) et l'ovalène (C₃₂H₁₄) forment les arènes les plus lourds et les plus stables.

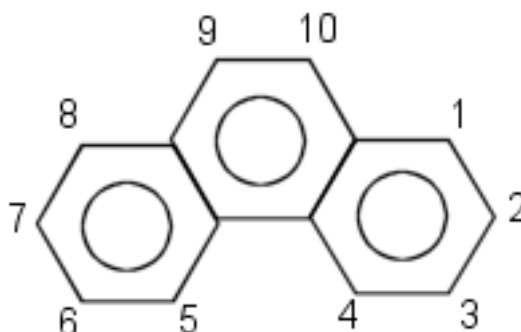


Figure 1 : Formule développée de la molécule de phénanthrène (C₁₄H₁₀).

Les propriétés physico-chimiques des HAP déterminent leurs comportements dans l'environnement. Les HAP sont des composés neutres et hydrophobes. La solubilité des HAP dans l'eau se situe entre 1 et 30 mg.L⁻¹ pour les plus légers et jusqu'à moins de 1 µg.L⁻¹ pour les HAP les plus lourds. À l'inverse, la solubilité des HAP est très importante dans les phases organiques (solvants apolaires, matières grasses). Le coefficient de partage octanol/eau (Log Kow) est une mesure de la solubilité des composés chimiques. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophobe des HAP. Les valeurs de Log Kow pour les HAP usuels sont comprises entre 3 et 8 (Miller *et al.*, 1985). Les HAP sont à l'état solide à 20°C, ils ont des points d'ébullition compris entre 200°C et plus de 500°C et des points de fusion compris entre 80°C et plus de 400°C. La pression de vapeur saturante est relativement faible (naphtalène, 4 Pascals), elle diminue rapidement à mesure que la masse moléculaire augmente.

1.1.2. Toxicité et effets cancérigènes

De nombreuses études démontrent la toxicité des HAP pour l'environnement et pour la santé humaine. Les propriétés hydrophobes ou lipophiles entraînent leur bioconcentration dans la chaîne alimentaire, notamment dans les tissus lipidiques (Marsili *et al.*, 2001). Les HAP ne sont pas directement actifs, mais à la faveur d'une remobilisation par l'organisme, des réactions de détoxification conduisent à la formation de métabolites génotoxiques (Slater, 1984; Kleinow *et al.*, 1998). Les monooxygénases microsomiales du cytochrome P-450, enzyme responsable de la détoxification chez les mammifères, introduisent un atome d'oxygène dans le cycle aromatique pour former un métabolite électrophile et hydrosoluble (Shou *et al.*, 1996; Szeliga et Dipple, 1998). La toxicité du benzo(a)pyrène est en partie liée au pouvoir cancérigène de l'un de ses métabolites, le benzo(a)pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10 époxyde (Koreeda *et al.*, 1976; Meehan et Bond, 1984). Les métabolites se fixent par liaison covalente sur les acides nucléiques ainsi que sur les protéines pour former des adduits. La modification de la molécule d'ADN entraîne une distorsion dans la structure hélicoïdale, perturbant sa transcription ce qui induit un dérèglement du processus de division cellulaire et peut conduire à la formation de tumeurs (Szeliga et Dipple, 1998; Lin *et al.*, 2001). Le benzo(a)pyrène (BaP) est le plus connu et le plus étudié des HAP pour sa toxicité avérée. Certains de ses dérivés seraient impliqués dans le développement de cancers du poumon par la formation d'adduits avec l'ADN, notamment au niveau du gène p53 (Tapiainen *et al.*, 1996; DeMarini *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2001; Pfeifer *et al.*, 2002). La protéine p53 joue de nombreux rôles dans la transcription des gènes et dans l'apoptose.

1.1.3. Sources et distribution dans l'environnement

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des composés ubiquistes pouvant être d'origines naturelles ou anthropiques. Ils sont principalement issus de la combustion incomplète de la matière organique. Ils sont ainsi formés lors des feux de forêts (Kim *et al.*, 2003; Mandalakis *et al.*, 2005) et de la combustion des produits pétroliers notamment par les véhicules diesel (Schauer *et al.*, 1996; Bucheli *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2007). Les produits de combustion à usage domestique tels que le charbon et le bois contribuent à l'augmentation de la teneur en HAP dans les environnements urbains (Schauer *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2007). Les usines comme les raffineries et les incinérateurs produisent une quantité importante de polluants à la sortie des fours, lesquels se déposent dans le proche environnement (Bakker *et al.*, 2000; Besombes *et al.*, 2001). La fusion réductrice de l'alumine pour la production d'aluminium libère une quantité importante de HAP (Wilcke *et al.*, 1996).

Du fait de leurs propriétés physico-chimiques, les HAP se répartissent dans les phases gazeuses et particulaires (Ligocki et Pankow, 1989; Gundel *et al.*, 1995). Les HAP ont une faible pression de vapeur dans l'air, mais les plus légers sont considérés comme semi-volatiles. Le comportement des HAP dans l'atmosphère tend à les faire s'adsorber à la surface des particules fines (Pierce et Katz, 1975). Ils s'adsorbent sur des particules minérales, magnétiques ou carbonées contenues dans les cendres et la suie (Griest et Tomkins, 1986). Cette partition gaz-particule influe sur le transport et la réactivité des HAP. Les HAP sont déposés sur le sol sous forme de dépôt sec ou à la faveur d'événements pluvieux (van Noort et Wondergem, 1985). Les saisons ou les phénomènes climatiques comme la mousson influent sur les teneurs atmosphériques en HAP (Guo *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2007).

Chaque source de production favorise la formation de composés spécifiques (Schauer *et al.*, 1996; Soclo *et al.*, 2000). Les différentes proportions d'arènes signent leurs origines. Ainsi un rapport indéno[1,2,3-cd]pyrène / (indéno[1,2,3-cd]pyrène+ benzo[ghi]perylène) inférieur à 0,2 est le signe d'une source pétrogénique, alors qu'un rapport supérieur correspond à une source pyrolytique (Colombo *et al.*, 1989; Bucheli *et al.*, 2004). La caractérisation des HAP permet de diagnostiquer les sources des polluants. Du fait de leur stabilité dans les sols et les sédiments, les HAP peuvent être utilisés comme marqueurs moléculaires (Sanders *et al.*, 1995; Yunker et Macdonald, 2003; Bucheli *et al.*, 2004).

Les HAP peuvent aussi être synthétisés lors de processus de diagenèse en même temps que les énergies fossiles (charbon, pétrole). Ces formations se produisent à des températures relativement basses (50-150°C) lors de l'enfouissement de la matière organique dans les bassins sédimentaires (Colombo *et al.*, 1989; Soclo *et al.*, 2000) et les HAP sont donc présents naturellement dans les produits pétroliers (Cahnmann, 1955). Ils peuvent être transférés accidentellement dans l'environnement lors de fuites de pétrole, de goudron de houille (sous-produit du charbon). La pollution induite est localisée, mais les concentrations rencontrées dans ces sites pollués sont très élevées.

1.2. HAP dans les sols

Le sol est un système hétérogène et complexe à l'interface entre la géosphère, l'atmosphère et la biosphère. Les HAP dans les sols peuvent interagir avec les constituants minéraux, organiques, les organismes vivants, la phase gazeuse et la phase liquide. De par ses caractéristiques physico-chimiques et biologiques, le sol est structuré en horizons. Lors de l'installation de sites industriels et du remaniement des terres, les procédés pédologiques intègrent les matières anthropiques et créent de nouvelles associations organo-minérales (Monserie *et al.*, 2009). Ces technosols ne font plus apparaître de structure en horizons des sols (Figure 2).

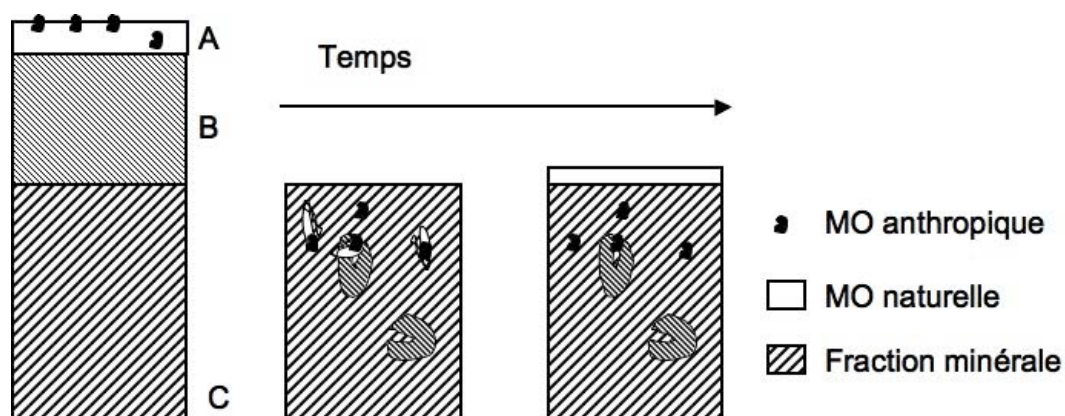


Figure 2 : Evolution d'un sol brun structuré en trois horizons (A, B et C) remanié en technosol.

1.2.1. L'atmosphère et la solution du sol

De par leur faible pression de vapeur saturante, la fraction de HAP dans l'atmosphère du sol semble marginale. La solution du sol comprend l'ensemble des éléments dissous dans la phase aqueuse notamment les minéraux mais aussi le carbone organique. Les acides fulviques et humiques sont solubles dans la phase aqueuse et représentent une partie du carbone organique dissous. Les acides humiques peuvent contribuer à l'adsorption du benzo(a)pyrène (Zhang *et al.*, 2009). Le carbone organique dissous dans la fraction aqueuse du sol entre en compétition avec l'humine pour l'adsorption du phénanthrène (Luo *et al.*, 2008) mais de par leurs caractères hydrophobes, les HAP sont présents en faible concentration dans la solution du sol et restent préférentiellement adsorbés à la fraction solide du sol.

1.2.2. La fraction minérale

La fraction minérale est principalement constituée de minéraux primaires (quartz, feldspaths, micas) et de minéraux secondaires, comme les oxydes métalliques (goethite, hématite) et les phyllosilicates (Duchaufour, 1983). Le mécanisme d'adsorption des HAP sur les minéraux dépend principalement de la surface spécifique

bien que marginalement des interactions électrostatiques puissent permettre la sorption du pyrène sur l'hématite (Hur et Schlautman, 2004). Ainsi les phyllosilicates (ou argiles) participent significativement à l'adsorption des HAP (Hundal *et al.*, 2001; Hwang et Cutright, 2002; Luo *et al.*, 2008). Les phyllosilicates sont des silicates dans lesquels des tétraèdres de SiO₄ forment des empilements de feuillets. L'organisation en feuillets développe une surface spécifique importante et laisse un espace interfoliaire qui peut atteindre 100 Angströms, ce qui confère aux argiles des propriétés de confinement. Dans leur étude, Hwang et Cutright (2002) montrent que les argiles (smectite et vermiculite) ont une contribution équivalente à la matière organique dans l'adsorption du pyrène. Les charges de surface des argiles et les phénomènes d'hydratation de l'espace interfoliaire des smectites ne semblent pas être les mécanismes responsables de la sorption du phénanthrène dans la phase aqueuse. Mais la faible épaisseur de l'espace interfoliaire semble permettre au phénanthrène de quasiment se cristalliser et de rester ainsi piégé dans le phyllosilicate (Hundal *et al.*, 2001). Cependant, l'adsorption des HAP par les phyllosilicates reste faible en comparaison de la matière organique (Celis *et al.*, 2006; Pignatello et Xing, 1996).

1.2.3. Matière organique naturelle

Les matières organiques naturelles du sol sont essentiellement localisées dans les horizons superficiels du sol (0-20 cm). Les taux de matière organique naturelle varient de 0.5 à 2% de la masse de sol. La matière organique est constituée principalement par la décomposition des végétaux. Les végétaux sont constitués de divers composés dont la cellulose, la lignine, la cutine. Les sucres sont très aisément dégradés par les microorganismes alors que certains composés riches en groupements aliphatiques et/ou aromatiques peuvent avoir une durée de vie très longue. Ces groupements polaires, aliphatiques et aromatiques se condensent pour former l'humus constitué de carbone (50 %), d'hydrogène (5 %) et d'azote (1,5 %) (Duchaufour, 1983).

1.2.3.1. Groupements polaires

La polarité des humus a un effet négatif sur l'adsorption des HAP. Les fractions d'acide humique et d'humine ayant une faible polarité présentent des capacités d'adsorption du phénanthrène plus fortes que les fractions plus polaires (Kang et Xing, 2005). La forte polarité de la cellulose lui confère une faible capacité de sorption des composés aromatiques comme le benzène ou les HAP (Jonker, 2008; Rutherford *et al.*, 1994).

1.2.3.2. Groupements aliphatiques

Un groupement aliphatique est un ensemble d'atomes de carbone formant une chaîne linéaire saturée ou non. L'humine contient plus de 60 % de carbone aliphatique (Gunasekara et Xing, 2003). Les groupements aliphatiques présents dans les molécules humiques augmentent le coefficient de partage octanol/eau (Kow).

Ces groupements ont un rôle important dans l'adsorption des HAP sur l'humus (Chefetz *et al.*, 2000; Salloum *et al.*, 2002; Gunasekara et Xing, 2003). Les isothermes d'adsorption du phénanthrène montrent que celle-ci augmente avec le nombre de groupements aliphatiques des substances humiques (Kang et Xing, 2005). Ainsi la teneur en groupements aliphatiques de l'humine augmente la capacité de sorption du phénanthrène par rapport aux acides humiques (Kang et Xing, 2005).

La cutine est une molécule lipidique présente dans la cuticule qui recouvre la face externe des cellules épidermiques aériennes chez les végétaux. La cutine est un polymère d'acides carboxyliques, principalement aliphatiques en C16 et C18, composé d'hydroxy et d'époxy acides. Lors des processus d'humification, l'humine hérite de ces groupements aliphatiques. Les chaînes aliphatiques condensées créent des structures microporeuses de tailles nanométriques capables de piéger les molécules aromatiques. Ces structures créent une isotherme de sorption non-linéaire, et sont capables d'adsorber une grande quantité de HAP (Chefetz *et al.*, 2000; Gunasekara et Xing, 2003).

1.2.3.3. Groupements aromatiques

Les groupements aromatiques représentent environ 10% du carbone de l'humine (Gunasekara et Xing, 2003). Ils proviennent des parois pectocellulosiques des cellules végétales notamment des lignines. Les lignines sont des polymères de monolignols regroupant de nombreux composés aromatiques dont l'alcool coniférylique, l'alcool sinapylique et l'alcool para-coumarylique. Les acides humiques et l'humine sont constitués de réseaux de noyaux aromatiques faiblement condensés. Les groupements phénoliques et les acides carboxybenzoïques sont liés entre eux par des liaisons hydrogènes et des forces de van der Waals, lesquelles créent des "liaisons hydrophobes" (Riffaldi et Schnitzer, 1972; Gauthier *et al.*, 1987). Ce réseau de groupements aromatiques forme une zone relativement hydrophobe ce qui favorise la pénétration des HAP dans la matrice humique. Les groupements aromatiques des HAP et des substances humiques peuvent s'associer par des liaisons de type ($\pi - \pi$) pour former des molécules condensées (Gauthier *et al.*, 1987; Nanny et Maza, 2001; Wijnja *et al.*, 2004). L'isotherme d'adsorption des HAP est non linéaire, il augmente à mesure de la condensation des substances humiques (Xing et Pignatello, 1997).

1.2.3.4. Complexe argilo-humique

La matière organique et les constituants inorganiques peuvent se lier et former des complexes par l'intermédiaire de cations métalliques (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.) (Schnitzer, 1969). Ces ions permettent aussi de créer des liaisons à l'intérieur de la matière organique en se liant aux groupements carboxyles et phénolates des macromolécules humiques. La structure et la conformation de la matière organique jouent un rôle prépondérant dans l'adsorption des HAP (Bonin et Simpson, 2007; Gunasekara et Xing, 2003; Xing et Pignatello, 1997; Yang *et al.*, 2001). Cette notion de structure de la matière organique renforce le rôle de phyllosilicates dans l'adsorption des HAP par le sol. Les argiles permettent de condenser la matière organique,

ce qui favorise les réarrangements entre les chaînes aliphatiques (Gunasekara et Xing, 2003). Ainsi l'association d'acides humiques sur des argiles (montmorillonite et kaolinite) augmente l'hydrophobicité du complexe organo-minéral lequel favorise l'adsorption du phénanthrène (Wang et Xing, 2005). Le changement de conformation du complexe argilo-humique est favorisé par les groupements aliphatiques, lesquels sont préférentiellement adsorbés par les phyllosilicates. Les groupements carboxyles, carbonyles et aromatiques des molécules humiques restent à l'extérieur du complexe vers la solution du sol. Ce changement de conformation et ce fractionnement de la matière organique augmentent les capacités de sorption du phénanthrène (Wang et Xing, 2005).

1.2.4. Matière organique anthropique

1.2.4.1. Black carbon

Le black carbon correspond à une fraction de carbone élémentaire apparentée aux cendres et aux cristallites de graphite. Ces particules de carbone de taille nanométrique sont généralement structurées en chaînes concentriques composées elles-mêmes de plusieurs couches de particules sphériques agrégées (Ishiguro *et al.*, 1997; Schmidt et Noack, 2000). Le black carbon et les HAP sont formés de manière concomitante lors de la combustion de la matière organique. La structure planaire des HAP semble faciliter leurs arrangements à l'intérieur de la structure du black carbon (Fine *et al.*, 2002; Cornelissen *et al.*, 2004; Lohmann *et al.*, 2005). L'isotherme d'adsorption des HAP artificiellement ajoutés est non linéaire et il n'y a pas de phénomène de compétition pour les sites d'adsorption (Luthy *et al.*, 1997; Accardi-Dey et Gschwend, 2002; Ran *et al.*, 2007). Ainsi les HAP peuvent s'adsorber sur les particules de black carbon à des concentrations extrêmement élevées jusqu'à 11 g.kg^{-1} à partir de cendres issues de feu de forêt (Σ 33 HAP) (Fine *et al.*, 2002) et 15 g.kg^{-1} à partir de cendres de charbon (Wornat *et al.*, 2001). Le temps nécessaire pour que les HAP natifs présents à l'intérieur des cendres puissent être désorbés à 99 % est de l'ordre de plusieurs centaines d'années (Jonker *et al.*, 2005). Les particules carbonées se déposent sur l'horizon supérieur du sol et s'accumulent pour représenter en moyenne 4% du carbone organique total pour des sols naturels et anthropiques (Cornelissen *et al.*, 2005).

1.2.4.2. Phase liquide non-aqueuse

La phase liquide non-aqueuse est formée par des composés organiques notamment le goudron de houille (sous-produit de la fabrication du charbon), lequel regroupe des huiles dites légères (2-8 %), des huiles lourdes (5-10 %), de la créosote (30-50 %) et un résidu appelé brai (20-60 %) (Gosselin, 2000). De nature très hydrophobes, les goudrons de houille renferment de nombreux hydrocarbures aromatiques et notamment des HAP. L'isotherme d'adsorption des HAP sur le phase liquide non-aqueuse est linéaire et l'adsorption des HAP n'est pas compétitive (Luthy *et al.*, 1997). Le coefficient de partage octanol-eau est très élevé. La minéralisation

des HAP natifs et/ou artificiellement contaminés dans les matrices non aqueuses est très faible (Harms et Bosma, 1997; Doick et Semple, 2003; Sandrin *et al.*, 2006).

1.2.5. Phénomène de vieillissement des HAP

Plusieurs études montrent que l'extraction de composés organiques, artificiellement ajoutés dans un sol, diminue au cours du temps sans que le composé soit dégradé. La capacité d'extraction des HAP par des solvants organiques diminue avec l'augmentation du temps de contact des HAP dans le sol (Hatzinger et Alexander, 1995; Kelsey *et al.*, 1997; Guthrie et Pfaender, 1998; Reid *et al.*, 2000; Macleod et Semple, 2003; Allan *et al.*, 2006). Ce phénomène est dû à l'adsorption des composés dans la matrice du sol, notamment par les matières organiques naturelles et anthropiques. L'adsorption dans le sol débute par une phase rapide et relativement réversible puis elle est suivie par une phase de pénétration à l'intérieur de la matrice hydrophobe. Cette seconde phase peut durer plusieurs mois voire plusieurs années, elle correspond au processus de vieillissement (aging effect) (Hatzinger et Alexander, 1995). À noter que le phénomène de vieillissement n'inclut pas les réactions altérant la molécule par des processus physico-chimiques ou biologiques.

1.2.6. Biodisponibilité des HAP du sol

1.2.6.1. Définition et principes de la biodisponibilité

La biodisponibilité d'un composé représente la fraction du composé qui peut être prélevée et/ou transformée par un organisme vivant. La biodisponibilité est déterminée par le taux de transfert du polluant à partir du sol jusqu'à la cellule et des capacités de prélèvement et métaboliques des (micro)organismes (Harms et Bosma, 1997; Semple *et al.*, 2003). La biodisponibilité dépend de nombreux paramètres notamment des organismes et de leurs états physiologiques. Ainsi le phénanthrène n'a pas la même biodisponibilité pour les bactéries et les vers de terre (Liste et Alexander, 2002; Hickman et Reid, 2005). Les caractéristiques physico-chimiques du composé ont une influence directe sur sa biodisponibilité. Les HAP légers comme le naphthalène ou le phénanthrène sont facilement accessibles aux microorganismes alors que les HAP présentant plus de cycles sont moins dégradés (Hwang et Cutright, 2002 b; Liste et Alexander, 2002). Les propriétés du sol, notamment la teneur en matière organique, influent sur la quantité de polluant accessible aux microorganismes (Hickman et Reid, 2005; Vacca *et al.*, 2005; Ehlers et Loibner, 2006). La présence de phases liquides non-aqueuses diminue la minéralisation du phénanthrène par les bactéries (Doick et Semple, 2003). L'augmentation du temps de contact du polluant dans le sol (phénomène de vieillissement) augmente l'adsorption des polluants aromatiques dans le sol et diminue l'accessibilité des composés aux microorganismes (Allard *et al.*, 2000; Hwang et Cutright, 2002 b).

1.2.6.2. Méthodes d'estimation de la biodisponibilité

La mesure de la fraction de HAP disponible pour les organismes vivants peut être estimée par des méthodes physiques ou chimiques d'extraction du polluant. Le principe est que les HAP contenus dans la phase aqueuse du sol vont s'adsorber préférentiellement sur les matrices artificielles. Les HAP sont ensuite élués avec un solvant organique apolaire pour être analysés. Les méthodes physiques d'extraction sur phase solide comprennent des membranes semiperméables, des tubes de dialyse en polyéthylène ou une résine de type Tenax TA (Macrae et Hall, 1998; Leppanen et Kukkonen, 2006). La méthode utilisant le Tenax TA semble adaptée à refléter le prélèvement des HAP par les organismes vivants notamment par les microorganismes (Macrae et Hall, 1998; Smreczak *et al.*, 2008).

L'utilisation de solutions salines ou de surfactants se révèle peu adaptée pour estimer la fraction de HAP potentiellement dégradables lors de traitements des terres pollués (Cuypers *et al.*, 2002; Thiele-Bruhn et Brummer, 2004). L'utilisation de l'eau sous pression sur un sol a été montrée pour extraire la moitié des HAP minéralisables par des bactéries (Hickman et Reid, 2005). Des solvants organiques relativement polaires peuvent permettre de prédire la disponibilité des HAP pour des organismes vivants (Kelsey *et al.*, 1997; Thiele-Bruhn et Brummer, 2004) et de nombreuses études ont focalisé leurs recherches sur l'utilisation du butanol (Liste et Alexander, 2002; Liste et Prutz, 2006). Le butanol semble intéressant pour refléter la fraction prélevée par les vers de terre (Kelsey *et al.*, 1997; Liste et Alexander, 2002) mais il paraît surestimer la fraction de HAP réellement accessible aux microorganismes (Reid *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2004). L'utilisation de cyclodextrine (hydroxypropyl- β -cyclodextrine) semble une méthode adaptée pour prédire la disponibilité des HAP pour les bactéries. Plusieurs études montrent une bonne corrélation entre la quantité de HAP extraite par la cyclodextrine et la quantité de HAP minéralisée par les bactéries (Reid *et al.*, 2000; Cuypers *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2004; Hickman et Reid, 2005; Stokes *et al.*, 2005). La technique utilisant la cyclodextrine semble être plus facile à réaliser que la technique d'extraction sur surface solide (SPE), notamment pour la séparation du sol et de la résine (Cuypers *et al.*, 2002).

1.3. Biodégradation des HAP

De nombreux organismes comme les bactéries, les algues et les champignons sont capables de dégrader les HAP (Cerniglia, 1992). Certaines espèces d'algues, comme *Selenastrum capricornutum*, sont capables de stocker dans leurs biomasses des HAP de haut poids moléculaire notamment le benzo(a)pyrène. Les algues possèdent des enzymes peroxydases dont le rôle principal est de détoxifier la cellule (Kirso et Irha, 1998; Semple *et al.*, 1999; Warshawsky *et al.*, 1995). De nombreuses études ont mis en évidence l'aptitude des champignons lignolytiques (ex: *Fusarium solani*) et non lignolytiques pour dégrader les HAP directement ou par co-métabolisme (Cerniglia, 1997; Colombo *et al.*, 1996; Potin *et al.*, 2004 a). Ces champignons possèdent diverses enzymes à large spectre comme les laccases lesquelles sont capables de dégrader divers HAP (Saparrat *et al.*, 2002; Potin *et al.*, 2004b). Les enzymes fongiques, notamment les peroxydases peuvent produire du peroxyde d'hydrogène. Ces radicaux libres peuvent initier la dégradation du benzo(a)pyrène (Veignie *et al.*, 2004). Cependant, bien que les champignons telluriques présentent une large capacité de dégradation des HAP, le rendement de la dégradation est inférieur à celui des bactéries (Cerniglia, 1997). Les champignons mycorhiziens à arbuscules sont une catégorie particulière de champignons qui vivent en symbiose avec la majorité des végétaux. Ces champignons apportent des nutriments, notamment le phosphore, et de l'eau à la plante. En retour, le champignon reçoit au niveau des racines des sources de carbone facilement disponibles (Bolan, 1991; Jones *et al.*, 2004). Il a été montré que le champignon mycorhizien *Glomus intraradices* cultivé sur des racines transformées pouvait accumuler de l'anthracène dans des vésicules lipidiques (Verdin *et al.*, 2006). De plus, la présence du champignon symbiotique peut augmenter la libération d'enzymes oxydo-réductases par la plante (Criquet *et al.*, 2000). Mais le rôle principal des champignons mycorhiziens est de favoriser la croissance de la plante, ce qui stimule l'ensemble des microorganismes de la rhizosphère dont les bactéries dégradant les HAP (Binet *et al.*, 2000; Joner *et al.*, 2001; Joner et Leyval, 2003; Corgié *et al.*, 2006 c). La biodégradation des HAP en conditions aérobies est prédominante car l'ouverture des cycles aromatiques est initiée par l'incorporation d'oxygène. Cependant, plusieurs genres bactériens sont capables de dégrader des HAP dans des sédiments en conditions anaérobies notamment grâce à la réduction du sulfate (Coates *et al.*, 1996; Coates *et al.*, 1997; Hayes et Lovley, 2002; Rothermich *et al.*, 2002). La réduction du nitrate peut permettre à *Pseudomonas stutzeri* et à *Vibrio pelagius* de dégrader et de minéraliser le naphthalène (Rockne *et al.*, 2000; Dou *et al.*, 2009). Bien que l'oxydation des HAP soit possible en absence d'oxygène par la présence de sulfate et de nitrate, lesquels servent d'accepteurs d'électrons, les rendements de dégradation sont plus faibles qu'en conditions aérobies. La dégradation bactérienne en conditions aérobies, qui implique des HAP-dioxygénases, est détaillée dans les paragraphes suivants.

Dans les milieux complexes comme les sols, et lorsque la minéralisation complète des HAP en CO₂ ne peut pas être montrée, on parle souvent de dissipation et non pas de biodégradation des HAP. La dissipation

peut être définie comme la diminution de la concentration extractible des HAP. Elle peut être liée à des processus de biodégradation, de biotransformation, voire de sorption.

1.3.1. Acquisition des HAP par les bactéries

Les HAP à l'état solide, sous forme de cristaux, ne semblent pas disponibles pour être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les bactéries (Wodzinski et Bertolini, 1972; Wodzinski et Coyle, 1974; Volkering *et al.*, 1992). Seuls les HAP dissous dans la phase aqueuse sont capables de pénétrer à l'intérieur de la cellule pour être catalysés par des enzymes intracellulaires. Ainsi la croissance des bactéries dégradantes ne dépend pas de la quantité de naphthalène ou de phénanthrène solide présent dans le milieu de culture mais de la quantité dissoute dans la solution aqueuse (Wodzinski et Bertolini, 1972; Wodzinski et Coyle, 1974). Néanmoins, la surface spécifique des composés aromatiques joue un rôle important dans la dissolution spontanée, ce qui favorise à terme la minéralisation des HAP par les bactéries (Thomas *et al.*, 1986). L'utilisation d'un microscope électronique à balayage montre de petits cratères laissés par les bactéries à la surface des cristaux d'anthracène (Wick *et al.*, 2002). Lorsque la quantité d'anthracène solide dans le milieu de culture est faible, *Mycobacterium sp.* est capable de développer un biofilm à la surface, ce qui optimise sa dissolution. La distance entre les bactéries et les cristaux est inférieure à 1 μm . Une fine couche d'eau reste dans l'espace intermédiaire dans laquelle la concentration d'équilibre de l'anthracène est atteinte (45-62 $\mu\text{g.L}^{-1}$). La surface de la bactérie présente une forte affinité pour le composé organique, ce qui diminue localement la concentration du polluant par rapport à la concentration dans le milieu, et favorise le taux de transfert de l'anthracène vers la bactérie pour entraîner à nouveau la dissolution de l'anthracène (Wick *et al.*, 2002).

Le mécanisme de prélèvement des HAP par les bactéries semble un processus de diffusion passif lié à la nature lipidique de la membrane cytoplasmique (Sikkema *et al.*, 1995; Bugg *et al.*, 2000; Hori *et al.*, 2009). L'inhibition des protéines membranaires ne modifie pas le prélèvement de phénanthrène par *Pseudomonas fluorescens* (Bugg *et al.*, 2000). Les protéines de transport de la membrane externe et les protéines plasmiques ne semblent pas avoir de rôle dans le prélèvement des HAP. À l'inverse, il semble qu'elles permettent l'efflux actif en dehors de la cellule des polluants dont le phénanthrène et le fluoranthène (Bugg *et al.*, 2000). Les propriétés de surface de l'enveloppe bactérienne, dont le caractère hydrophobe, sont affectées par plusieurs paramètres liés à l'environnement de la cellule. L'augmentation de la température de 28°C à 37°C de *Pseudomonas sp.* TIS1-127 entraîne une variation de l'hydrophobicité, ce qui implique une diminution de l'acquisition du toluène (Hori *et al.*, 2009). La nature du substrat de croissance peut aussi affecter les propriétés de surface de *Mycobacterium sp.* (Wick *et al.*, 2002). Lorsque le substrat est le glucose, la surface des cellules est plus hydrophile et moins électronégativement chargée que dans le cas où les bactéries ont poussé sur l'anthracène, lesquelles adhèrent mieux sur les surfaces hydrophobes.

1.3.2. Mécanisme d'action des arènes dioxygénases

Plusieurs types d'enzymes sont capables de dégrader les composés aromatiques, mais les dioxygénases sont les plus fréquentes chez les bactéries (Cerniglia, 1992). À l'intérieur de la cellule, les HAP sont catalysés par une métallo-enzyme de type arène dioxygénase. La réaction requiert des conditions aérobies pour incorporer deux atomes d'oxygène par hydroxylation à deux carbones adjacents du cycle aromatique (Jerina *et al.*, 1976; Boyd et Sheldrake, 1998). À partir d'une co-enzyme d'oxydoréduction de type NAD(P)H,H⁺, un transfert d'électron est réalisé pour activer l'oxygène et permettre ainsi la réaction de dihydroxylation du substrat-HAP (Figure 3). Le complexe de la HAP-dioxygénase comprend trois entités dont une ferredoxine et une NADPH-ferredoxine réductase (Haigler et Gibson, 1990). Une troisième partie correspond à une oxygénase terminale avec une protéine hydroxylase (dite Iron-Sulfure-Protein, ISP), laquelle comprend deux sous-unités (α et β). La sous-unité α contient un site actif d'atome de fer et de soufre formant le domaine Rieske [2 Fe – 2 S] et un domaine catalytique contenant un atome de fer mononucléaire (Fe³⁺) (Kauppi *et al.*, 1998). La taille tridimensionnelle de cette région, relativement hydrophobe grâce à une boucle d'acides aminés notamment composée de phénylalanine, semble jouer un rôle important dans l'acquisition de HAP de plus ou moins grand poids moléculaire (Jouanneau *et al.*, 2006; Jakoncic *et al.*, 2007).

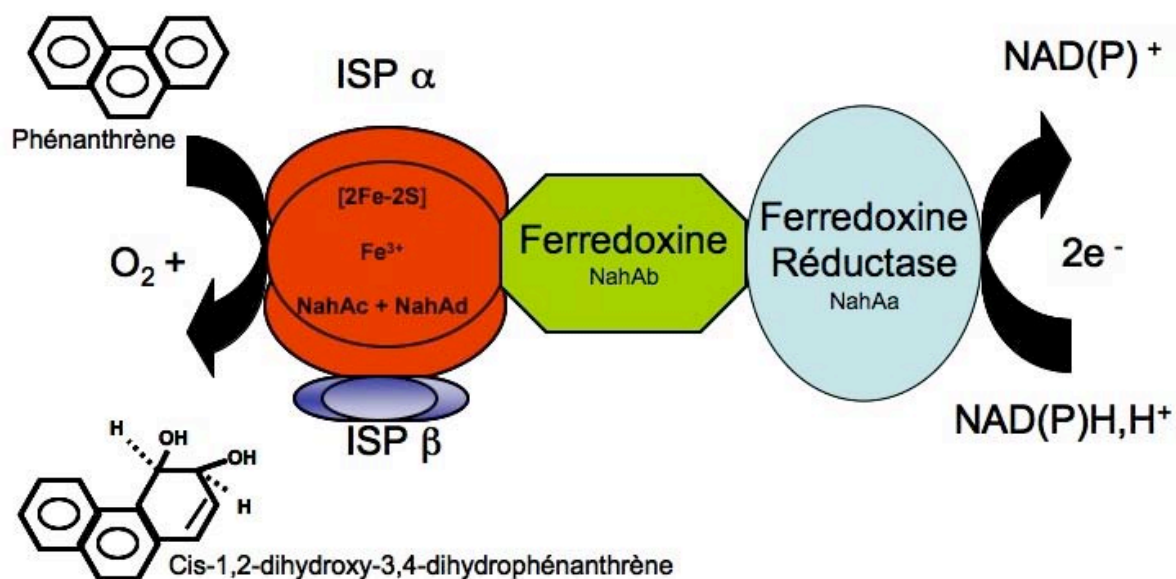


Figure 3 : Schéma fonctionnel de l'oxydation du phénanthrène en cis-1,2-dihydroxy-3,4-dihydrophénanthrène par une HAP-dioxygénase.

1.3.3. Voies métaboliques de dégradation

Les voies de dégradation des HAP, comme le naphthalène et le phénanthrène, ont été largement étudiées depuis de nombreuses années (Treccani *et al.*, 1954; Davis et Evans, 1964; Evans *et al.*, 1965). À partir du phénanthrène et de la dihydroxylation du cycle aromatique par une enzyme dioxygénase, il existe à l'intérieur de la bactérie une succession de réactions cataboliques chacune synthétisée par une enzyme spécifique, lesquelles produisent de nombreux métabolites dont le 1-hydroxy-2-naphtoate et le phthalate (Kiyohara et Nagao, 1978; Seo *et al.*, 2006). La dégradation des composés aromatiques fournit des intermédiaires du cycle de Krebs (pyruvate, succinate, etc.) et produit de l'énergie pour la bactérie (Figure 4). Au fur et à mesure des réactions, le nombre de carbone du polluant diminue, le déchet ultime est le dioxyde de carbone, lequel est rejeté à l'extérieur de la bactérie.

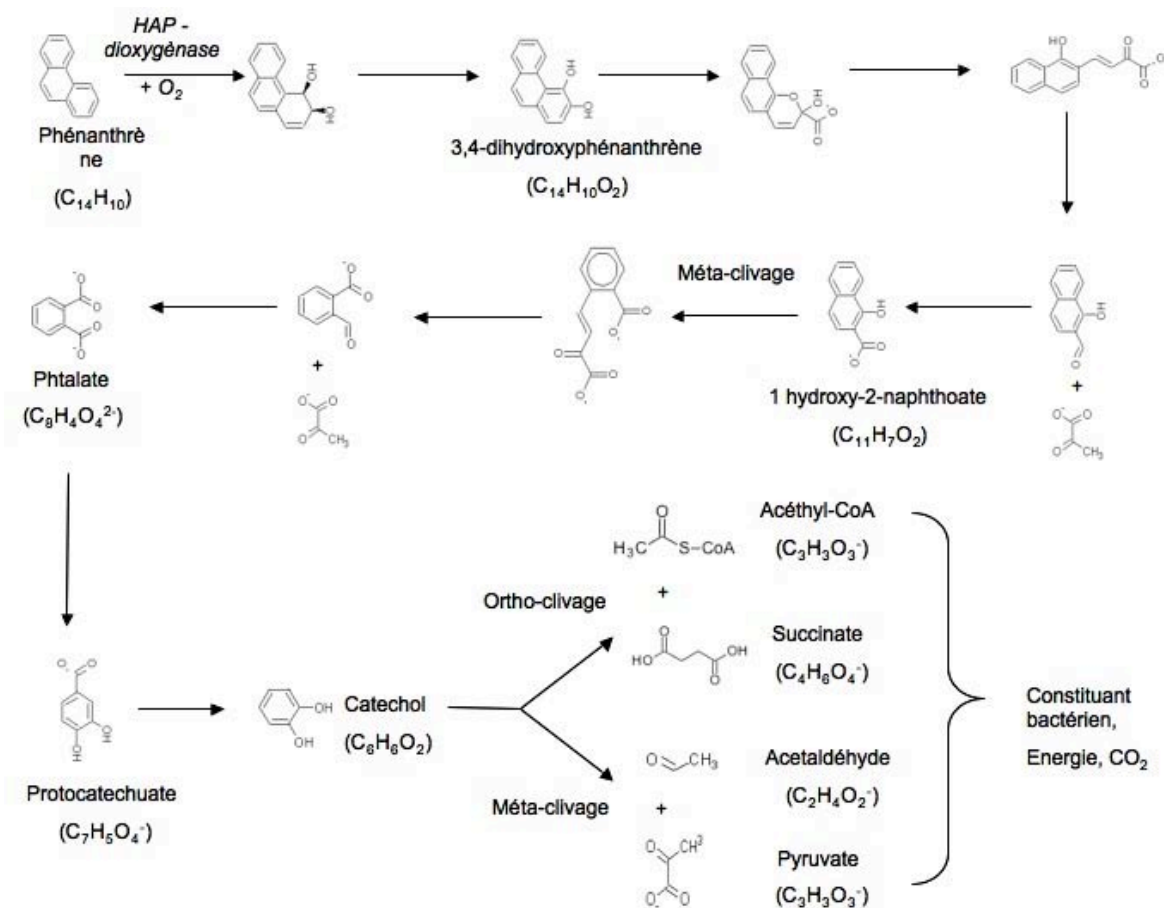


Figure 4: Voie de dégradation bactérienne du phénanthrène (*Pseudomas sp.* 47 p1, s7k5) d'après la base de données Biocatalysis/biodegradation (Université du Minnesota).

1.3.4. Localisation des gènes codant les HAP-dioxygénases

Les gènes codant les arènes dioxygénases peuvent être portés sur le chromosome bactérien ou sur des plasmides (Yen et Gunsalus, 1982; Zuniga *et al.*, 1981; Kasai *et al.*, 2003; Kiyohara *et al.*, 1994). Les gènes présents sur les chromosomes peuvent résulter de la recombinaison des plasmides (Romine *et al.*, 1999). Les plasmides sont dits plasmides d'incompatibilité P-9 (IncP-9). Des plasmides d'incompatibilité de la même famille ne peuvent coexister dans la même cellule à la génération suivante car leurs systèmes de régulation sont identiques. Chaque plasmide porte l'ensemble des gènes codant les voies de dégradation d'un composé aromatique. Il existe de nombreux plasmides possédant des gènes codant pour des enzymes de dégradation, comme pDTG1, NAH7 ou pWW0, ces derniers présentent de fortes similarités au niveau de l'organisation des gènes (Dennis et Zylstra, 2004). Les plasmides possédant les gènes de dégradation peuvent être échangés entre les bactéries par des transferts horizontaux (Dunn et Gunsalus, 1973; Yen et Gunsalus, 1982). Cette capacité d'échange suggère que sous la pression de sélection de l'environnement, comme dans le cas d'une contamination aux hydrocarbures, les bactéries sont capables d'acquérir du matériel génétique puis d'initier l'ouverture des cycles aromatiques. Les mécanismes de conjugaison sont supposés être à l'origine de l'ubiquité des gènes de dégradation dans les écosystèmes. (Ligocki et Pankow, 1989; Stuart-Keil *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2003; Ni Chadhain *et al.*, 2006).

1.3.5. Régulation de l'expression des gènes codant les HAP-dioxygénases

De nombreuses études montrent qu'il existe des mécanismes de régulation dans l'expression des HAP-dioxygénases. La présence de salicylate ($C_7H_6O_3$), qui est un produit du procatéchuate, induit la formation de l'enzyme HAP-dioxygénase. À l'inverse, la présence de succinate ($C_4H_6O_4$) réprime l'induction des gènes codant l'enzyme (Shamsuzzaman et Barnslez, 1974; Barnslez, 1976). En effet, les gènes codant pour une HAP-dioxygénase sont organisés en deux opérons très proches, de type *nah* et *sal*. L'opéron *sal* code les enzymes nécessaires à la dégradation du salicylate jusqu'au précurseur du cycle de Krebs. L'opéron *nah* comprend notamment les gènes codant les sous-unités α et β des dioxygénases (*nahAa-b*), la ferredoxine (*nahAc*), la ferredoxine réductase (*nahAd*), les autres enzymes liées à la dégradation des HAP jusqu'au salicylate (*nahBCDEF*) (Figure 5). L'opéron *nah* contient aussi le gène *nahR* situé à proximité des opérons *nah* et *sal*. Le gène *nahR* code une protéine régulatrice de type LysR (Schell et Wender, 1986; You *et al.*, 1988). Cette protéine régule le taux de transcription en se liant à l'ADN au niveau de séquences spécifiques du promoteur, à l'endroit où l'ARN-polymérase se lie à l'ADN (Schell et Poser, 1989). Il semble que deux acides aminés (asparagine 169 et arginine 248) soient à l'origine de la liaison ADN-protéine, laquelle forme un motif de type hélix-turn-hélix (Park *et al.*, 2005). La présence de salicylate change la conformation de la protéine NahR. Ainsi

l'ARN-polymérase peut se lier sur le promoteur de l'opéron *nah* et commencer la transcription des gènes en ARN messager de la HAP-dioxygénase (Park *et al.*, 2005).

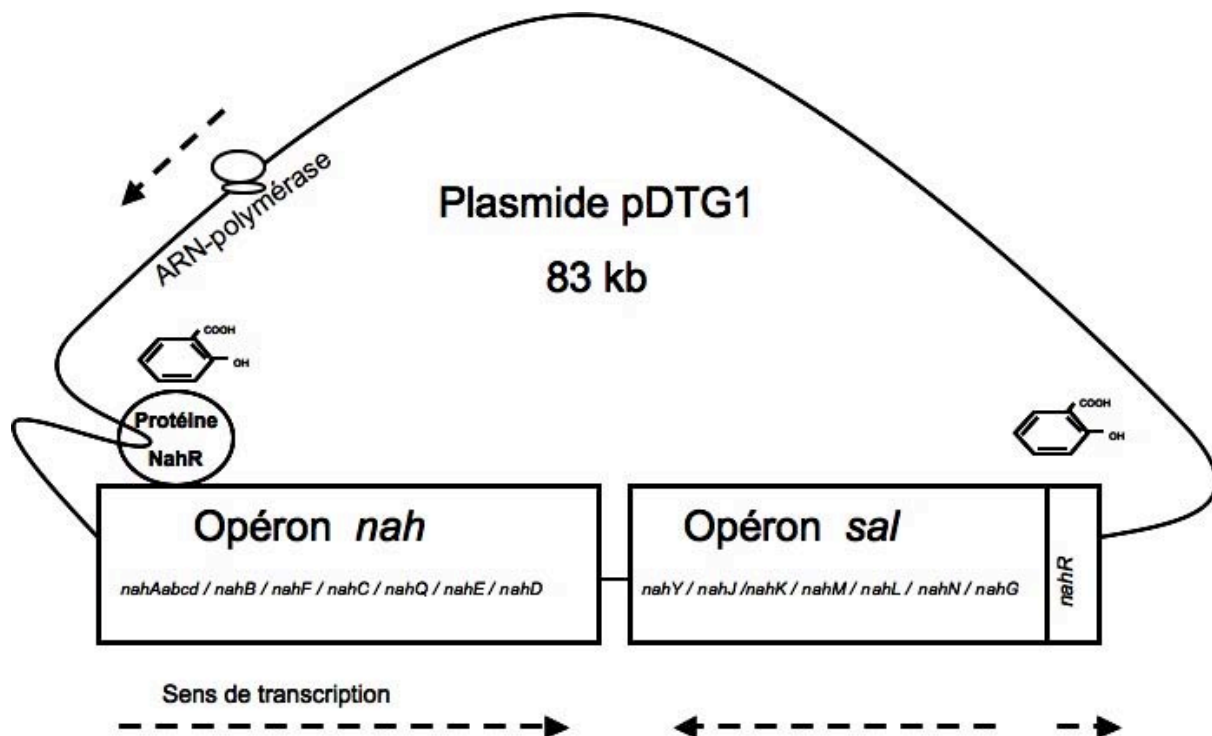


Figure 5 : Organisation génétique du plasmide pDTG1 codant les enzymes nécessaires à la dégradation des HAP. Dans ce cas, la configuration de l'ADN rend la transcription de l'opéron *nah* impossible.

1.3.6. Diversité des genres bactériens dégradant les HAP et des gènes codant une HAP-dioxygénase

De nombreuses bactéries distinctes sont capables d'amorcer la dégradation des HAP (Cerniglia, 1992; Kastner *et al.*, 1994; Mueller *et al.*, 1997). La diversité des espèces bactériennes capables de dégrader les HAP est montrée dans le Tableau 1. Les genres *Sphingomonas* et *Mycobacterium* prédominent au niveau de la dégradation de HAP de hauts poids moléculaires (Juhasz et Naidu, 2000; Kanaly et Harayama, 2000). Il est intéressant de constater que les capacités métaboliques des genres bactériens semblent liées à la morphologie. Les bactéries capables de dégrader le phénanthrène et le fluoranthène appartiennent plutôt à des genres à Gram négatif comme *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* et *Sphingomonas* (Wodzinski et Coyle, 1974; Kiyohara et Nagao, 1978; Volkerling *et al.*, 1992; Aitken *et al.*, 1998; Stuart-Keil *et al.*, 1998; Lloyd-Jones *et al.*, 1999; Rockne *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2000). L'étude de Juhasz *et al.* (1997) est l'une des premières à montrer que *Burkholderia cepacia* a été capable de croître sur du pyrène. Les bactéries capables de dégrader le pyrène sont plus généralement des genres à Gram positif comme *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Peñibacillus*, et

Rhodococcus. Les études montrant des genres bactériens à Gram positif capable de croître sur le fluoranthène sont plus rares (Rehmann *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2005).

Les approches génomiques ont eu un impact majeur dans l'étude des bactéries dégradantes. En effet de nombreuses bactéries capables de dégrader les HAP ne sont pas cultivables et l'utilisation de sondes ADN spécifiques a permis de mieux appréhender la quantité et la diversité des espèces dégradantes dans leur écosystème (Rhee *et al.*, 2004; Ni Chadhain *et al.*, 2006; Cébron *et al.*, 2008). La diversité des bactéries dégradantes peut être définie par une diversité génétique des gènes codant les arènes dioxygénases, plus particulièrement les gènes codant la sous-unité α des HAP-dioxygénases. Le gène *nah* est un des premiers à avoir été étudié (Yen et Gunsalus, 1982), d'autres gènes ont été découverts par la suite (Tableau 2).

Tableau 1: Diversité des genres bactériens en fonction des HAP dégradés. (1) Dégradation en présence de phénanthrène (Aitken *et al.*, 1998; Juhasz *et al.*, 1997), (2) dégradation en présence de salicylate (Rentz *et al.*, 2008), (3) dégradation en présence de pyrène (Dandie *et al.*, 2004).

Composés	Organismes	Références
Naphtalène	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Arthrobacter oxydans</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Gordomas</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Nocardia brasiliensis</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas saccharophila</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Paenibacillus validus</i>	Kastner <i>et al.</i> 1994 ; Aitken <i>et al.</i> 1998; Daane <i>et al.</i> 2001;
Phénanthrène	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Arthrobacter oxydans</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Gordomas</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Mycobacterium austroafricanum</i> , <i>Mycobacterium frederiksbergense</i> , <i>Mycobacterium gilvum</i> , <i>Mycobacterium aurum</i> , <i>Mycobacterium vaccae</i> , <i>Paenibacillus validus</i> , <i>Pseudomonas acidovorans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas pseudomallei</i> , <i>Pseudomonas saccharophila</i> , <i>Pseudomonas saccharophila</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Xanthomonas maltophilia</i> ,	Goyal et Zylstra 1997; Mueller <i>et al.</i> 1997; Kastner <i>et al.</i> 1994 ; Ho <i>et al.</i> 2000; Aitken <i>et al.</i> 1998; Johnsen <i>et al.</i> 2007; Daane <i>et al.</i> 2001;
Anthracène	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp.	Kastner <i>et al.</i> 1994 ; Ho <i>et al.</i> 2000; Dean-Roos <i>et al.</i> 2001
Fluoranthène	<i>Achromobacter paradoxus</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> ¹ , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Gordomas</i> sp., <i>Mycobacterium austroafricanum</i> , <i>Mycobacterium aurum</i> , <i>Mycobacterium pyrenivorans</i> , <i>Mycobacterium parafortuitum</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Mycobacterium vaccae</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas saccharophila</i> , <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Xanthomonas maltophilia</i> ,	Mueller <i>et al.</i> 1997; Kastner <i>et al.</i> 1994 ; Ho <i>et al.</i> 2000; Johnsen <i>et al.</i> 2007; Juhasz <i>et al.</i> 1997
Pyrène	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Mycobacterium parafortuitum</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Gordomas</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Mycobacterium frederiksbergense</i> , <i>Mycobacterium austroafricanum</i> , <i>Mycobacterium gilvum</i> , <i>Mycobacterium aurum</i> , <i>Mycobacterium vaccae</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	Mueller <i>et al.</i> 1997; Kastner <i>et al.</i> 1994 ; Ho <i>et al.</i> 2000; Johnsen <i>et al.</i> 2007; Kazunga et Aitken 2000; Boonchan <i>et al.</i> 2000; Cheung et Kinkle 2001, Dandie <i>et al.</i> 2004; Juhasz <i>et al.</i> 1997
Chrysène	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ¹ , <i>Bacillus cereus</i> ¹ , <i>Pseudomonas saccharophila</i> ¹ , <i>Pseudomonas stutzeri</i> ¹ , <i>Sphingomonas</i> sp.,	Willison, 2004; Ho <i>et al.</i> 2000; Aitken <i>et al.</i> 1998
Benzo(a)pyrène	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ¹ , <i>Bacillus cereus</i> ¹ , <i>Burkholderia cepacia</i> ¹ , <i>Mycobacterium</i> sp. ³ , <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> , <i>Pseudomonas saccharophila</i> ¹ , <i>Pseudomonas stutzeri</i> ¹ , <i>Sphingomonas yanoikuyae</i> ² , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ³	Aitken <i>et al.</i> 1998; Kazunga et Aitken 2000, Boonchan <i>et al.</i> 2000; Dandie <i>et al.</i> 2004; Juhasz <i>et al.</i> 1997; Moody <i>et al.</i> 2004; Schneider <i>et al.</i> , 1996
Benzo(a)anthracène	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ¹ , <i>Bacillus cereus</i> ¹ , <i>Pseudomonas saccharophila</i> ¹ , <i>Pseudomonas stutzeri</i> ¹ , <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ³	Ho <i>et al.</i> 2000; Aitken <i>et al.</i> 1998; Boonchan <i>et al.</i> 2000; Dandie <i>et al.</i> 2004

Tableau 2 : Diversité des gènes de dégradation des HAP décrits dans la littérature.

Gènes	Localisation	Genres	N° accession	Références
bphA1	pNL1	<i>Sphingomonas aromaticivorans</i> F199		Romine <i>et al.</i> , 1999
dntAc	plasmide	<i>Burkholderia</i> sp. DNT	AF169302	Seun <i>et al.</i> , 1996
nagAC	pWWF6	<i>Ralstonia</i> sp. U2	AF036940	Fuenmayor <i>et al.</i> . 1998
doxB	plasmide	<i>Pseudomonas</i> sp. C18	M83949	Denome <i>et al.</i> . 1993
nahAc	plasmide	<i>Pseudomonas</i> sp.	U49496	Yen et Gunsalus, 1982
	NAP7	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AF039533	Bosch <i>et al.</i> , 1999
nbzAc		<i>Comamonas</i> sp. JS765	AF379638	Lessner <i>et al.</i> , 2002
narAa	chromosome	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB12038	AF082663	Larkin <i>et al.</i> , 1999
ndoB	plasmide	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB9816	M23914	Kurkela <i>et al.</i> . 1988
ntdAc	PDTG800	<i>Pseudomonas</i> sp. JS42	U49505	Parales <i>et al.</i> . 1996
pahAc	chromosome	<i>Comamonas testosteroni</i>	AF252550	Moser et Stahl 2001
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF252550	Takaizawa <i>et al.</i> . 1999
		<i>Pseudomonas putida</i> OUS82	AB004059	Takaizawa <i>et al.</i> . 1999
pdoA1	chromosome	<i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1		Krivobok <i>et al.</i> , 2003
phnAc		<i>Burkholderia</i> sp. RP007	AADO9872	Laurie et Lloyd-Jones, 1999

1.3.7. Co-métabolisme des substrats

Horvath (1972) a été un des premiers à faire une synthèse des connaissances autour du principe de co-métabolisme. Le co-métabolisme correspond à la dégradation biologique d'un composé, ici un HAP, par une enzyme produite de manière fortuite. Cette enzyme catalyse normalement un autre substrat, mais elle peut présenter une certaine non-spécificité de substrat. Par principe, le phénomène de co-métabolisme ne bénéficie pas aux microorganismes produisant l'enzyme. Ainsi, les produits de dégradation liés au co-métabolisme ne stimulent pas la croissance bactérienne des populations concernées. En culture bactérienne pure, le produit du co-métabolisme est généralement stocké et n'est pas entièrement minéralisé. Tant que le métabolite n'est pas toxique, la transformation du substrat peut continuer. Dans le cas d'un consortium microbien, il peut exister une forme de commensalisme, où une première espèce dégrade un substrat. Le métabolite produit n'étant pas utilisé par la bactérie, cette source d'énergie peut servir à une seconde espèce comme un champignon (Bouchez *et al.*, 1999). Le co-métabolisme est reconnu pour permettre la dégradation des HAP de haut poids moléculaires dont le benzo(a)pyrène (Juhasz et Naidu, 2000; Kanaly et Harayama, 2000).

Deux types de co-métabolismes sont à distinguer :

Le premier est basé sur des composés analogues structuraux où les molécules se ressemblent au niveau de leurs encombrements stériques. Ainsi dans un mélange ternaire de naphthalène, phénanthrène et pyrène, l'ajout de naphthalène dans le milieu de culture peut augmenter la dégradation de phénanthrène et de pyrène par un inoculum bactérien isolé d'un sol contaminé (Guha *et al.*, 1999). Cependant, ce type de co-métabolisme peut entraîner une inhibition compétitive qui en général diminue la dégradation du composé le plus dégradable (naphthalène) et augmente la dégradation du composé le plus récalcitrant (pyrène). Néanmoins, cette règle n'est pas stricte, ainsi la dégradation par *Pseudomonas aeruginosa* du phénanthrène peut augmenter en présence de pyrène (Hwang et Cutright, 2002 b). L'espèce bactérienne *Sphingomonas yanoikuyae* a été utilisée pour étudier ce type de co-métabolisme (Zylstra et Kim, 1997).

Le second type de co-métabolisme est basé sur le métabolisme simultané de deux composés. La présence d'un premier substrat (exsudats racinaires, biomasse microbienne nécrosée ou composé aromatique HAP-1) est nécessaire pour amorcer la dégradation d'un second substrat (HAP-2). Un des rôles importants du substrat primaire est de fournir des électrons pour régénérer le co-enzyme NADH en NADH,H+ nécessaire au fonctionnement de l'enzyme dioxygénase (Brandt *et al.*, 2003). Ainsi les exsudats racinaires et le salicylate (composé présent dans certains exsudats racinaires) permettent le co-métabolisme du benzo(a)pyrène par *Sphingomonas yanoikuyae* (Rentz *et al.*, 2005; Rentz *et al.*, 2008). Un autre exemple de ce type de co-métabolisme est fourni par Supaka *et al.* (2001), qui utilisent une souche de *Sphingomonas* isolée à partir d'un milieu contenant du phénanthrène. Cette bactérie est capable de dégrader des HAP légers (naphthalène, acénaphtylène, acénaphène, fluorène, anthracène et phénanthrène) mais ne peut utiliser ni le fluoranthène, ni

le pyrène comme seule source de carbone et d'énergie. Un ajout de phénanthrène dans le milieu permet à la bactérie de dégrader le fluoranthène et le pyrène. En absence de phénanthrène, la dégradation du fluoranthène et du pyrène cesse (Supaka *et al.*, 2001). Dans le co-métabolisme simultané, le taux de transformation du substrat secondaire (HAP-2) dépend de l'abondance du premier substrat.

1.4. La rhizosphère : un milieu complexe

La rhizosphère a été définie par Hiltner en 1904 comme la fraction de sol sous l'influence des racines de la plante. La proximité de la racine modifie les propriétés physiques et chimiques du sol. Cette interface entre la racine et le sol crée des conditions favorables pour le développement microbien notamment par la libération d'exsudats racinaires (Rovira, 1969).

1.4.1. Propriétés physiques et chimiques de la rhizosphère

La rhizosphère désigne le volume de sol soumis à l'influence de l'activité racinaire. Dans la pratique, le sol considéré comme rhizosphérique est celui qui adhère aux racines. Ce volume de sol est plus ou moins important et varie selon les plantes et le sol. La racine fournit au sol une grande quantité de rhizodépôts fortement hydratés ce qui permet d'améliorer le contact entre les particules de sol et la racine (Morel *et al.*, 1991; Czarnes *et al.*, 2000; Hinsinger *et al.*, 2005). Dans le sol, les plantes prélèvent l'eau et les éléments minéraux dont elles ont besoin pour leur croissance. Pour faciliter l'acquisition des nutriments, les racines libèrent diverses substances chimiques dont des acides minéraux et organiques (Darrah, 1993; Dakora et Phillips, 2002). Ces excréments de protons par les racines ont une influence sur le pH du sol en le diminuant ce qui peut modifier la nature des minéraux et altérer les roches (Kuchenbuch et Jungk, 1982; Hinsinger *et al.*, 1993; Hinsinger et Gilkes, 1997). Dans un sol, l'acidification induite par la racine s'étend sur une distance de 1 à 3 mm (Schaller, 1987) alors que d'autres mécanismes comme le prélèvement d'eau ou de nitrate peuvent s'étendre à plusieurs centimètres de la racine (Hamza et Aylmore, 1992). De plus, les racines et les microorganismes de la rhizosphère prélèvent de l'oxygène nécessaire à la respiration, ce phénomène peut diminuer localement la pression partielle de dioxygène et augmenter la concentration de dioxyde de carbone (Hinsinger *et al.*, 2006).

1.4.2. Composition des exsudats racinaires

Les racines représentent la principale source d'entrée du carbone dans le sol, notamment par les rhizodépôts : exsudats, mucilage, poils absorbants, tissus desquamés (Lynch et Whipps, 1990). Les racines libèrent en moyenne 17 % du carbone fixé par l'activité photosynthétique de la plante (Nguyen, 2003) et les exsudats racinaires représentent de 2 à 4 % des photosynthétats (Kuzyakov et Siniakina, 2001; Sinyakina et Kuzyakov, 2002; Jones *et al.*, 2004). En culture hydroponique, le maïs peut produire 0,2 à 1,2 mg de carbone par plante et par jour (Groleau-Renaud *et al.*, 1998). La nature des exsudats racinaires varie selon les espèces de plantes et les facteurs du milieu notamment la déficience en phosphore ou en fer (Lipton *et al.*, 1987; Neumann et Romheld, 1999; Fan *et al.*, 2001; Sas *et al.*, 2001; Rengel, 2002; Shen *et al.*, 2002; Nguyen, 2003). La présence de champignons mycorhiziens à arbuscules, lesquels vivent en symbiose avec les racines des

plantes, modifient l'exsudation de ces derniers. L'âge physiologique des racines joue aussi un rôle important dans la qualité des exsudats (Lynch et Whipps, 1990). En supplément, des variations sont observées le long de la racine dans la libération de carbone organique (Semenov *et al.*, 1999) ou dans l'excrétion de protons (Gregory et Hinsinger, 1999). En conditions stériles, les exsudats de maïs sont composés de 65 % de sucres, 33 % d'acides organiques et 2 % d'acides aminés (Krafczyk *et al.*, 1984). De nombreux composés peuvent être libérés par les racines : sucres, acides organiques, acides aminés, composés phénoliques, vitamines, enzymes et de nombreux composés de faible masse moléculaire (Fan *et al.*, 2001; Schlichting et Leinweber, 2009). La composition des principaux sucres, acides aminés et acides organiques est présentée dans le Tableau 3. Une faible quantité de phénanthrène (inférieur à 10 mg.L⁻¹) peut stimuler l'excrétion d'acide oxalique (Mingji *et al.*, 2009). Mais la présence de phénanthrène facilement disponible en forte concentration (100 mg.kg⁻¹ de sol) peut diviser les quantités de sucres et d'acides aminés exsudées par le ray-grass (*Lolium perenne* L.) par dix et par trois respectivement (Muratova *et al.*, 2009 a).

Tableau 3 : Composition chimique des exsudats racinaires en sucres, acides organiques et acides organiques.

Sucres (Rovira, 1956; Krafczyk <i>et al.</i> , 1984)	Acides Organiques (Vancura et Hovadik, 1965; Chen et Adams, 1999; Wang et Zhou, 2006)		Acides aminés (Vancura et Hovadik, 1965 ; Rovira, 1956)	
Arabinose	Acide acétique	Acide malique	Acide α-aminoadipique	Lysine
Desoxyribose	Acide aconitique	Acide malonique	Acide γ-aminobutyrique	Méthionine
Fructose	Acide aldonique	Acide oxalique	Arginine	Ornithine
Galactose	Acide butyrique	Acide piscidique	Aspartate	Phénylalanine
Glucose	Acide citrique	Acide pyruvique	Cysteine	Proline
Maltose	Acide erythronique	Acide succinique	Glutamate	Serine
Oligosaccharides	Acide formique	Acide tétronique	Glycine	Threonine
Raffinose	Acide fumarique	Acide valérique	Histidine	Tryptophane
Rhamnose	Acide glutarique		Homoserine	Valine
Ribose	Acide glycolique		Isoleucine	α-alanine
Xylose	Acide lactique		Leucine	β-asparagine

1.4.3. Propriétés biologiques de la rhizosphère

La rhizosphère a un impact majeur sur l'écologie microbienne des sols. La plante libère au niveau de ses racines une grande quantité de carbone facilement accessible aux microorganismes. Les sucres simples comme le glucose sont rapidement incorporés dans le cytoplasme de la cellule puis convertis en intermédiaires du cycle de Krebs avant d'être utilisés comme source d'énergie (Bremer et Kessel, 1990; Bremer et Kuikman, 1994). Les exsudats racinaires sont donc une source de carbone et d'énergie aisément accessible par les bactéries, ce qui permet une stimulation efficace de la microflore du sol. Le temps de demi-vie des exsudats racinaires dans un sol non stérile est très court, de quelques heures à quelques jours (Kroer *et al.*, 1998; Bremer et Kessel, 1990; Domanski *et al.*, 2001; Kuzyakov, 2006). L'activité et la biomasse microbienne sont beaucoup plus importantes dans un sol rhizosphérique que dans un sol sans racines. Le rapport des nombres de bactéries dans la rhizosphère (R) et dans le sol nu (S) est supérieur à 1 (Katznelson, 1946). Ce rapport R/S se situe plus généralement entre 5 et 100 en considérant le nombre de bactéries cultivables (Nichols *et al.*, 1997; Da Silva *et al.*, 2006; Liste et Prutz, 2006; DeAngelis *et al.*, 2008).

La présence de plantes ou d'exsudats racinaires modifie la structure des communautés microbiennes. Certaines études montrent que la plante favorise l'apparition d'espèces bactériennes initialement minoritaires dans le sol (Smalla *et al.*, 2001). À l'inverse, la présence de racines de maïs peut stimuler et sélectionner seulement quelques espèces bactériennes ce qui peut en contrepartie altérer la diversité de la communauté microbienne dans le sol (Sanguin *et al.*, 2006). Cette diminution de la diversité bactérienne a aussi été observée dans des travaux *in situ* en présence d'un mélange de plantes (Kielak *et al.*, 2008). Cependant l'effet de l'espèce de la plante ou du cultivar sur la structure de communautés bactériennes semble mineur (Kielak *et al.*, 2008) bien que des différences puissent être observées (Smalla *et al.*, 2001; Marschner *et al.*, 2005). La composition d'exsudats artificiellement élaborés et notamment le rapport C/N peut sélectionner différentes espèces bactériennes (Baudoin *et al.*, 2003). De plus la structure des communautés microbiennes peut dépendre de la quantité de substrat ajouté, notamment de la quantité d'exsudats naturels ou artificiels (Griffiths *et al.*, 1999).

1.4.4. Devenir des HAP dans la rhizosphère

1.4.4.1. Germination et croissance des plantes

Dans la rhizosphère, les HAP peuvent avoir un effet sur les plantes et les microorganismes associés, et à l'inverse, les plantes et les microorganismes peuvent intervenir dans la biotransformation, biodégradation des HAP et aussi modifier leur biodisponibilité. On parle de dissipation des HAP dans la rhizosphère (Joner et Leyval, 2003), qui correspond à la diminution de la concentration extractible en HAP dans le sol, et qui inclut la minéralisation, la biotransformation de ces composés, voire l'adsorption et l'absorption de ceux-ci.

1.4.4.2. Prélèvement des HAP par la plante

Les HAP sont des composés hydrophobes et l'absorption de ces composés par la plante est un phénomène limité. Néanmoins, ils peuvent s'adsorber à la surface des racines, mais la pénétration des HAP à l'intérieur de la racine reste faible (Binet *et al.*, 2000) et le transfert des HAP de la racine aux feuilles est un phénomène mineur causé par l'évapotranspiration. Les HAP tendent à se concentrer alors dans les tissus lipophiles de la plante (Gao et Zhu, 2004; Gao et Ling, 2006; Gao *et al.*, 2008).

1.4.4.3. Enzymes libérées par les plantes

Divers stress abiotiques et biotiques peuvent augmenter la quantité des enzymes de type oxydoréductases exsudées par les plantes dans le sol (Criquet *et al.*, 2000; Passardi *et al.*, 2005). Ainsi l'augmentation de la concentration de phénanthrène artificiellement ajouté dans la rhizosphère du Sorgho (*Sorghum bicolor* L.) augmente la libération d'oxydase, de peroxydase et de tyrosinase (Muratova *et al.*, 2009 a). Un mélange de graminées (60 % *Festuca rubra* L., 25 % *Lolium perenne* L., 15 % *Poa pratensis* L.) ou la luzerne (*Medicago sativa* L.) peuvent libérer une grande quantité de peroxydases, de laccases et de monophénol monooxygénases (Gramss *et al.*, 1999; Criquet *et al.*, 2000). Ces enzymes extracellulaires sont capables de réactions de co-métabolisme en présence d'agent de médiation comme le 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonate), ce qui permet l'oxydation de HAP tels que le phénanthrène ou l'anthracène (Gunther *et al.*, 1998; Muratova *et al.*, 2009b). D'autre part, ces enzymes, notamment les peroxydases de classe III, jouent de nombreux rôles dans le métabolisme des plantes mais aussi dans les mécanismes de défense passifs ou actifs en permettant la production de radicaux libres. Les peroxydases sont capables de générer du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pouvant réagir avec les HAP (Criquet *et al.*, 2000).

1.4.4.4. Effet de la rhizosphère sur les bactéries dégradant les HAP

De nombreuses études montrent que la dissipation des HAP dans le sol est stimulée en présence de plantes comme le ray-grass ou le trèfle (Günther *et al.*, 1996; Binet *et al.*, 2000; Joner et Leyval, 2003; Parrish *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006; Chiapusio *et al.*, 2007). L'hypothèse la plus fréquemment émise est que les exsudats racinaires libérés par les plantes stimulent la microflore du sol. Parmi les microorganismes stimulés, certains peuvent posséder des gènes codant des enzymes capables d'oxyder les HAP directement ou par co-métabolisme. Les exsudats racinaires contiennent des composés aromatiques naturels, lesquels peuvent sélectionner une microflore spécifique. Ainsi, il semble que la présence de plantes produisant des composés phénoliques, notamment la fétuque ou les pins, favorise la dégradation des HAP (Fletcher et Hegde, 1995; Miya et Firestone, 2001; Chen *et al.*, 2003; Siciliano *et al.*, 2003; Parrish *et al.*, 2005). Ces plantes semblent stimuler particulièrement les espèces bactériennes possédant dans leur ADN des gènes codant pour une HAP-dioxygénase (Siciliano *et al.*, 2003; Palmroth *et al.*, 2007). De plus, la présence de composés aromatiques, comme le salicylate, peut induire l'expression de gènes codant pour une HAP-dioxygénase de *Pseudomonas fluorescens* (Kamath *et al.*, 2004). Ces composés aromatiques peuvent augmenter les capacités métaboliques de bactéries comme *Pseudomonas putida*, ou *Sphingomonas yanoikuyae* ce qui permet *in fine* une dégradation supérieure du phénanthrène ou du benzo(a)pyrène par co-métabolisme (Rentz *et al.*, 2004; Rentz *et al.*, 2005).

Cependant les mécanismes ne sont pas encore bien compris et des effets d'inhibition à partir de plantes ou d'exsudats ont été observés (Chekol et Vough, 2004; Genney *et al.*, 2004). En effet, les exsudats racinaires d'avoine (*Avena sativa* L.) et de peupliers (*Populus deltoides x nigra*) peuvent diminuer l'activité de dégradation du phénanthrène de *Pseudomonas putida* alors que la bactérie est capable d'utiliser le phénanthrène comme seule source de carbone et d'énergie (Rentz *et al.*, 2004). Pris individuellement, des composés comme le glucose, le pyruvate, l'acétate et le succinate semblent réprimer l'activité de dégradation du phénanthrène (Rentz *et al.*, 2004), alors qu'un mélange (50 mM glucose, fructose et sucrose, 25 mM acide succinique, acide malique, 12,5 mM arginine, sérine, cystéine) peut favoriser la croissance des bactéries dégradantes cultivables et la dégradation des HAP (Joner *et al.*, 2002). De plus, l'augmentation de la quantité d'extrait de racine (carbone organique total : 50 à 275 mg.L⁻¹) inhibe l'expression du gène nah codant une HAP-dioxygénase alors que *Pseudomonas fluorescens* a été exposée au naphthalène (Kamath *et al.*, 2004). La dégradation des HAP semble être réduite par la présence de composés spécifiques, notamment du succinate, et par la quantité de carbone disponible pour les bactéries. La métabolisation des substrats semble suivre une hiérarchie où les bactéries dégradent en premier les composés les plus facilement disponibles avant de dégrader les HAP. Ces études semblent montrer qu'il existe un contrôle global de la régulation du carbone dont dépend la dégradation des HAP (Kamath *et al.*, 2004; Rentz *et al.*, 2004). La régulation globale du cycle du carbone est un phénomène qui implique plusieurs moyens de contrôle pour induire ou réprimer les voies cataboliques de dégradation (Marques *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009).

D'autre part, après leur libération dans la rhizosphère, les exsudats racinaires diffusent dans le sol. Certains composés sont rapidement dégradés ou transformés et la qualité globale et la quantité des exsudats changent au fur et à mesure de l'éloignement de la racine ce qui semble avoir des conséquences sur le devenir des HAP dans les sols. Joner et Leyval (2003) ont été les premiers à montrer l'existence d'un gradient racinaire dans la dissipation des HAP. Dans leur expérience, le domaine d'influence de la racine atteignait 0,4 mm dans le sol rhizosphérique, distance jusqu'à laquelle la dissipation des HAP natifs de deux sols industriels a été supérieure aux sections les plus lointaines (1 mm) (Joner et Leyval, 2003). Dans des dispositifs à compartiments, microcosmes permettant de retenir les racines des plantes en laissant diffuser les exsudats, Corgié *et al.* (2003) ont montré que l'éloignement de la racine dans un sable diminuait la dégradation du phénanthrène et la quantité de bactéries dégradantes (Corgié *et al.*, 2006 c). Cependant, lorsque ces résultats obtenus dans la rhizosphère ont été comparés avec le sol nu, les valeurs les plus proches de la racine ont été équivalentes à celle du sol nu. Les changements observés à l'intérieur de la rhizosphère montraient davantage des effets d'inhibition en s'éloignant de la racine qu'une réelle stimulation de la dégradation. Cependant, bien que le pourcentage de biodégradation du phénanthrène dans le sable ait été le même entre la section la plus proche de la racine et la section non plantée, la structure des communautés a été différente (Corgié *et al.*, 2006b).

1.4.4.5. Effets des exsudats racinaires sur la sorption des HAP

Les exsudats racinaires libérés dans le sol ont un temps de demi-vie court, mais il semble toutefois qu'ils aient un impact sur le sol et sur les HAP du sol. En effet, une plante produisant des composés phénoliques, comme la fétuque, semble être capable de modifier la capacité de rétention en eau du sol et donc l'hydrophobicité générale du sol sous l'influence des racines (Cofield *et al.*, 2007) ce qui peut modifier l'adsorption des HAP dans le sol. De plus, les acides organiques libérés par les exsudats racinaires, notamment le citrate, tendent à altérer la structure du sol, notamment au niveau du complexe minéral-(cation)-humus ce qui peut remobiliser la matière organique et les colloïdes sur lesquels peuvent être adsorbés les HAP (Yang *et al.*, 2001). Néanmoins certains composés organiques, comme les acides malique et malonique présents dans les exsudats, semblent augmenter l'adsorption du phénanthrène artificiellement contaminé dans la matrice d'un sol (Ouvrard *et al.*, 2006). Ainsi, il est intéressant de constater que les plantes peuvent réduire globalement la fraction la plus labile des HAP adsorbés dans un sol (Parrish *et al.*, 2005).

1.5. Traitement biologique des HAP dans les sols

1.5.1. Bioremédiation des HAP

De nombreux procédés permettent de diminuer la concentration des HAP dans les terres contaminées. Les méthodes physiques comme la désorption thermique ou l'incinération reposent sur la combustion des HAP. Les traitements par oxydation chimique à l'ozone (Stehr *et al.*, 2001) ou à l'aide de peroxyde d'hydrogène (Kelley *et al.*, 1991; Beltran *et al.*, 1996; Rivas *et al.*, 2009) peuvent être utilisés dans le cas de pollution intense et limitée géographiquement. Bien que très efficaces, ces méthodes sont coûteuses en énergie et les terres décontaminées restent un déchet inerte qui pose des problèmes au niveau de leur stockage.

Une abondante quantité d'articles de synthèse portent sur l'utilisation des microorganismes pour dégrader les polluants dans l'environnement (Johnson *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2004; Andreoni et Gianfreda, 2007). En effet, les microorganismes dont les bactéries possèdent une large diversité d'enzymes capables d'oxyder de nombreux composés organiques (Cerniglia, 1992; Stolz, 2009). La bioremédiation est un ensemble de techniques consistant à utiliser les capacités enzymatiques des microorganismes (bactéries, algues, champignons) pour dégrader les polluants. Plusieurs stratégies existent comme l'inoculation de microorganismes spécifiques (bioaugmentation) et la stimulation des populations microbiennes indigènes (biostimulation) par apport de nutriments et par ajustement des conditions de milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité). L'utilisation simultanée de ces différentes techniques peut dans certains cas augmenter la dégradation des HAP (Liebeg et Cutright, 1999; Straube *et al.*, 2003). Une variante de la bioremédiation est la phytoremédiation qui s'appuie sur la capacité de la rhizosphère à stimuler l'activité microbienne (Anderson *et al.*, 1993; Siciliano et Germida, 1998; Chaudhry *et al.*, 2005; Wenzel, 2008).

1.5.2. L'atténuation naturelle

Le terme d'atténuation naturelle représente l'ensemble de processus présents dans le sol ayant lieu sans l'intervention de l'homme et qui réduisent la concentration, la toxicité ou la mobilité d'un contaminant. *In situ*, ces processus incluent la biodégradation, l'adsorption, la volatilisation (Odenchant *et al.*, 2002).

1.5.3. La bioaugmentation

La bioaugmentation est parfois utilisée dans les cas de pollutions où les microorganismes indigènes ne possèdent pas les capacités métaboliques pour dégrader le polluant. La technique repose sur l'introduction d'espèces ou de consortia de microorganismes possédant les enzymes nécessaires pour métaboliser le polluant. L'ajout de micro-organismes génétiquement modifiés peut permettre de dégrader les polluants récalcitrants. Cependant, chaque situation est particulière et l'acclimatation de ces "bêtes de laboratoire" peut

être difficile dans les sols. En effet, les stress engendrés par les changements des paramètres abiotiques (température, pH, nature du sol) et les paramètres biotiques notamment la compétition avec la microflore autochtone ou l'apparition de prédateurs comme les nématodes peuvent compromettre le maintien et la croissance des microorganismes introduits. Ainsi les souches microbiennes artificiellement ajoutées peuvent rapidement décliner (van Veen *et al.*, 1997; Singer *et al.*, 2005; Vinas *et al.*, 2005).

1.5.4. La biostimulation

La biostimulation repose sur la stimulation des bactéries autochtones généralement par l'ajout de macro nutriments notamment de l'azote et du phosphore (Guerin, 1999). La composition du mélange de nutriments est déterminante pour augmenter la respiration microbienne et développer la microflore (Liebeg et Cutright, 1999; Roling *et al.*, 2002). Mais l'ajout de nutriments peut nuire à la diversité de la microflore (Roling *et al.*, 2002; Kaplan *et al.*, 2003), voire diminuer la dégradation des HAP (Vinas *et al.*, 2005). Le taux d'humidité et l'aération du sol sont des facteurs importants qui influencent la minéralisation des hydrocarbures par les bactéries (Vinas *et al.*, 2005), bien qu'il n'apparaisse pas toujours de corrélation stricte avec la dégradation des hydrocarbures (Kaplan *et al.*, 2003). La biostimulation est utilisée dans les techniques de landfarming, de biopile.

1.5.5. La phytoremédiation

La phytoremédiation repose sur les interactions entre les plantes, le sol et les micro-organismes (Anderson *et al.*, 1993; Siciliano et Germida, 1998; Alkorta et Garbisu, 2001; Dietz et Schnoor, 2001; Chaudhry *et al.*, 2005; Andreoni et Gianfreda, 2007; Wenzel, 2008). Certaines plantes produisent des enzymes (dont les peroxydases) qui catalysent la dégradation des HAP, mais surtout les plantes stimulent les microorganismes initialement présents dans les terres contaminées. Les microorganismes peuvent réduire la pollution par dégradation directe ou par cométabolisme des HAP. La phytoremédiation peut être associée à une légère fertilisation, notamment au niveau de l'azote et du phosphore. Sur les anciennes friches industrielles, les plantes ont un impact visuel positif auprès du public et elles permettent de lutter contre l'érosion des sols ce qui limite la dissémination des polluants. La phytoremédiation conserve et améliore les propriétés chimiques, physiques et biologiques du sol. Cependant, la phytoremédiation est limitée à la surface et la profondeur occupée par les racines, et la phytotoxicité des polluants peut parfois limiter la germination, la croissance et la biomasse des plantes ce qui demande plus de temps pour traiter le sol contaminé. Pour que se développe la phytoremédiation pour les HAP, il est indispensable de mieux comprendre les processus qui contrôlent leur devenir dans la rhizosphère, afin de mieux les maîtriser.

2. Objectifs de l'étude

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des polluants organiques néfastes pour l'homme et l'environnement. Dans les sols, la phytoremédiation des HAP pourrait être une technique prometteuse qui respecte le sol et l'environnement. Cependant le sol, les plantes et les microorganismes forment un système complexe présentant de nombreuses interactions, qui conditionnent le devenir des HAP dans la rhizosphère et qui sont encore mal comprises.

Cette thèse s'inscrit dans la continuité de nombreux travaux effectués au sein du laboratoire LIMOS sur cette problématique. Ces travaux ont montré que la dissipation des HAP augmentait en présence de plantes comme la luzerne et le ray-gras, mais que cet effet variait en fonction des sols étudiés et de la distance aux racines (Corgié *et al.*, 2003; Joner et Leyval, 2003). Les champignons mycorhiziens favorisent l'établissement de la plante et la dissipation, mais ne semblent pas participer directement à la dégradation des HAP (Binet *et al.*, 2000; Criquet *et al.*, 2000; Joner *et al.*, 2001; Corgié *et al.*, 2006 b; Corgié *et al.*, 2006 c). L'apport expérimental d'exsudats racinaires (utilisation d'exsudats racinaires artificiels) a stimulé les bactéries dégradantes cultivables dans un sol historiquement contaminé en HAP (Joner *et al.*, 2002). La quantification par PCR en temps réel du nombre de copies des gènes codant pour une HAP-dioxygénase chez des espèces bactériennes à Gram positif et négatif, a permis de montrer la présence de ces gènes en plus grand nombre dans des terres contaminées (Cébron *et al.*, 2008). L'influence des plantes sur la structure des communautés bactériennes et sur les bactéries possédant les gènes de dégradation a été étudiée *in situ* à partir de terres historiquement contaminées en HAP (Cébron *et al.*, 2009). Toutefois, des résultats contradictoires ont été aussi obtenus, qui ne montrent pas d'effet ou une dissipation des HAP plus faible en présence de plantes par rapport au sol nu (Corgié *et al.*, 2006; Norini, 2007).

Cette thèse tente de mieux comprendre ces interactions sol-plante-microorganismes qui conditionnent le devenir des HAP dans la rhizosphère en étudiant plus particulièrement l'influence des exsudats racinaires sur :

- Les bactéries possédant les gènes codant une HAP dioxygénase
- Les espèces bactériennes impliquées dans la dégradation du phénanthrène
- La biodisponibilité et la biodégradation des HAP

Pour réaliser cette étude expérimentale en laboratoire, il a été choisi de réduire la complexité du système sol-plante-bactéries-HAP afin de discriminer le rôle de chacun des paramètres. Faisant suite aux travaux de Corgié *et al.* (2003 2006 a, 2006 b, 2006 c), le ray-grass a été choisi comme plante modèle, et l'utilisation de dispositifs à compartiments avait pour objectif d'étudier la rhizosphère en fonction de la distance à un tapis racinaire. Afin de simplifier encore davantage le système et d'étudier l'effet des exsudats sur le devenir des HAP, des expériences en microcosmes ont été réalisées avec des apports d'exsudats racinaires issus de cultures en hydroponie. Avec ces deux types de dispositifs, les expériences ont été réalisées tout d'abord avec un substrat simplifié, du sable artificiellement contaminé avec un HAP modèle, puis avec un sol industriel contaminé historiquement par un mélange complexe de HAP natifs. Pour pallier à la faible biodisponibilité des HAP natifs, du phénanthrène a été ajouté au sol industriel. Dans ces expériences, les analyses ont principalement porté sur les teneurs en HAP totaux et dans certains cas biodisponibles, la quantification de la microflore totale et dégradante et l'estimation de la structure des communautés bactériennes.

Dans la première expérience, l'utilisation de dispositifs à compartiments avec du sable et un inoculum bactérien visait à étudier le lien entre le gradient racinaire et la quantité de gènes codant un HAP-dioxygénase vis-à-vis de l'abattement du phénanthrène. Parallèlement, cette expérience avait pour but d'observer l'influence de l'âge de la plante sur les bactéries possédant les gènes codant une HAP-dioxygénase. Les structures de communautés bactériennes ont été comparées entre les modalités plantées et non plantées.

Pour augmenter la complexité du système, de la terre historiquement contaminée en HAP a été utilisée à la place du sable dans les dispositifs à compartiments. Un ajout de phénanthrène frais a permis de stimuler les bactéries dégradantes dans une partie de l'expérience. Cette expérience visait à suivre l'effet d'un gradient racinaire dans la dissipation des HAP historiques et du phénanthrène fraîchement ajouté dans ce sol. Les bactéries totales et dégradantes ont été quantifiées en fonction de la distance au tapis racinaire. Parallèlement, la biodisponibilité des HAP dans le sol, estimée par l'utilisation d'une solution de cyclodextrine, a été suivie dans les modalités plantées et non plantées.

Au vu des résultats apportés par l'utilisation de dispositifs à compartiments, il a été choisi de réduire l'influence de la plante à l'apport d'exsudats racinaires. Des cultures de ray-grass en hydroponie ont été réalisées et leurs exsudats ont été prélevés et lyophilisés pour être ajoutés dans les expériences en microcosmes. La troisième expérience a été réalisée en microcosmes avec du sable, des exsudats racinaires et un inoculum bactérien. Cette expérience visait à caractériser l'influence des exsudats racinaires sur la dégradation du phénanthrène en suivant les bactéries totales et les bactéries dégradantes. La structure des communautés bactériennes a été comparée en fonction de l'apport d'exsudats racinaires et du temps d'incubation.

Cette expérience en microcosme avec du sable a été suivie d'une quatrième réalisée avec des terres industrielles contaminées, où le rôle des exsudats racinaires sur la biodisponibilité des HAP a été étudié spécifiquement. Trois terres industrielles présentant des niveaux de contamination différents ont été étudiées.

Une cinquième expérience en microcosmes avec apport d'exsudats a été réalisée avec une terre historiquement contaminée à laquelle du ^{13}C -phénanthrène a été ajouté afin de préciser et d'identifier les communautés directement impliquées dans la dégradation (technique SIP, Stable Isotope Probing). Dans cette dernière expérience, les espèces bactériennes ayant incorporé du ^{13}C -phénanthrène dans leur ADN ont pu être séparées du reste des microorganismes du sol. Les quantités de bactéries totales et dégradantes, ainsi que la structure des communautés bactériennes ont pu être comparées selon l'utilisation ou non de phénanthrène ou d'exsudats racinaires.

Ces travaux s'insèrent dans les thématiques du GISFI (Groupement d'Intérêt sur les Friches Industrielles, www.gisfi.fr) dédiés à la gestion des sites et sols dégradés. Les terres contaminées utilisées dans ce travail sont issues principalement de la plate-forme expérimentale du GISFI (Neuves-Maisons, Homécourt). Ces travaux sont ainsi complémentaires des études effectuées *in situ* dans la cadre du GISFI et du contrat ANR CESA Multipolsite (2008-2012).

3. Matériels et Méthodes

3.1. Matériels

3.1.1. Substrats et Sols

3.1.1.1. Les sables

Le sable a été utilisé comme substrat inerte et pour sa faible teneur en matière organique. Deux sables ont été utilisés au cours de ces travaux de thèse. Le sable de Fontainebleau a été choisi car constitué de 95 % de silice. Le sable de Fontainebleau (granulométrie 180-500 μm) a été mélangé en masse (50/50) avec du sable d'aquarium (granulométrie 0-2 mm, Botanic). Ce mélange initialement utilisé par Corgié (2003) a été utilisé dans les compartiments latéraux des dispositifs à compartiments (chapitre 5 et 6). Dans l'expérience en microcosmes (chapitre 7), seul le sable d'aquarium a été utilisé.

3.1.1.2. Sols de friches industrielles

Les sols utilisés provenaient d'anciens sites industriels. Ils présentaient une pollution aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) mais également en éléments en traces métalliques (ETM). Les sols des friches industrielles de Neuves-Maisons et de Homécourt ont été mis à disposition par le Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Fiches Industrielles (GISFI ; <http://www.gisfi.fr>). Le troisième sol provient d'une friche industrielle du nord de la France et a été fourni par Elf Atochem. Les caractéristiques physicochimiques des sols et leurs teneurs en polluants sont présentées dans les Tableaux 4 et 5.

3.1.1.2.1. Sol de friche industrielle de Neuves-Maisons

Ce sol provient d'une ancienne cokerie située à Neuves-Maisons dans le Nord Est de la France. La concentration moyenne en HAP (16 HAP) était de l'ordre de 800-1000 mg.kg^{-1} . Les composés de 4 cycles et plus de cycles représentaient environ 70 % de la quantité totale de HAP et le phénanthrène 7-8 % de la quantité totale de HAP. Le sol a été prélevé en octobre 2004, séché à l'air, tamisé à 2 mm puis stocké dans des sacs à température ambiante (Norini, 2007).

Tableau 4 : Caractéristiques agronomiques, physico-chimiques des sols contaminés étudiés.

	Neuves-Maisons	Homécourt	Elf
Granulométrie (%)			
Argile (< 2 µm)	12,6	9,9	12
Limons fins (2 - 20 µm)	10	15,1	17
Limons grossiers (20 - 50 µm)	10	9,1	12,3
Sables fins (50 - 200 µm)	16,1	18,4	8,2
Sables grossiers (200- 2000 µm)	51,8	47,5	50,2
Paramètres agronomiques			
pH eau	7,13	9,55	8,2
Calcaire total (mg/g)	37,7	369	N.D.
Phosphore Olsen P ₂ O ₅ (mg/g)	0,29	0,09	1,35
Azote total (mg/g)	2,74	2,25	3,6
Carbone organique (mg/g)	70,6	102	287
Matière organique (mg/g)	122	177	N.D.
C/N	25,8	45,4	79,7
ETM totaux (mg/kg)			
Cadmium	2,4	6,2	4,5
Cuivre	95	28,4	36,0
Plomb	683	128	25
Zinc	2770	369	107

Tableau 5 :Teneurs en hydrocarbures aromatiques polycycliques des sols contaminés étudiés.

HAP ($\mu\text{g/g}$)	Neuves-Maisons	Homécourt	Elf
Naphthalène	38	3	411
Acenaphthylène	31	7	432
Acenaphthène	21	47	198
Fluorène	14	133	458
Phénanthrène	62	415	1789
Anthracène	33	389	2361
Fluoranthène	129	601	3598
Pyrène	84	401	2189
Benzo[a]anthracène	70	250	1794
Chrysène	67	218	2262
Benzo[b]fluoranthène	74	154	1846
Benzo[k]fluoranthène	29	94	702
Benzo[a]pyrène	77	153	1435
Dibenzo[a,h]anthracène	15	16	426
Benzo[g,h,i]pérylène	35	67	894
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	79	85	1284
Somme (16 HAP)	966	3030	20792

3.1.1.2.2. Sol de friche industrielle de Homécourt

Ce sol provient de la friche industrielle de Homécourt, dans le Nord Est de la France, où plusieurs cokeries se sont succédées de 1922 jusque 1981. La concentration moyenne en HAP (16 HAP) était de 1200 mg.kg⁻¹. Le sol a été prélevé en avril 2004, séché à l'air, tamisé à 2 mm puis stocké dans des sacs à température ambiante (Norini, 2007).

3.1.1.2.3. Sol de friche industrielle Elf

Le sol provient de la friche d'une ancienne cokerie dans le nord de la France. Il a été prélevé en 1999, séché à l'air et stocké à température ambiante. La concentration totale en HAP était de l'ordre de 20000 mg.kg⁻¹, avec une forte teneur en composés à 3 et 4 cycles (plus de 80 % de la quantité totale de HAP). Le fluoranthène était le composé majoritaire et représentait 17 % de la quantité totale de HAP.

3.1.2. HAP modèles

Le phénanthrène (PHE) a été choisi comme HAP modèle dans certaines des expériences. Le phénanthrène est constitué de trois noyaux benzéniques (C₁₄H₁₀) qui forme une structure plane. Le phénanthrène a été utilisé dans de nombreuses études sur la dégradation des HAP dont celles de Corgié *et al.* (2003, 2004, 2006). Le phénanthrène a été fourni par Fischer Scientific avec une pureté de 99%.

Utilisation de ¹³C-phénanthrène

Au début de la thèse, le ¹³C phénanthrène entièrement marqué sur les 14 carbones n'était pas disponible chez les fournisseurs. À partir d'anhydride succinique et de benzène, nous avons tenté de réaliser la synthèse du phénanthrène en dix étapes (Singleton *et al.*, 2005). L'anhydride succinique se fixe sur le benzène puis le cycle se referme pour former du naphthalène. Un second anhydride succinique est ajouté au naphthalène pour obtenir du phénanthrène. De nombreux essais ont été réalisés à partir d'anhydride succinique et de benzène non marqués, avant d'utiliser du ¹³C-benzène (1 g) et de ¹³C-anhydride succinique (2 g) pour réaliser la synthèse compte tenu du coût de ces molécules. La difficulté majeure a été d'obtenir du naphthalène pur, en quantité suffisante pour continuer la synthèse (≈ 50 mg). Les difficultés se sont répétées à partir du naphthalène commercial où le phénanthrène obtenu a été impur (analyse GC-MS), et les essais de synthèse n'ont pas été poursuivis.

Depuis le milieu de l'année 2008, du ¹³C-phénanthrène commercial « fait à façon » est disponible (Sigma-Aldrich). Ce phénanthrène, entièrement marqué sur les quatorze carbones de la molécule, a donc été utilisé pour cibler les communautés bactériennes directement impliquées dans la biodégradation.

3.1.3. Plantes et exsudats racinaires

Le ray grass (*Lolium perenne* L. var Barclay) a été choisi en raison de sa robustesse et de son système racinaire dense. Dans certaines des expériences réalisées, des exsudats racinaires naturels de ray grass ont été ajoutés pour mimer la diversité des sources de carbone dans la rhizosphère. Deux cultures hydroponiques de ray grass (§3.2.5) ont permis la production de deux lots d'exsudats racinaires distincts.

3.1.4. Inoculum bactérien

Un inoculum bactérien a été ajouté au sable dans deux expériences (dispositifs à compartiments et microcosmes). Les bactéries ont été extraites à partir du sol de la friche industrielle de Neuves-Maisons. Ce sol contaminé présentait une microflore possédant des gènes codant des HAP-dioxygénases (Cébron *et al.*, 2008). La méthode d'extraction par filtration (§3.2.3.1), développée dans la thèse de S. Corgié (2003) a été utilisée pour limiter au maximum l'apport de matière organique. Une seconde méthode d'extraction basée sur un gradient de Nycodenz (Lindhal et Bakken, 1995) a aussi été utilisée (§3.2.3.2).

3.2. Méthodes

3.2.1. Lavage et stérilisation du matériel

3.2.1.1. Sable

Pour éliminer le maximum d'impuretés dont la matière organique, les sables de Fontainebleau et d'aquarium ont été rincés à l'eau distillée puis lavés à l'acide nitrique ($\text{HNO}_3 = 2 \text{ M}$) et à la soude ($\text{NaOH} = 2 \text{ M}$). Les sables ont ensuite été rincés à l'eau jusqu'à obtenir un pH neutre. Ils ont été séchés à l'étuve et stérilisés au four Pasteur (175°C , 2 heures).

3.2.1.2. Flacons et verrerie

L'ensemble des flacons (en verre) et de la verrerie a été rincé au dichlorométhane.

3.2.2. Ajout de HAP modèle

Le phénanthrène a été dissous dans le chloroforme ou l'hexane avant d'être mélangé aux sables ou au sol de la friche industrielle de Neuves-Maisons. L'hexane a été préféré au chloroforme car ce dernier a des propriétés antiseptiques. Seule une partie du sol (1/5) a été mélangée à la solution de HAP dans le solvant. Le mélange a été laissé pendant une nuit sous la hotte pour l'évaporation du solvant. Le reste du sol (4/5) a été ensuite ajouté, et l'ensemble homogénéisé manuellement par retournements successifs. La majorité de la microflore du sol a été ainsi préservée (Brinch *et al.*, 2002).

Rmq : le chloroforme a tout d'abord été utilisé puis remplacé par l'hexane moins toxique.

3.2.3. Inoculum bactérien

Avant extraction des bactéries, le sol de la friche industrielle de Neuves-Maisons a été réincubé pour stimuler la microflore endogène. Il a été mis à 80 % de la capacité de rétention en eau avec une solution de NaCl (0,85 %) et placé en chambre d'incubation (24 h à 24°C). Dans un flacon en verre de 250 mL, des billes de verre stériles (2 mm ; 10 g) et une solution de chlorure de sodium (NaCl ; 200 mL ; 0,85 %) ont été ajoutés au sol réincubé (60 g). Le flacon a été placé sur une table d'agitation orbitale (100 rpm, 1h). Les extractions de bactéries ont été réalisées sur la suspension de sol. Deux méthodes d'extraction, par filtration (Corgié, 2003) et par Nycodenz (Lindhäl et Bakken, 1995), ont été comparées par dénombrement des bactéries en microplaques (nombre le plus probable ; NPP). L'extraction au Nycodenz s'est révélée plus exhaustive que l'extraction par

filtration (3806 contre 1196 bactéries / mL ; n=3 en culture sur microplaque selon le protocole de Corgié *et al.*, 2003).

3.2.3.1. Extraction par filtration

La suspension de sol (200 mL) a été filtrée sur un papier-filtre (5 µm). Le filtrat a été filtré sur une membrane fine (0,2 µm) pour piéger les bactéries. Cette membrane fine a été plongée dans 10 mL de solution nutritive (Hewitt, 1966), agitée, et les bactéries en suspension comptées sur cellule de Thomas.

3.2.3.2. Extraction par gradient de Nycodenz

La suspension de sol (20 mL) a été placée dans un tube de centrifugation (50 mL). Une solution de Nycodenz (11,6 mL) a été ajoutée sous la suspension de sol à la base du tube. Les tubes ont été centrifugés (10000 g ; 1 heure ; 15°C). La phase supérieure de la zone riche en Nycodenz a été récupérée à la seringue, le volume récupéré a été placé dans un nouveau tube de centrifugation, et a été centrifugé de nouveau (6000 g ; 15 min ; 4°C). Le surnageant a été remplacé par une solution de lavage (NaCl ; 0,85 %) pour rincer le culot bactérien. Le culot bactérien a été repris dans une solution de Bushnell-Haas (10 mL) puis dénombré sur cellule de Thomas.

3.2.4. Dispositifs expérimentaux – Principes et choix

Deux types de dispositifs expérimentaux de laboratoire ont été utilisés pour mettre en évidence les effets des exsudats racinaires sur le devenir des HAP et sur les communautés microbiennes. Le premier dispositif dit "dispositifs à compartiment" contenait une plante. Le second dit en "microcosme" a été un flacon en verre contenant des exsudats racinaires naturels. Ces deux dispositifs visaient à simplifier la rhizosphère des plantes.

3.2.4.1. Dispositifs à compartiments

3.2.4.1.1. Principe

La comparaison du sol rhizosphérique et du sol brut est difficile car la limite des deux est mal définie. Le principe des dispositifs à compartiment était de séparer un compartiment racinaire d'un compartiment sans racines mais où les exsudats diffusent. Une membrane de nylon empêche le passage physique des racines tout en laissant diffuser les exsudats racinaires qu'elle produit. De l'autre côté de la membrane, les échantillons de sable ou de sol pouvaient être imprégnés par les exsudats racinaires. Ainsi une plante poussait dans un compartiment central contenant un substrat inerte alimenté en solution nutritive (Figure 6). Les parties aériennes de la plante restaient libres dans l'atmosphère. En grandissant, les racines forment un tapis racinaire compact

dans l'ensemble du compartiment central sur lequel pouvait être placé les échantillons de sable ou de sol contenant l'inoculum microbien.

3.2.4.1.2. Compartiment central

Le compartiment central était constitué d'un cylindre en PVC de 250 cm³ (Figure 6). Le compartiment central a été rempli d'un mélange de Terragreen (60 %), de sable (30 %) et de vermiculite (10 %) préalablement stérilisé au four Pasteur (175°C ; 2h). Une mèche de coton reliait le compartiment central au réservoir contenant la solution nutritive de Hewitt. Le compartiment central contenait sur les cotés deux ouvertures, lesquelles étaient bouchées au début de la croissance de la plante. L'expérience pouvait commencer lorsque les racines formaient un tapis dense au niveau des ouvertures. Au moment de l'expérience, un compartiment latéral était inséré dans une ouverture pour reposer contre le tapis racinaire. Les racines des plantes étaient séparées des échantillons par une membrane de nylon. Ainsi, seuls les exsudats racinaires traversaient la membrane de nylon par diffusion et atteignaient le compartiment latéral.

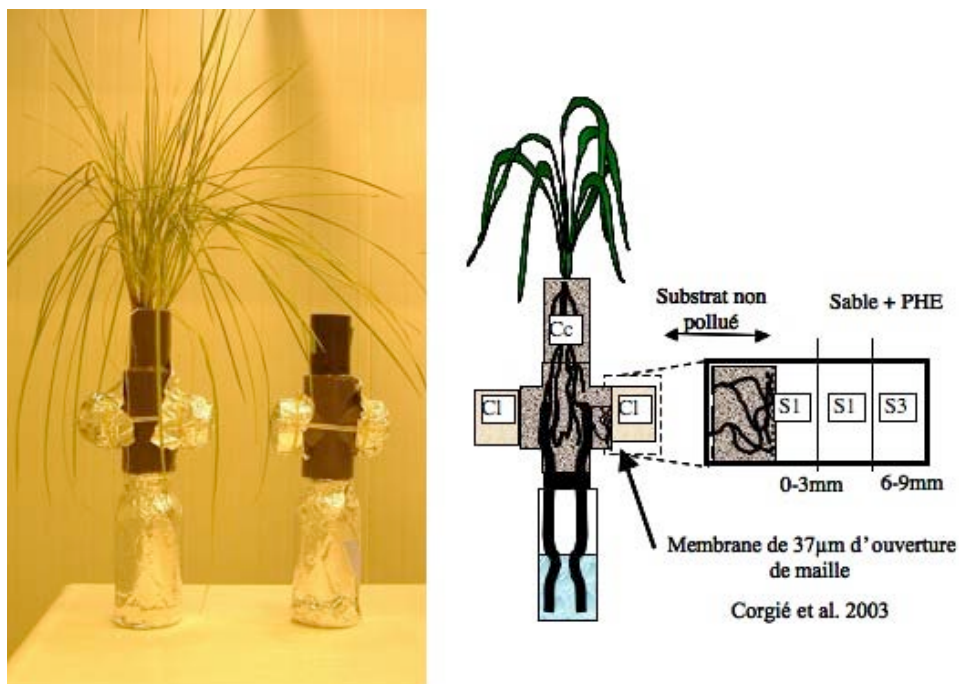


Figure 6 : Schéma des dispositifs à compartiments

3.2.4.1.3. Compartiments latéraux

Des piluliers en polypropylène ont été utilisés pour réaliser les compartiments latéraux. Les bouchons des piluliers ont été percés à l'emporte-pièce (30 mm). La membrane de nylon (37 µm, Busine, France) a été coincée dans le pas de vis entre le pilulier et le bouchon. La surface de l'interface du tapis racinaire et de l'échantillon était de 9,5 cm².

Ce compartiment latéral avait pour objectif de mettre en évidence l'effet des exsudats racinaires en fonction de la distance à la racine. Ainsi trois sections de 3 mm d'épaisseur ont été séparées dans chaque compartiment latéral. Ces sections ont été notées (0-3 mm), (3-6 mm) et (6-9 mm) en fonction de la distance au tapis racinaire (Figure 7). Le principe a été repris de Corgié *et al.* (2003). Cependant ce compartiment latéral a été modifié à partir de l'hypothèse, faite par l'auteur, d'une limitation de la diffusion de l'oxygène dans les sections les plus lointaines. L'extrémité du compartiment latéral, initialement hermétique, a été fermée par du film Biofoly® perméable aux gaz. Le compartiment latéral a été raccourci de 6 à 4 cm. De plus l'intérieur du compartiment latéral en polypropylène a été recouvert de papier aluminium pour éviter l'adsorption de HAP.

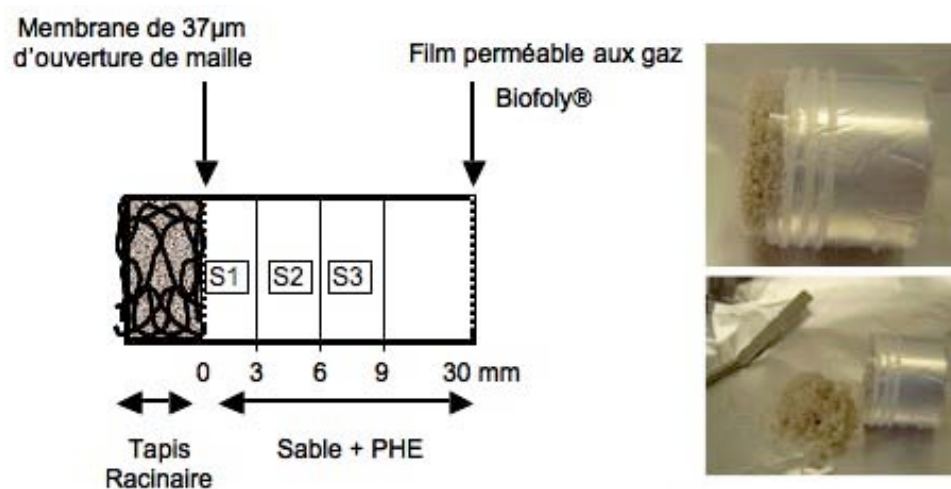


Figure 7 : Compartiment latéral utilisé dans les dispositifs à compartiments

Compartiments latéraux avec du sable

Le sable utilisé était un mélange de sable de fontainebleau et de sable fin (50/50 en masse). Le phénanthrène a été ajouté au sable pour obtenir une concentration finale de $500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. La quantité globale de phénanthrène a été dissoute dans de l'hexane puis mélangée à 1/5 du sable total. Le solvant a été évaporé sous la hotte puis le reste du sable (4/5) a été ajouté et l'ensemble mélangé. L'inoculum bactérien a été extrait par filtrations successives (§ 3.2.3.1), puis ajouté au sable via la solution nutritive de Hewitt. Le nombre de bactéries ajoutées a été de $10^6 \cdot \text{g}^{-1}$ de sable. Le sable a été placé dans les compartiments latéraux, la membrane de nylon a été ajustée. Les compartiments latéraux ont été insérés dans les compartiments centraux au bout de 7 semaines.

Compartiments latéraux avec la terre contaminée

Sans ajout de phénanthrène

La terre contaminée de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons a été mise à 80 % de la capacité de rétention en eau avec la solution nutritive de Hewitt. Les compartiments latéraux ont été remplis de substrat puis insérés dans les compartiments centraux.

Avec ajout de phénanthrène

La terre contaminée de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons (1/5 de la masse totale) a été amendée avec une solution de phénanthrène dissous dans le chloroforme. Lorsque le solvant a été évaporé, le reste du sol a été ajouté. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'une spatule. Le sol a été mis à 80 % de la capacité de rétention en eau avec la solution nutritive de Hewitt et ajouté dans les compartiments latéraux.

3.2.4.1.4. Mise en culture des plantes dans les compartiments centraux

Des graines de ray grass (*Lolium perenne* L. cv. Barclay) ont été stérilisées dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 ; 30 % ; 10 min) puis rincées à l'eau distillée. Elles ont été mises à germer pendant une semaine en chambre de préculture. Deux plantules ont été transférées dans chaque compartiment central. Lorsque le tapis racinaire a été bien formé (7-10 semaines), les compartiments latéraux ont alors été insérés. Les expériences ont été réalisées en chambre de culture, en conditions contrôlées : atmosphère à 80 % d'humidité, 16 heures de luminosité, $250 \mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$, température 24 / 18°C jour / nuit.

3.2.4.1.5. Solution nutritive de Hewitt

La solution nutritive à pH 6 était constituée par : NH_4NO_3 1 mM; $Ca(NO_3)_2$ 1 mM; $Na_2HPO_4, 2H_2O$ 1mM; K_2SO_4 1mM; $MgSO_4, 7H_2O$ 0,75 mM; H_3BO_3 12,5 μM ; $MnSO_4, H_2O$ 2,5 μM ; $CuSO_4, 5H_2O$ 0,3 μM , $ZnSO_4, 7H_2O$ 1 μM ; $Na_2MoO_4, 2H_2O$ 0,05 μM ; $CoSO_4, 7H_2O$ 0,2 μM ; Fe-EDTA 20 μM . La solution nutritive a été autoclavée (120°C; 20 min) puis placée dans les réservoirs sous les compartiments centraux (§ 3.2.4.1.2).

3.2.4.2. Microcosmes

3.2.4.2.1. Principe

Du sable ou de la terre contaminée a été placé dans un flacon en verre fermé, en présence ou non d'exsudats racinaires naturels (Figure 8). L'utilisation d'exsudats racinaires naturels visait à garder la diversité des composés tels que les sucres, les acides organiques et aminés, etc., mais surtout à simplifier le dispositif par rapport à la présence d'une plante entière. En effet, en présence de plantes, les paramètres abiotiques (humidité, nutriments, oxygène), qui peuvent jouer un rôle dans la dégradation des HAP ont été aussi modifiés, ce qui rend les comparaisons avec et sans plante plus compliquées. En outre, la cinétique de dégradation du phénanthrène fraîchement ajouté s'est révélée très rapide (1 à 2 semaines). Cette vitesse de dégradation n'a pas été compatible avec la cinétique de croissance d'une plante (6-7 semaines pour que le système racinaire soit bien développé). Les expériences d'incubations de sable ou de terre contaminés par un ou des HAP avec des apports d'exsudats naturels ont été réalisées sur des périodes de 4 à 12 jours. Les expériences en microcosmes ont été réalisées dans des flacons en verre de 250 mL de type Schott fermé par un septum recouvert de téflon.

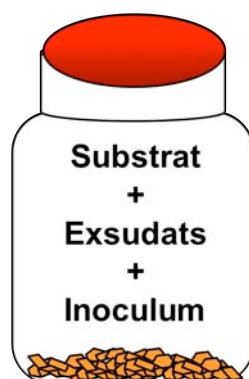


Figure 8 : Microcosme en flacon de verre

3.2.4.2.2. Microcosmes avec du sable

Une solution d'hexane (1 mL) contenant le phénanthrène (2 mg.mL^{-1}) a été ajoutée au sable sec (10 g). Le mélange a été laissé sous une hotte pour permettre l'évaporation du solvant. Les exsudats racinaires (100 mg) ont été ajoutés sous forme de poudre lyophilisée (§3.2.5). Le mélange a été homogénéisé à la spatule. L'inoculum bactérien a été ajouté dans le milieu nutritif Busnell-Hass (10^7 bactéries/ mL). La solution nutritive (1,4 mL) a été ajoutée au sable de telle sorte qu'il soit à 80 % de la capacité de rétention en eau. Le sable, le phénanthrène, l'inoculum bactérien et les exsudats ont été mélangés de façon individuelle dans chaque flacon.

Les flacons ont été fermés par une virole et un septum de téflon. L'incubation des flacons a été réalisée dans une chambre d'incubation à 24°C.

3.2.4.2.3. Microcosmes avec des terres contaminées

Sans ajout de phénanthrène

Le sol (10 g) a été placé dans chaque flacon de verre. Les exsudats racinaires (100 mg) ont été ajoutés sous forme de poudre lyophilisée. Le mélange a été homogénéisé à la spatule. De l'eau distillée a été ajoutée (1,6 mL) pour mettre le sol à 80 % de la capacité de rétention en eau. Les flacons ont été fermés et placés en chambre d'incubation à 24°C.

Avec ajout de phénanthrène

Le sol (2 g) a été placé dans les flacons en verre. Une solution d'hexane contenant le phénanthrène (2 mg de PHE dans 300 µL) a été ajoutée. Le reste de terre contaminée (8 g) a été ajouté après évaporation de l'hexane. Les exsudats racinaires (100 mg) ont été ajoutés sous forme de poudre. Le mélange a été homogénéisé comme précédemment décrit. Le sol a été mis à 80 % de la capacité de rétention en eau. Les flacons ont été fermés et placés en chambre d'incubation à 24°C.

3.2.5. Dispositif de production et prélèvement des exsudats racinaires

3.2.5.1. Principe du dispositif pour culture en milieu hydroponique

La culture des plantes en hydroponie avait pour but de faciliter l'accès aux racines des plantes pour extraire une grande quantité d'exsudats racinaires. Le prélèvement des exsudats a été non-destructif pour les racines des plantes et les extractions ont été répétées sur les mêmes plantes pendant plusieurs semaines. Les plantes poussaient dans un bac de culture. Deux fois par semaine, elles ont été transférées dans un bac d'extraction d'eau ultra-pure pour récolte des exsudats. La solution d'exsudats a été filtrée puis lyophilisée. Les exsudats racinaires ont été ajoutés dans les microcosmes pour stimuler la microflore bactérienne.

3.2.5.2. Mise en place de la culture en milieu hydroponique

Les exsudats racinaires ont été extraits à partir d'une culture hydroponique de ray grass (*Lolium perenne* L.). Un bac en PVC (60 x 40 x 30 cm) accueillait 20 dispositifs (Figure 9). Chaque dispositif était constitué d'une toile de nylon, dont la maille des pores était de 1 mm de diamètre, laquelle était coincée entre deux cylindres PVC creux imbriqués l'un dans l'autre. Une fois tendue, la toile de nylon avait une surface plane de 20 cm². Un couvercle (60 x 40 cm) percé de 20 trous maintenait les dispositifs de telle sorte que la toile de nylon effleurait la solution nutritive. Ainsi, les racines des plantules passaient facilement à travers la toile de nylon pour accéder à la

solution nutritive. Les parties aériennes restaient au sec au-dessus de la toile. Les graines de ray grass ont été stérilisées dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 ; 30 % ; 10 min) puis rincées à l'eau distillée. Dix graines ont été placées dans chaque dispositif. La culture hydroponique a été réalisée en chambre de culture, en conditions contrôlées : atmosphère à 80 % d'humidité, 16 heures de jour, $250 \mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$, température 24 / 18°C jour / nuit.



Figure 9 : Dispositif de culture hydroponique pour la production des exsudats racinaires

3.2.5.3. Solution nutritive pour la culture hydroponique

La solution nutritive était composée de : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2mM; KNO_3 2mM; KH_2PO_4 0,5mM; MgSO_4 1mM; FeNaEDTA 0,1mM; H_3BO_3 10 μM ; MnCl_2 2 μM ; CuCl_2 0,2 μM ; ZnSO_4 1 μM ; NaMoO_4 0,05 μM ; CoCl_2 1 μM . La solution a été autoclavée (120°C; 20 min) puis refroidie avant d'être chargée dans le bac de culture. La solution nutritive a été aérée par une pompe d'aquarium.

3.2.5.4. Extraction des exsudats

Les extractions d'exsudats ont été réalisées au cours des 7 à 20 semaines de la vie de la plante de manière bi-hebdomadaire. Chacun des 20 dispositifs a été précautionneusement retiré du bac de solution nutritive. Les racines des plantes ont été égouttées rapidement puis rincées deux fois dans de l'eau distillée. Les 20 dispositifs ont été placés ensuite dans un petit bac (30 x 20 x 10 cm). De l'eau ultra-pure a été ajoutée pour recouvrir les racines des plantes (2 litres). Les plantes ont été laissées pendant 5 heures dans l'eau ultra-pure à la lumière de la chambre de culture. Immédiatement après l'extraction des exsudats, la solution aqueuse a été filtrée à 0,22 μm puis congelée dans des ballons en verre de 250 mL. Les ballons ont été ensuite placés pendant 24 heures dans un lyophilisateur. Tous les lyophilisats ont été récupérés puis réunis et broyés au pilon et au mortier. Les exsudats ont été conservés au dessiccateur jusqu'à leur utilisation. Deux cultures successives de ray-grass ont été réalisées et deux lots d'exsudats distincts ont ainsi été obtenus (chapitre 6 et 7).

3.3. Analyses

3.3.1. Analyses des exsudats

À partir des lots d'exsudats lyophilisés et broyés, deux solutions d'exsudats (1 mg/ mL) ont été préparées dans l'eau ultra pure. Elles ont été filtrées (0,22 µm), aliquotées puis congelées (-20°C). Les aliquotes ont été utilisées pour les analyses minérales, d'acides organiques et de carbone organique total.

3.3.1.1. Analyses des éléments minéraux

Les solutions d'exsudats ont été stabilisées avec une goutte d'acide nitrique concentré (12 M) et filtrées à 0,2 µm. Les cations totaux ont été ensuite dosés par spectrométrie d'émission atomique de type ICP-OES (Varian). Les éléments analysés ont été le calcium, le fer, le potassium, le magnésium, le manganèse, le sodium et le silicium par analyse séquentielle. La quantification a été réalisée par des gammes étalons monoélémentaires (Spexcsp).

3.3.1.2. Analyse des acides organiques

La séparation et la quantification des acides organiques présents dans les exsudats racinaires ont été réalisées selon le protocole de Chen et Adams (1999), avec un système HPLC (Ultimate 3000, Dionex) équipé avec une colonne polystyrene-divinylbenzene (Aminex, HPX-87H) et un détecteur à barrettes de diodes (PDA-100 Photo Diode Array, Dionex). La longueur d'onde d'émission utilisée a été de 200 nm. La séparation des acides organiques a été réalisée en condition isocratique. La phase mobile hydro-organique a été un mélange d'acide sulfurique (5 mM) et d'acétonitrile (7,5 %). Le débit a été de 2 mL/min et la colonne a été thermostatée à 50°C.

Les acides organiques (citrique, malique, pyruvique succinique, fumarique, lactique, formique, acétique, salicylique et benzoïque) ont été quantifiés à partir de standards externes préparés à partir de composés purs (Merck, pureté 99%)

3.3.1.3. Carbone total et Azote

3.3.1.3.1. Analyse au CHN

Un échantillon d'exsudats racinaires (5 mg) a été oxydé dans un autoanalyseur CHN Flash EA 1112 (ThermoFinnigan) à une température de 900°C. Les gaz vecteurs ont été l'hélium et l'oxygène. Les valeurs de carbone et d'azote ont été traitées par le logiciel EAGER 300.

3.3.1.3.2. Carbone organique total (TOC)

Les analyses ont été réalisées au laboratoire Agronomie et Environnement (UMR INPL-INRA 1121, Vandoeuvre-les-Nancy). L'appareil utilisé a été le TOC-V CSH de Shimadzu, avec une température de travail de 720°C. Les calibrants ont été pour le carbone total et inorganique l'hydrogénophthalate de potassium et le carbonate de sodium.

3.3.2. Dosage du dioxyde de carbone

Des analyses de dioxyde de carbone ont été réalisées pour les expériences en flacons. L'atmosphère du flacon (3 mL) a été prélevée à la seringue puis injecté dans un spectromètre infra-rouge (Binos). La longueur d'onde d'adsorption a été de 2325,6 cm^{-1} .

3.3.3. Dosage du carbone organique dissous

Les analyses ont été réalisées au service d'analyse des roches et des minéraux (SARM) du CNRS. Le substrat (2 g) a été mis en contact avec de l'eau ultra-pure (10 mL) pendant 24 h dans un pilulier en verre. La solution a été ensuite filtrée à 0,22 μm et analysée dans la journée au CRPG. L'appareil (DC-190, Dohrmann) a été étalonné avec de l'hydrogénophthalate de potassium, 5 points de 50-1000 ppm.

Deux milligrammes de phénanthrène (cristallin) ont été mis dans de l'eau ultra-pure pour estimer la part du carbone organique dissous dans la fraction hydrosoluble. Les trois échantillons ne présentaient pas de carbone organique dissous détectable.

3.3.4. Analyses des HAP

Différentes méthodes ont été utilisées pour l'extraction et l'analyse des HAP en fonction des expériences et de la contamination en HAP. Pour les sols qui présentaient une contamination multiple en HAP, ils ont été extraits sous pression par ASE puis analysés par GC-MS ou par HPLC. Pour les expériences avec du sable, le phénanthrène a été extrait à froid et analysé par HPLC. Enfin, pour aborder la fraction la plus labile des HAP, des extractions ménagées ont été effectuées.

3.3.4.1. Extractions exhaustives

Les HAP ont été extraits du sol par une technique d'extraction liquide sous pression (PLE). Les solvants organiques utilisés ont été l'hexane ou le dichlorométhane. Les expériences ont montré que le solvant chloré était plus approprié pour l'extraction des HAP.

3.3.4.1.1. Extraction liquide sous pression à l'hexane

Le sol a été séché à l'air. Les HAP ont été extraits sous pression à l'ASE (Accelerated Solvent Extraction, ASE 200, Dionex). Le sol (2 g) a été placé dans des cellules inox. Le solvant utilisé a été l'hexane. La température a été de 90°C et la pression a été de 100 bars avec 5 minutes de chauffe et 5 minutes de température statique. Les échantillons subissent 2 extractions à la suite. L'hexane a été évaporé à l'azote, le culot a été redissous dans le dichlorométhane. Les concentrations des HAP ont été mesurées par chromatographie gazeuse couplée avec un détecteur par ionisation de flamme (CG-FID).

3.3.4.1.2. Extraction liquide sous pression au dichlorométhane

Le sol a été congelé puis séché par lyophilisation. Il a été broyé dans des cellules en agate. Les HAP ont été extraits à l'ASE (Accelerated Solvent Extraction, ASE 350, Dionex). Le sol (4 g) a été placé dans des cellules inox. De la poudre de diatomées (1 g) a été utilisée comme un agent dispersant et desséchant. Le solvant utilisé a été le dichlorométhane. La température de travail a été de 130°C avec 7 minutes de chauffe et 5 minutes de température statique. Les échantillons subissent 2 cycles d'extraction successifs. Après extraction, le volume de dichlorométhane a été réduit à 20 mL sous vide (Speed Vac, Thermo).

3.3.4.1.3. Extraction à froid à l'hexane

Le phénanthrène artificiellement mélangé au sable a été extrait à froid avec de l'hexane. Le sable (dispositif à compartiment 2 g ; microcosmes 5 g) a été placé dans des tubes à centrifugation en Téflon® (Oak Ridges, 35ml) et 20 mL d'hexane ont été ajoutés. Les tubes ont été scellés et placés dans un agitateur rotatif (100 RPM, 12 h) à température ambiante. Les tubes ont été centrifugés (10000 RPM ; Sorval). Le surnageant a été récupéré et séché sous flux d'azote. Le phénanthrène a été redissous dans de l'acétonitrile (1 mL) puis analysé par chromatographie HPLC.

Des essais préliminaires ont été réalisés avec du sable d'aquarium artificiellement mélangé au phénanthrène (500 mg.kg⁻¹) avec 10 répétitions. Le rendement de l'extraction à froid a été de 101,74 ± 3,33 %.

NB : Les solvants chlorés (chloroforme ou dichlorométhane) sont plus indiqués pour des HAP plus lourds que le phénanthrène. En effet, la dissolution des composés purs, sous forme de cristaux, est immédiate dans le chloroforme.

3.3.4.2. Extractions ménagées

Dans les terres contaminées par des pollutions historiques, la concentration en HAP totaux ne reflétait pas la fraction de HAP réellement disponible pour la microflore du sol. Les techniques d'extraction non exhaustive visaient à mettre en évidence l'effet de la plante ou des exsudats sur la disponibilité des HAP historiques de friches industrielles. Des essais ont été réalisés avec le butanol et une cyclodextrine (Reid *et al.*, 2000 ; Liste et Alexander, 2002).

3.3.4.2.1. Extractions ménagées au butanol

Méthode 1 : Ratio (10/15)

Cette méthode a été inspirée des travaux de Liste et Alexander (2000, 2002) pour prédire la biodisponibilité des HAP dans les sols. Dans des tubes de centrifugation en Téflon® (Oak Ridges, 35ml) du butanol (15 mL) a été ajouté au sol frais (10 g). Les tubes ont été scellés et passés au vortex pendant 2 minutes à température ambiante. Les tubes ont été centrifugés (10000 RPM ; Sorval). Le surnageant (1 mL) a été récupéré et séché sous flux d'azote. Le culot a été redissous dans de l'acétonitrile (1 mL) puis analysé par chromatographie HPLC.

Méthode 2 : ratio (1/10)

Dans des tubes de centrifugation en Téflon® (Oak Ridges, 35ml) du butanol (20 mL) a été ajouté au sol frais (2 g). Les tubes ont été scellés et placés dans un agitateur rotatif (100 RPM, 2 h) à température ambiante.

Les tubes ont été centrifugés (10000 RPM ; Sorval). Le surnageant (1 mL) a été récupéré et séché sous flux d'azote. Le culot a été redissous dans de l'acétonitrile (1 mL) puis analysé par chromatographie HPLC.

Une partie du culot peut ne pas se redissoudre dans l'acétonitrile même après sonication. Quelques gouttes de dichlorométhane permettent d'augmenter la solubilité du résidu. Les HAP extraits au butanol à partir du sol de friche industrielle de Neuves-Maisons représentaient plus de 50 % de la quantité de HAP extrait sous pression au dichlorométhane (Tableau 6). C'est pourquoi la méthode d'extraction au butanol a été abandonnée au profit de l'extraction à la cyclodextrine.

Tableau 6 : Concentration des HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extraites au butanol à partir de la terre de Neuves-Maisons. Moyenne de trois répétitions.

	Butanol Ratio 10/15 ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Butanol Ratio 1/10 ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Naphtalène	2,0 \pm 0,3	5,2 \pm 0,2
Acénaphthylène	11,0 \pm 2,4	6,2 \pm 0,8
Acénaphthène	21,5 \pm 7,2	19,5 \pm 0,2
Fluorène	10,6 \pm 0,4	9,7 \pm 1,8
Phénanthrène	59,1 \pm 7,0	49,5 \pm 0,5
Anthracène	20,6 \pm 0,9	19,7 \pm 0,4
Fluoranthène	48,4 \pm 6,4	10,7 \pm 6,4
Pyrène	38,8 \pm 5,2	34,7 \pm 5,2
Benzo(a) anthracène	61,3 \pm 9,3	63,1 \pm 9,3
Chrysène	58,5 \pm 6,7	66,8 \pm 6,7
Benzo(b)fluorène	66,3 \pm 8,2	54,3 \pm 8,2
Benzo(k)fluorène	32,2 \pm 1,3	23,2 \pm 1,3
Benzo(a) pyrène	64,1 \pm 9,5	69,1 \pm 9,5
Dibenzo(a,h)anthracène	N.D.	N.D.
Benzo(g,h,i)pérylène	32,3 \pm 3,2	25,4 \pm 2,3
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	17,9 \pm 4,5	25,6 \pm 4,5
Somme 16 HAP	489,7 \pm 56,8	461,4 \pm 55,9

3.3.4.2.2. Extractions ménagées à la cyclodextrine

L'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HPCD) (Roquette, France) a été utilisée pour extraire de manière non exhaustive les HAP des sols. Le protocole a été modifié d'après celui de Reid *et al.* (2000). Dans des tubes de centrifugation (Oak Ridge Centrifuge Tube, FEP, Nalgene, USA), 25 mL d'une solution aqueuse d'HPCD (50 mM) ont été ajoutés à 1,25 g de sol frais. Les tubes ont été placés pendant 12 heures sur un agitateur orbital (150 RPM) à 24°C. Les tubes ont été ensuite centrifugés (10000 RPM ; Sorval). Le surnageant (20 mL) a été prélevé à l'aide d'une seringue en verre et remplacé par de l'eau distillée (20 mL). Les tubes ont été immédiatement centrifugés. Les deux surnageants ont été réunis dans un flacon en verre. Du dichlorométhane (10 mL) a été rapidement ajouté à la solution aqueuse. Les HAP ont été décapsulés des HPCD par une extraction liquide/liquide utilisant du dichlorométhane (3 x 10 mL) dans des ampoules à décanter. Le dichlorométhane (30 mL) a été évaporé sous vide (Speedvac ; Thermo). Le culot a été redissous dans 2 mL de dichlorométhane.

La cyclodextrine utilisée est un oligosaccharide pouvant être dégradé par la microflore du sol. Ne souhaitant pas ajouter d'agents chimiques inhibant l'activité microbienne (HgCl_2 ou NaN_3), une comparaison portant sur la température d'extraction a été réalisée (4°C et 24°C). La concentration de HAP extraite à l'HPCD n'étant pas différente entre ces deux températures d'extraction, les extractions ont été finalement réalisées à 24°C.

3.3.4.3. Dosage des HAP

En fonction des expériences et de la disponibilité des appareils de mesures, les analyses de HAP ont été effectuées par différentes techniques et dans différents laboratoires (G2R, LIMOS).

3.3.4.3.1. Dosage par GC-FID

Une partie des analyses a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur par ionisation de flamme (CG-FID), équipement commun au LIMOS et au G2R (Géologie et Gestion des Ressources Minérales et Energétiques). Les temps de rétention des HAP ont été détectés par une solution commerciale de HAP (EPA 610 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix ; SUPELCO). Un standard interne (Eicosane 20) a été ajouté aux échantillons pour quantifier les concentrations de 11 HAP : acénaphthylène; acénaphène; fluorène; phénanthrène; anthracène; fluoranthène; pyrène; benzo(a)anthracène; chrysène; benzo(b,k) fluoranthène; benzo(a)pyrène.

3.3.4.3.2. Dosage par GC-MS

Les analyses en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ont été réalisées au G2R. Le système de chromatographie gazeuse (Agilent Technologies 6890N) a été équipé avec une colonne capillaire en silice (DB 5-MS ; 60 m x 0,125 mm d.i. x 0,1 mm) couplée à un spectromètre de masse (Agilent technologies 5973 Inert detector). Le programme de température a été : 70 °C à 130 °C avec un gradient de 15°C min⁻¹, puis le four passe de 130 °C à 315°C avec un gradient de 3 °C min⁻¹, et pour finir la colonne reste 15 min à 315 °C. Le gaz vecteur est l'hélium à 1,4 mL.min⁻¹.

Quantification en CG-MS

Dans chaque échantillon a été ajoutée une solution contenant des HAP deutérés de concentration connue (naphtalène-d8, acénaphthène-d10, phénanthrène-d10, chysène-d12 et pérylène-d12).

Une courbe de calibration a été réalisée pour quantifier les concentrations en ¹³C-phénanthrène (8, 6, 4, 2, et 1 ppm) à partir des cristaux de ¹³C-phénanthrène (Sigma-Aldrich; §3.1.2).

Silylation

La silylation visait à obtenir une meilleure résolution des métabolites de dégradation lors de l'analyse en GC-MS. Un hydrogène actif (fonctions alcools, phénols, acides carboxyliques) a été remplacé par un groupe alkylsilyl (-Si-CH₃). La silylation a été réalisée par ajout de BSTFA (bis(trimethylsilyl)trifluoroacétamide) à un extrait de HAP dans le dichlorométhane (vol/vol). Les échantillons ont été passés en GC-MS sans standard interne.

3.3.4.3.3. Dosage par HPLC-UV

Pour certaines expériences, les analyses ont été effectuées au LIMOS par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Suite à la pénurie d'acétonitrile au début de l'année 2009, ce dernier a dû être remplacé par le méthanol. Les méthodes analytiques ont été modifiées car la nature du solvant change la sélectivité des HAP sur les colonnes en phase inverse.

Analyse du phénanthrène

Le phénanthrène a été quantifié par chromatographie HPLC utilisant une pompe (GP 40, Dionex) équipée d'une colonne en phase inverse C-16 Dionex (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 mm). La phase mobile était un mélange acétonitrile / eau (80 : 20 v/v), le débit était de 1,5 mL/min. Un détecteur UV (Spectre Focus, Dionex) de longueur d'onde de 254 nm permettait de détecter le phénanthrène.

La concentration de phénanthrène a été quantifiée selon la méthode des standards externes avec 5 points de calibration (10 à 200 ppm), et une solution de standard commerciale (Supelco). L'acquisition et le retraitement des données ont été réalisés par le logiciel CHROMQUEST (ThermoScientific).

Analyse des 16 HAP prioritaires

Les HAP ont été séparés par chromatographie en phase inverse, utilisant un système HPLC (GP 40, Dionex) équipée avec une colonne en phase inverse C-18 Zorbax (Zorbax RR Eclipse PAH, 150 mm x 4,6 mm i.d., 5 mm) et d'un détecteur UV (Spectre Focus, Dionex). La phase mobile était un mélange acétonitrile/eau, le débit était de 2 mL/min. Le gradient d'élution utilisé pour séparer les HAP est présenté dans le Tableau 7.

Des essais avec différentes longueurs d'ondes de détection ont été utilisés (Tableau 8) pour améliorer le seuil de détection des 16 HAP. Par défaut la longueur d'onde utilisée a été de 254 nm.

Tableau 7 : Gradient d'acétonitrile pour l'élution des HAP

Temps (min)	0	1,25	18	21,5	23	25
% acétonitrile	40	40	100	100	40	40

Tableau 8 : Longueur d'onde (nm) d'excitation du détecteur UV couplé à l'HPLC

Temps (min)	UV (nm)	HAP détectés				
0	227	NAP	ACY	ACT	FLO	
9,6	254	PHE	ANT			
11,6	235	FLA	PYR			
13,1	297	B(a)ANT	CHY	B(b)FLA	B(k)FLA	B(a)PYR
		dB(a,h)ANT	B(g,h,i)PER	Ind-PYR		

Calibration

Les concentrations des HAP ont été quantifiées selon la méthode des standards externes avec 5 points de calibration en utilisant un mélange de 16 HAP (EPA 610, Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Mix, Supelco).

Ajouts dosés de HAP

Les sols de friches industrielles présentent une multitude de HAP (plus que les 16 HAP suivis). Ces HAP ont des temps de rétention sur les colonnes HPLC très proches. La sélectivité des colonnes en phase inverse n'a pas été parfaite et les temps de rétention des HAP peuvent varier entre les standards et les matrices des échantillons (acétonitrile, dichlorométhane). Dans certains cas litigieux, un HAP individuel (standard, Supelco) a été ajouté dans l'échantillon, afin d'identifier sans équivoque un pic.

Dionex Ultimate 3000

Un système HPLC (Ultimate 3000, Dionex) équipé avec une colonne en phase C-18 Zorbax (Zorbax RR Eclipse PAH, 150 mm x 4,6 mm i.d., 5 mm) thermostatée à 50°C et d'un détecteur à barrettes de diodes (PDA-100 Photo Diode Array, Dionex) a été utilisé. La séparation des 16 HAP a été faite par un gradient d'élution de phase mobile hydro-organique méthanol / eau. Le débit était de 2 mL/min. La composition du gradient est présentée dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Gradient de méthanol pour l'élution des HAP par HPLC

Temps (min)	0	1,25	16	20	21,5
% Méthanol	50	50	100	100	50

Le pilotage et le retraitement des données a été réalisé avec le logiciel CHROMELEON (Dionex). Le détecteur à barrettes de diodes permet un balayage spectral des HAP après la séparation. Chaque HAP possède une image spectrale particulière ce qui permet une identification sûre de la molécule.

3.3.5. Analyses isotopiques du carbone ¹³C

Des analyses isotopiques ont été réalisées au Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques (CRPG) à partir de l'expérience avec du ¹³C-phénanthrène. Un analyseur élémentaire Eurovector (EuroEA3028-HT) a été couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS) (GV Instruments IsoPrime). L'appareil a été calibré à partir de ¹³C-glucose. La variation du rapport d'un échantillon par rapport au standard de la coquille de *Belemnitella americana* (PCB) est exprimée en delta ¹³C pour mille (δ¹³C) selon la formule suivante :

$$\delta^{13}C_{\text{échantillon}} = \left(\frac{^{13}C/^{12}C_{\text{échantillon}}}{^{13}C/^{12}C_{\text{PDB}}} - 1 \right) \cdot 1000$$

3.3.5.1. Delta ¹³C pour mille dans le carbonate de baryum

Des tubes à essais contenant de la soude (NaOH ; 1M ; 15 mL) ont été introduits dans les microcosmes dont le sol a été mélangé avec le ¹³C-phénanthrène. À la fin de l'expérience, du chlorure de baryum (2 M ; 2 mL) a été ajouté à la soude (5 mL). Il s'est formé un précipité de carbonate de baryum, lequel a été centrifugé et séché sous-vide (SpeedVac ; Thermo). Le ¹³C-carbonate a été broyé au mortier et dilué (1/10) avec du ¹²C-carbone de baryum commercial. Les échantillons ont été analysés à l'analyseur élémentaire (EA-IRMS). Les valeurs ont été exprimées en delta pour mille du carbonate de baryum. Le delta pour mille du BaCO₃ commercial était de - 40.

3.3.5.2. Delta ¹³C pour mille dans la terre de Neuves-Maisons

Le sol sec et broyé (3 mg) a été directement passé à l'analyseur élémentaire (EA-IRMS). Les valeurs ont été exprimées en delta pour mille du carbone de la terre de Neuves-Maisons (δ¹³C-Sol).

3.3.5.3. Delta ¹³C pour mille dans la matière organique du sol extraite au dichlorométhane

Après extraction sous pression au dichlorométhane du sol sec, le dichlorométhane (5 mL) a été séché sous-vide (SpeedVac, Thermo). Une partie du résidu (1 mg) a été analysée par analyseur élémentaire (EA-IRMS). Les valeurs ont été exprimées en delta pour mille du carbone de la matière extractible au dichlorométhane (δ¹³C-DCM).

3.4. Analyses biomoléculaires

La connaissance des bactéries a longtemps été étudiée par des méthodes basées sur la culture de bactéries. Ces techniques classiques de culture ne permettent de caractériser qu'une petite partie des espèces et les bactéries cultivables ne représentent qu'une faible partie des bactéries présentes dans tous les environnements naturels. Les séquences d'ADN codant la petite sous-unité ribosomique de l'ARNr 16S permettent l'établissement des liens phylogénétiques entre les différentes espèces (Woese *et al.*, 1990). Ces séquences d'ADN montrent l'existence de nombreuses espèces inconnues considérées comme non-cultivable (Pace, 1997). Le nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S a été utilisé dans ce travail pour estimer le nombre de bactéries présentes dans les échantillons, bien que certaines bactéries contiennent plusieurs opérons de gène codant l'ARNr (Klappenbach *et al.*, 2001), ce qui pouvait mener à surestimer le nombre réel de cellules bactériennes.

3.4.1. Extraction de l'ADN

À la fin de chaque expérience, le sol (1 g) a été placé dans des tubes cryogéniques stockés à -20°C.

3.4.1.1. Lyse des cellules

Un mélange de billes en verre, 800 µl de tampon n°1 (TRIS-BASE 100 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, PVPP 1% (p/vol), SDS 2% (p/vol)) et 40 µl de tampon n°2 (CTAB 6 % ; CaCl₂ 5 mM) a été ajouté dans chaque échantillon de sol (1 g). Les tubes ont été agités dans un broyeur horizontal (Restch ; 1 m.s⁻¹; 60 sec).

3.4.1.2. Séparation parois cellulaire / ADN

Une solution de solvants organiques chlorés (phénol, chloroforme, alcool isoamylique 25/24/1 v/v/v) ; 800 µl) a été ajoutée dans les tubes. Les tubes ont été agités dans un broyeur horizontal (Restch ; 1 m.s⁻¹; 30 sec) puis centrifugés (Jouan MR14.11 ; 14000 g ; 5 min)

3.4.1.3. Purification de l'ADN

La phase aqueuse a été délicatement prélevée et transférée dans un tube Phase LockGel stérile (Ependorf ; 2 mL). Une seconde solution de solvant organique (chloroforme, alcool isoamylique 24/1 v/v ; 800 µL) a été ajoutée. Le tube a été agité jusqu'à obtenir une émulsion. Le tube a été ensuite centrifugé (Jouan MR14.11 ; 14000 g ; 5 min). Le gel s'intercale entre les phases aqueuse et organique. La phase aqueuse a été prélevée pour être de nouveau purifiée.

3.4.1.4. Précipitation de l'ADN

La phase aqueuse a été prélevée et transférée dans un tube stérile (Ependorf ; 2 mL). Un volume d'isopropanol a été ajouté, le mélange a été homogénéisé. Le tube a été laissé à 4°C pendant une heure avant d'être centrifugé (Jouan MR14.11 ; 14000 g ; 20 min). Le surnageant a été éliminé et le culot a été rincé à l'éthanol (100 µL). Après séchage de l'éthanol, l'ADN a été redissous dans du tampon TRIS (10 mM ; pH 8 ; 100 µL).

3.4.2. Méthode SIP et séparation du ¹²C-ADN et ¹³C-ADN

La méthode SIP (Stable Isotope Probing) repose sur l'incorporation d'un isotope stable dans l'ADN d'un organisme vivant. Le carbone ¹³C est un isotope stable et constitue environ 1 % du carbone terrestre. Sa masse est supérieure d'un neutron à celle du carbone ¹²C lequel est le plus abondant (environ 98 % du carbone terrestre). La différence de masse atomique entre les atomes les plus abondants et leur isotope stable permet de les séparer par ultracentrifugation. Les isotopes stables n'ont pas de radioactivité décelable et peuvent être utilisés au laboratoire sans contrainte.

Dans ces travaux de thèse, une expérience a été réalisée avec du ¹³C-phénanthrène (§ 3.1.2) pour identifier spécifiquement les bactéries directement impliquées dans la dégradation du phénanthrène. Cette expérience d'incubation a été réalisée en microcosmes avec de la terre de Neuves-Maisons et du ¹³C-phénanthrène (200 µg.g⁻¹). Seules les bactéries directement impliquées dans la dégradation du ¹³C-phénanthrène ont incorporé du carbone ¹³C dans leur ADN. Après extraction de l'ADN globale, l'ADN lourd (contenant du ¹³C-ADN) et l'ADN léger (contenant du ¹²C-ADN) ont été séparés par ultracentrifugation en utilisant du chlorure de césium selon le protocole de Neufeld *et al.* (2007). Cette partie a été réalisée par le Dr. Cébron. Un extrait sec d'ADN (2 à 5 mg) a été mélangé à une solution tampon de chlorure de césium (Tris-HCl 0.1M à pH 8; KCl 0,1M et EDTA 1mM). La densité finale du mélange de 1,725 g/mL a été vérifiée au réfractomètre (Reichert AR200). La centrifugation a été réalisée dans des tubes de 5,1 mL placés dans un rotor vertical (VTi 65.2, Beckman) à 20°C, à 44100 rpm (177000 g) et pendant 42 h. Le gradient a été divisé dans 13 fractions (400 µL) dans des tubes centrifuges stériles. La formation du gradient a été vérifiée par analyse de la densité de chaque fraction en utilisant un réfractomètre (Reichert AR200). L'ADN a été précipité par addition d'eau milliQ (400 µL), d'isopropanol (800 µL) et de polyacryl (2 µL) pendant 1 heure à -20°C. Le tube est centrifugé (13000 g, 30 min) puis le culot est rincé à l'éthanol 70 % et resuspendu dans du tampon Tris (30 µL).

3.4.3. Quantification des gènes

3.4.3.1. Principe de la PCR quantitative

La quantification des gènes a été réalisée par la technique de PCR en temps réel (ou PCR quantitative). Le principe de la technique repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente à chaque instant. Des sondes fluorescentes (SYBR Green) s'intercalent sur l'ADN double brin au moment de la fermeture des brins lors des cycles de PCR. Ce complexe ADN/sondes peut être excité par une longueur d'onde à 487 nm et réémettre une fluorescence à 521 nm. Une caméra détecte l'intensité lumineuse dans chaque tube de PCR. L'intensité de la fluorescence dépend de la quantité de produit de PCR, lequel augmente à chaque cycle de PCR. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de la machine de PCR (Logiciel MyiQ). Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, on obtient un nombre de cycles de PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold". Cette valeur est à la base des calculs pour quantifier l'ADN. Une gamme étalon est réalisée pour chaque expérience à partir de standards d'ADN de quantité connue (10^2 - 10^8 nombre de copies par tube) et possédant leur propre Ct (Gibson *et al.*, 1996). Après transformation logarithmique, cette gamme étalon donne une équation de droite ($y = ax + b$) qui modélise la phase exponentielle de la PCR. La modélisation permet théoriquement de déterminer la quantité d'ADN initiale.

3.4.3.2. Amorces pour les PCR quantitatives

Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 10. Le couple d'amorce 968-R et 1401-F avait pour objectif d'amplifier sans a priori les ADN codant les ARN ribosomiaux 16S des bactéries (ARNr 16S) (Felske *et al.*, 1998).

Les amorces HAP-dioxygénase (HAP-diox) sont spécifiques des gènes codant une HAP dioxygénase. Deux jeux d'amorces appartenant à des bactéries à Gram négatif (GN) et positif (GP), dessinés par (Cébron *et al.*, 2008), ont été utilisées.

Tableau 10 : Amorces utilisées pour la PCR en temps réel.

Amorces	Gène cible	Séquence 5'→3'	Taille (paire de base)	Référence
968-R	ARNr 16S	AAC GCG AAG AAC CTT AC	433	Felske <i>et al.</i> (1998)
1401-F		CGG TGT GTA CAA GAC CC		
HAP-diox GN F	HAP-diox GN	GAG ATG CAT ACC ACG TKG GTT GGA	306	Cébron <i>et al.</i> (2008)
HAP-diox GN R		AGC TGT TGT TCG GGA AGA YWG TGC MGT T		
HAP- diox GP F	HAP-diox GP	CGG CGC CGA CAA YTT YGT NGG	292	Cébron <i>et al.</i> (2008)
HAP- diox GP R		GGG GAA CAC GGT GCC RTG DAT RAA		

K : Fonction cétone dans le grand sillon de l'ADN : Thymine ou Guanine

M : Fonction amine dans le grand sillon de l'ADN : Adénine ou Cytosine

N : Quelconque

R : Purine : Adénine ou Guanine

W : Faible liaison (deux liaisons hydrogène) : Adénine ou Thymine

Y : Pyrimidine: Thymine ou Cytosine

3.4.3.3. Préparation du mélange réactionnel pour la PCR quantitative

L'appareil utilisé pour les analyses de PCR en temps réel était un thermocycleur iCycler iQ (Bio-Rad) associé à un système d'interface optique (iCycler Optical System Interface ; version 2.3 ; Bio-Rad). Le système était piloté par un logiciel (MyiQ ; Bio-Rad). Un mélange réactionnel PCR global (Tableau 11) a été préparé pour les échantillons, la gamme étalon, et un témoin négatif (H₂O). Le mélange PCR (19 µL) a été réparti dans des tubes de 125 µL, auxquels a été ajouté l'échantillon d'ADN (1 µL) avant de lancer le programme d'amplification (Tableau 12).

Tableau 11 : Mélange réactionnel pour la PCR en temps réel.

	Concentration solution mère	Volume (pour 1 tube)
iQ SYBER GREEN SuperMix (Bio-Rad)	1 x	10 µL
Amorce F (10 µM)	10 mM	0,8 µL
Amorce R (10 µM)	10 mM	0,8 µL
BSA	3 % (masse/vol)	0,6 µL
DMSO		0,4 µL
T4 gène 32 (Qbiogene)	1 x	0,08 µL
H ₂ O		6,32 µL

Tableau 12 : Programme d'amplification de la PCR en temps réel.

		Température (°C)		Temps (min)
		ARNr 16S	HAP-diox GN et GP	
Étape 1: (1 x)		95.0°C	95.0°C	05:00
Étape 2: (50 x)	Dénaturation	95.0°C	95.0°C	00:30
	Hybridation	54.0°C	56.0°C	00:30
	Élongation	72,0 C	72,0 C	00:30
Étape 4:		82,0 C	82,0 C	00:10
Étape 3: (1 x)	Élongation finale	72,0 C	72,0 C	07:00
Étape 4: (1 x)		95,0 C	95,0 C	00:30
Étape 5: (88 x)		51,0 C	51,0 C	00:10
Étape 6: (1x)		4,0 C	4,0 C	

3.4.3.4. Proportion de bactéries dégradantes

Le nombre de copies de gène codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomique (ARNr 16S) a été utilisé pour estimer la quantité totale de bactéries par gramme de sable. Les gènes de dégradation codant pour une HAP-dioxygénase chez des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (HAP-diox GN et HAP-diox GP) ont permis d'estimer la quantité des bactéries capables de dégrader le phénanthrène.

Le rapport du nombre de gènes HAP-diox / ARNr 16S a permis d'estimer un pourcentage de bactéries potentiellement dégradantes. Ce rapport a été réalisé individuellement sur chaque extrait d'ADN, il permettait de limiter les biais dus à l'extraction de l'ADN du sable ou du sol.

3.4.4. Structure des communautés

Les structures des communautés bactériennes ont été révélées par électrophorèse sur gel où les fragments d'ADN migrent en fonction du temps et de la température (électrophorèse TTGE). Dans un premier temps, les échantillons d'ADN ont été amplifiés par PCR avec des amorces particulières (968 F-GC et 1401 R). L'amorce 968F-CG contient 40 paires de bases Guanine-Cytosine supplémentaires. Cette "queue GC" empêche la dissociation de l'ADN double brin avec l'augmentation de la température lors de l'électrophorèse TTGE. Les produits de PCR ont été déposés sur gel de polyacrylamide.

3.4.4.1. Amplification de fragment d'ADN avec une "queue GC"

Un mélange PCR global a été préparé pour les échantillons et un témoin positif (ADNr 16S de *Pseudomonas putida* ; NCIB 9816-4) et négatif (H₂O). Le mélange PCR (Tableau 13) a été réparti dans des tubes de 125 µL, auxquels a été ajouté l'échantillon (2 µL). Le mélange a été homogénéisé et placé dans le thermocycleur iCycler iQ (Bio-Rad) avant d'amplifier les fragments des gènes codant l'ARNr 16S (Tableau 14).

Tableau 13 : Mélange réactionnel pour la PCR avec la "queue GC".

	Concentration solution mère	Volume (pour 1 tube)
Tampon PCR (50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 5 mM (NH ₄)SO ₄)	10 x	5 µL
dNTP	10 mM	1 µL
MgCl ₂	25 mM	3 µL
Amorce 968F-GC (10 µM)	10 µM	1 µL
Amorce 1401R (10 µM)	10 µM	1 µL
BSA	3 % (masse/vol)	2 µL
Taq polymérase	1 x	0,2 µL
H ₂ O		34,8 µL

Tableau 14 : Cycle PCR en présence d'une "queue GC"

		ADNr 16S	Temps (min)
Étape 1 : (1 x)		94,0 C	05:00
Étape 2 : (38 x)	Dénaturation	94,0 C	00:30
	Hybridation	56,0 C	00:30
	Élongation	72,0 C	00:30
Étape 3 : (1 x)	Élongation finale	72,0 C	07:00
Étape 4 : (1x)		4,0 C	∞

3.4.4.2. Gel d'électrophorèse TTGE

Des gels de polyacrylamide ont été réalisés à partir d'acrylamide et de glycérol (Tableau 15). Le gel de TTGE contient de l'urée, un agent dénaturant pour détruire les structures spatiales des acides nucléiques. La réaction de polymérisation du gel se fait grâce à l'ajout de deux substances réactives : le tétraméthylethylènediamine (TEMED) et l'ammonium persulfate. Le gel a été immergé dans une solution tampon de Tris, acétate et EDTA (tampon TAE; 1,25x) contenu dans la cuve d'électrophorèse (7 Litres). Les produits PCR (7 à 18 µL) ont été mélangés avec du bleu de charge (bleu de bromophenol 2% ; xylène cyanol 2 % ; 7 µL) puis ont été déposés dans les puits du gel de polyacrylamide. La température du bain augmente de 57°C à 67°C avec un incrément de 2°C par heure. Un champ électrique (100 Volt) parcourt le gel et les fragments d'ADN chargés négativement migrent vers la cathode de la cuve d'électrophorèse.

Tableau 15 : Composition du gel d'acrylamide pour l'électrophorèse TTGE

	Concentration	Volume
Urée	7 M	20 mL
Glycérol	0,20 %	0,6 mL
Tris-acetate-EDTA (TAE)	x 50	0,75 mL
Polyacrylamide	6 % (m/v)	6 mL
TEMED		30 µL
Ammonium persulfate	10 % (m/v)	300 µL

Les fragments d'ADN migrent pendant cinq heures sur le gel. Après l'électrolyse, le gel est précautionneusement retiré et placé dans une solution de SYBR Gold (10 µL for 100 mL, Sigma). Le gel a été ensuite rapidement rincé à l'eau puis placé dans un système transilluminateur UV (GelDoc ; Bio-Rad). Une caméra permettait la capture d'image du gel. Pour comparer des profils de TTGE entre eux, un produit de PCR commun a été ajouté dans chaque gel.

3.4.5. Identification des espèces bactériennes

Les gels d'électrophorèse TTGE ont été placés sur une table UV. Les bandes d'intérêts ont été découpées au scalpel puis placées dans des tubes Ependorf (2 mL) avec 100 µL de tampon Tris-EDTA. Les tubes ont été placés à 4°C pendant une nuit pour que les fragments d'ADN diffusent dans le tampon. Les fragments d'ADN ont été amplifiés par PCR (amorces 968 F et 1401 R ; sans queue GC). Les produits de PCR ont été purifiés (High Pure PCR Product Purification Kit ; Roche Applied Science ; Germany). L'ADN a été séché sous vide (SpeedVac; Thermo Fisher Scientific). Les séquences de nucléotides ont été déterminées par MWG Biotech Company (Courtaboeuf, France). L'affiliation taxonomique des séquences a été déterminée par le serveur web d'analyse de blast du National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>).

3.4.6. Analyses de la structure des communautés bactériennes

L'analyse phylogénétique des bactéries a été réalisée par alignement des séquences d'ADN (340 paires de bases) à l'aide du programme d'alignements multiples CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) du logiciel BioEdit Sequence alignment Editor. Le dendrogramme a été construit grâce aux programmes DNADIST-NEIGHBOR-SEQBOOT-CONSENSE du logiciel PHYLIP 3.65 (Feselstein, 1989). La matrice des distances obtenue a été ensuite utilisée pour réaliser des arbres des plus proches voisins (neighbor-joining trees) qui ont été traités avec le logiciel TREE VIEW.

L'analyse des gels de TTGE a porté sur l'analyse des bandes d'ADN observées sur le gel. Des matrices de présence/absence de bandes ont été réalisées pour chacun des gels à l'aide d'échantillons communs. Ces matrices ont ensuite fait l'objet d'analyses en composantes multidimensionnelles (MDS) (§ 3.5.2).

3.5. Analyses Statistiques

3.5.1. Analyses de la variance

La normalité des données a été testée pour chaque échantillon avec le test de Shapiro-Wilk de seconde espèce adapté aux petites séries d'échantillons ($n \geq 3$). Le risque α pris pour accepter l'hypothèse de normalité a été $\alpha = 0,05$.

L'homogénéité des variances a été analysée avec le test de Bartlett à partir du logiciel XStat (Microsoft). Le risque α pris pour accepter l'hypothèse d'égalité des variances a été $\alpha = 0,05$. Si la majorité des échantillons suivaient une loi normale et que l'homogénéité des variances a été respectée alors il a été possible de réaliser une analyse de la variance (ANOVA).

Une comparaison multiple par paire a été réalisée avec le test de Newman-Keuls à partir du logiciel XStat. La comparaison par paire permettait de classer les échantillons par groupes « a, b et c » significativement différent avec un risque α égal à 0,05. Les échantillons notés « ab » appartenaient aux groupes « a » et au groupe « b ».

3.5.2. Analyses multidimensionnelles de la structure des communautés bactériennes

Après avoir converti les bandes des gels TTGE sous forme d'une matrice binaire (présence/absence), une matrice de dissimilarité a été réalisée selon des distances de Jaccard à l'aide du logiciel XStat (Microsoft). Cette matrice de distance a ensuite été analysée par analyse multidimensionnelle (MDS) à l'aide du logiciel XStat (Microsoft) avec une limite de Kruskal de 0,246.

3.5.3. Représentations graphiques

Les graphiques représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne pour chaque série d'échantillon avec des effectifs de 3 à 5 répétitions.

Erreur standard de la moyenne = écart-type / racine (n)

4. Etude en dispositifs à compartiments de l'effet du gradient racinaire de ray-grass sur le devenir du phénanthrène dans du sable et les bactéries dégradantes

Un gradient a été montré dans la dégradation du phénanthrène en fonction de la distance à de la racine (Corgié *et al.*, 2003; Joner et Leyval, 2003). Les sections les plus proches de la racine présentaient une plus grande proportion de bactéries dégradantes cultivables dans la population totale que les sections les plus éloignées et ce même en absence de phénanthrène (Corgié *et al.*, 2006 a). Cependant les sections les plus rhizosphériques et les sections non plantées présentaient les mêmes taux de dégradation du phénanthrène. Au vu du ralentissement de la dégradation dans la section la plus éloignée du tapis racinaire, les auteurs ont supposé un possible artéfact lié à la respiration racinaire. Pour compléter ces travaux, les compartiments latéraux des dispositifs à compartiments ont été modifiés dans notre expérience. L'objectif de cette expérience a été, avec ces dispositifs modifiés, d'étudier l'effet de la proximité de la racine et l'influence de l'âge des plantes et du temps d'incubation sur la dégradation du phénanthrène et la présence des gènes codant pour des HAP-dioxygénases.

4.1. Description de l'expérience

4.1.1. Dispositifs à compartiments

L'expérience a été menée dans des dispositifs à compartiments plantés et non plantés (§ 3.2.4.1). Après sept semaines de culture en chambre phytotronique, les racines de ray grass (*Lolium perenne*, L.) formaient un tapis racinaire compact dans le compartiment central. Deux compartiments latéraux (§ 3.2.4.1.3) ont alors été introduits dans chaque compartiment central au contact du tapis racinaire. Après une période d'incubation de 3 et 6 semaines, chaque compartiment latéral a été découpé en sections de 3 mm d'épaisseur. Les sections ont été notées (0-3 mm), (3-6 mm) et (6-9 mm) en fonction de la distance du tapis racinaire.

Les compartiments latéraux contenaient un mélange de sable de Fontainebleau et de sable fin (§ 3.1.1.1). Ce mélange de sables a été artificiellement contaminé avec du phénanthrène (500 µg. g⁻¹) (§ 3.1.2). L'inoculum bactérien provenait de la terre de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons. Les bactéries ont été extraites par filtrations successives (§ 3.1.4). L'inoculum bactérien a été dilué pour obtenir une concentration finale de 10⁶ bactéries par gramme de sable. La solution nutritive de Hewitt (§ 3.2.4.1.5) a été mélangée aux sables pour atteindre 80 % de la capacité de rétention en eau (11,7 mL /100 g de sable).

Les compartiments latéraux ont été placés au contact des tapis racinaires pendant 3 et 6 semaines puis ont été remplacés par de nouveaux compartiments. Trois séries de compartiments latéraux se sont succédées sur les mêmes dispositifs (Tableau 16). Les échantillons de sable mis en contact avec des plantés âgés de 7 semaines avec un temps d'incubation de 3 semaines ont été notés 7/3 sem. Les traitements ont été réalisés avec 3 répétitions.

Tableau 16 : Âge des plantes en fonction du temps d'incubation des compartiments latéraux (semaines) des 6 séries d'échantillons utilisées.

Temps d'incubation	Âge des plantes (semaines)			
	7	10	13	19
3 semaines	7/3 sem	10/3 sem	13/3 sem	
6 semaines	7/6 sem		13/6 sem	19/6 sem

4.1.2. Analyses de l'expérience en dispositifs à compartiments avec le sable

Le phénanthrène a été extrait à l'hexane (§ 3.3.4.1.3) puis analysé par HPLC (§ 3.3.4.3.3). Il a été analysé dans les trois sections rhizosphériques (0-3 mm, 3-6 mm et 6-9 mm) et dans la section non plantée (NP, 3-6 mm) pour les 6 séries d'échantillons. Le dosage du carbone organique dissous (§ 3.3.2) et la quantification des gènes d'ARNr 16S et de HAP-dioxygénase (§ 3.4.3) ont été réalisés dans les sections rhizosphériques (0-3 mm) et (6-9 mm) et non plantées (NP) sur quatre séries d'échantillons (7/3 sem, 7/6 sem, 13/3 sem et 19/6 sem). Des gels d'électrophorèse TTGE (§ 3.4.4) ont été réalisés sur les quatre séries d'échantillons en croisant des échantillons communs. Les fragments d'ADN codant l'ARNr 16S ont été séquencés puis identifiés (§ 3.4.4.1). Une analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée individuellement dans chaque série d'échantillons (n = 3), mais aussi sur l'ensemble des données (n=18) pour mettre en évidence un effet du gradient racinaire. L'effet global du temps d'incubation a été analysé indépendamment des sections et de l'âge des plantes (n = 18 par temps d'incubation). L'influence de l'âge de la plante a été analysé indépendamment du temps de contact et des sections plantées 0-3 mm et 6-9 mm (n = 6).

4.2. Résultats

4.2.1. Carbone organique dissous

Les concentrations de carbone organique dissous ont été comprises entre 17 et 36 $\mu\text{g. g}^{-1}$ mais n'étaient pas significativement différentes entre les sections rhizosphériques (0-3 mm et 6-9 mm) et non plantées en fin d'incubation. Des essais préalables ont montré que les cristaux de phénanthrène n'étaient pas détectés dans l'eau. Le carbone organique dissous dans le sable avait pour origine les métabolites du phénanthrène et les exsudats libérés par la racine. La concentration en carbone organique a diminué significativement entre 3 et 6 semaines sur l'ensemble des données ($n = 18$). Le carbone organique dissous a diminué dans les sections rhizosphériques (0-3 mm et 6-9 mm) entre 3 et 6 semaines avec des plantes âgées de 7 semaines (7/3 sem et 7/6 sem) (Figure 10). Les sections (0-3 mm) des plantes les plus âgées n'ont pas présenté de différence significative en carbone organique dissous, les séries 13/3 sem et 19/6 sem ont en effet libéré respectivement $29,8 \pm 10,4 \mu\text{g. g}^{-1}$ et $23,3 \pm 4,8 \mu\text{g. g}^{-1}$.

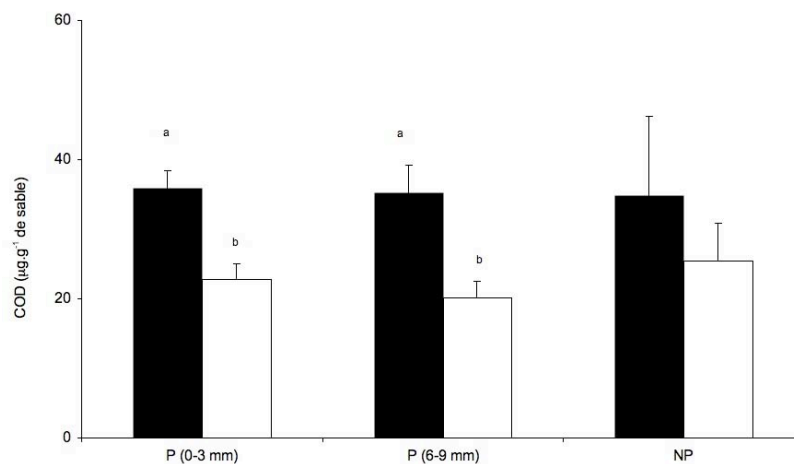


Figure 10 : Concentration du carbone organique dissous (COD) dans le sable ($\mu\text{g. g}^{-1}$) après 3 semaines (■) et 6 semaines (□) d'incubation avec des plantes âgées de 7 semaines (échantillons 7/3 sem et 7/6 sem) et des dispositifs non plantés (NP). Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$) entre les traitements.

4.2.2. Dégradation du phénanthrène

Globalement, la dégradation du phénanthrène a suivi un gradient racinaire et a diminué à mesure de l'éloignement de la racine (6 séries; n = 18 par section) (Figure 11). Les sections plantées les plus lointaines (6-9 mm) ont montré un ralentissement significatif de la dégradation du phénanthrène ($59,0 \pm 19,7 \mu\text{g. g}^{-1}$). Les sections non plantées n'ont pas présenté de différence avec les sections les plus proches du tapis racinaire. La dégradation du phénanthrène a représenté 95 % de la quantité initiale dans les sections rhizosphériques 0-3 mm et non plantées.

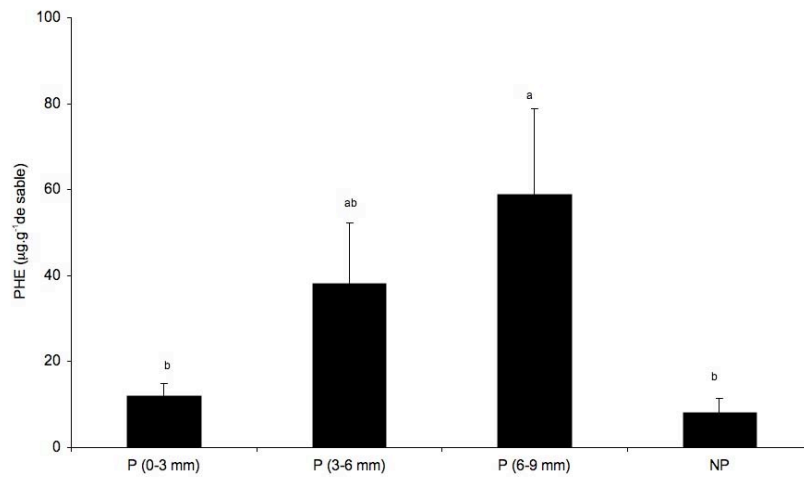


Figure 11 : Concentration du phénanthrène dans le sable ($\mu\text{g.g}^{-1}$) en fonction de la distance au tapis racinaire (moyenne et erreur standard des 6 séries d'échantillons; n = 18 par section). Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$) entre les traitements.

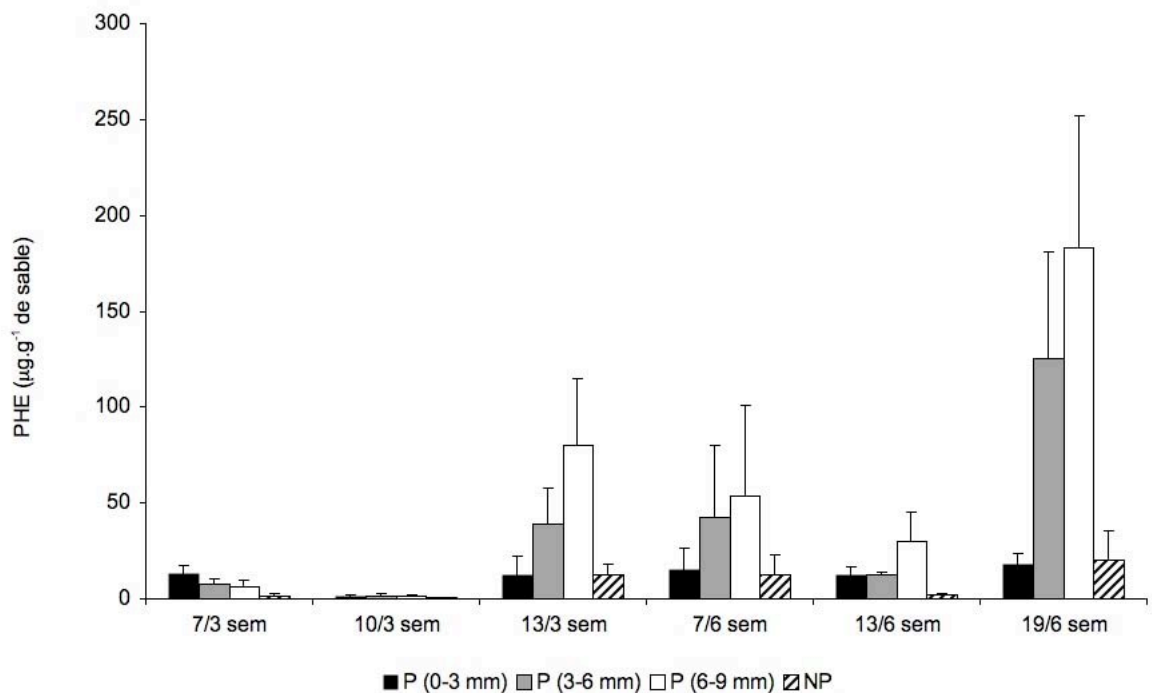


Figure 12 : Concentration en phénanthrène dans les sections rhizosphériques (0-3, 3-6 et 6-9 mm) et non rhizosphériques (NP) après 3 et 6 semaines de contact dans les 6 séries d'échantillons. Les plantes utilisées étaient âgées de 7, 13 et 19 semaines.

Les sections non plantées (NP) des six séries (Figure 12) n'ont pas montré de différence significative entre 3 et 6 semaines (respectivement $4,8 \pm 2,5 \mu\text{g. g}^{-1}$ et $11,6 \pm 6,0 \mu\text{g. g}^{-1}$) indiquant ainsi que la dégradation du phénanthrène s'est majoritairement produite pendant les 3 premières semaines.

Les compartiments latéraux incubés sur les plantes âgées de 7, 10 et 13 semaines ont montré des concentrations en phénanthrène résiduel non différentes. Mais lorsque les compartiments ont été incubés sur des plantes âgées de 19 semaines, la concentration résiduelle en phénanthrène a été significativement plus élevée en comparaison des plantes âgées de 7, 10 et 13 semaines. Dans les trois sections rhizosphériques des plantes âgées de 19 semaines, elle a été de $108,7 \pm 35,3 \mu\text{g. g}^{-1}$ de sable.

4.2.3. Quantification des gènes codant pour l'ARNr 16S et les HAP-dioxygénases

Après 3 semaines d'incubation, le nombre de copies du gène ARNr 16S a varié entre 10^7 et 10^9 copies.g⁻¹ de sable. Le nombre de copies du gène de HAP-dioxygénase de bactéries à Gram négatif (HAP-diox GN) a été 1000 fois plus élevé que celui du gène de dégradation appartenant à des bactéries Gram positives (HAP-diox GP), respectivement 9×10^7 copies.g⁻¹ et 7×10^4 copies.g⁻¹ de sable (Figure 13). L'analyse globale des quatre séries d'échantillons (n = 12) n'a pas montré de différence significative dans le nombre de copies des

gènes ARNr 16S et HAP-diox GN entre les sections rhizosphériques et non plantées. Il en a été de même pour les analyses séparées des séries d'échantillons. Toutefois, dans la section 6-9 mm de la série 7/3 sem, le nombre de copies de gènes HAP-diox GP a été significativement plus élevé que dans les sections plantées 0-3 mm. Et pour la série 19/6 sem, les nombres de copies de gènes HAP-diox GN et GP ont été significativement plus élevés dans la section 6-9 mm que dans les sections plantées 0-3 mm et la section non plantée (Figure 13).

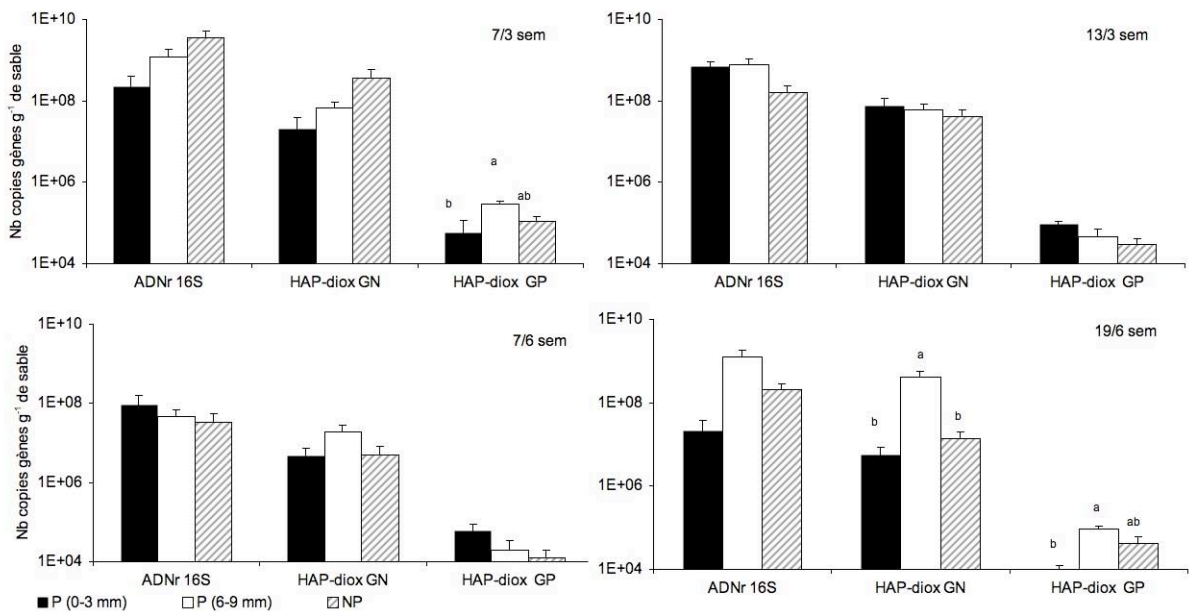


Figure 13 : Effet du gradient racinaire sur le nombre de copies des gènes ARNr 16S, HAP-diox GN, HAP-diox GP dans les sections rhizosphériques 0-3 mm, 6-9 mm et non plantées (NP) après 3 et 6 semaines d'incubation des compartiments latéraux de plantes âgées de 7, 13 et 19 semaines. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$) entre les traitements.

Les nombres de copies des gènes ARNr 16S, HAP-diox GN et HAP-diox GP tendaient à diminuer entre 3 et 6 semaines. Mais seul le nombre de copies de gènes HAP-diox GP a présenté une réduction significative pour les sections rhizosphériques (6-9 mm) et non plantées dans les échantillons 7/3 sem et 7/6 sem (Figure 14). Les séries 13/3 sem et 19/6 sem ont présenté une même tendance à la diminution du nombre de gènes (ARNr 16S, HAP-diox GN, HAP-diox GP).

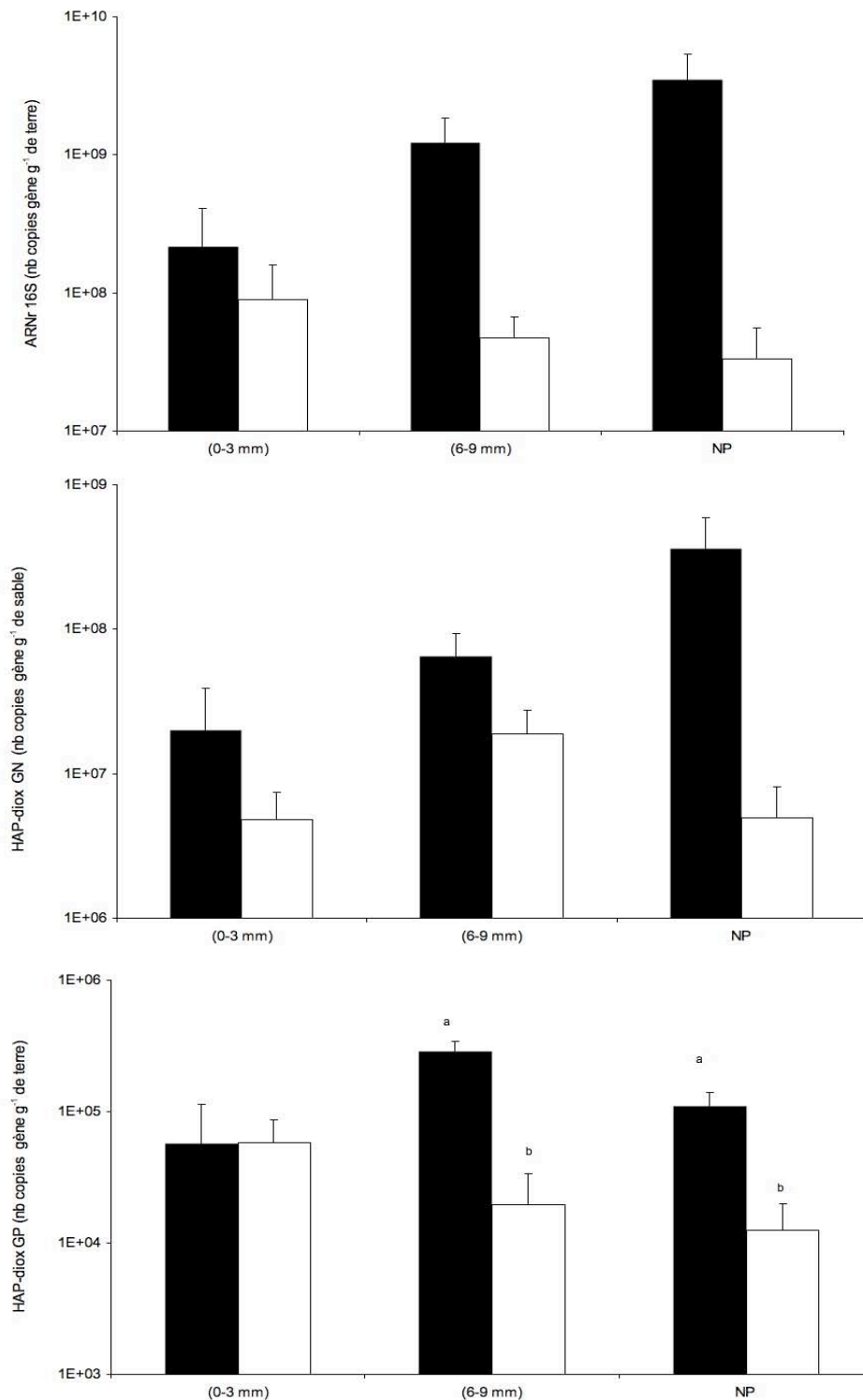


Figure 14 : Effets du temps de contact des compartiments latéraux à 3 semaines (■) et 6 semaines (□) sur le nombre de copies de gènes ARNr 16S, HAP-diox GN et HAP-diox GP par g⁻¹ de sable dans les sections rhizosphériques (0-3 mm), (6-9 mm) et non rhizosphériques (NP) avec des plantes âgées de 7 semaines. Deux lettres différentes indiquent une différence significative (P<0,05) entre les traitements.

La proportion de bactéries dégradantes dans la population bactérienne totale a été estimée par le rapport du nombre de copies des gènes de dégradation (HAP-diox GN et GP) sur le nombre de copies de gène ARNr16S. Au début de l'expérience, l'inoculum bactérien a présenté une proportion de bactéries dégradantes dans la population totale de 4 %. Les proportions de bactéries dégradantes n'ont pas montré de différence significative entre les sections (n = 12). Le nombre de copies des gènes ARNr 16S, HAP-diox GN et HAP-diox GP a diminué significativement au cours du temps, mais la proportion de bactéries dégradantes à Gram négatif (HAP-diox GN / ARNr 16S) a augmenté significativement de 3 à 6 semaines (n = 18). Uniquement dans les sections plantées (0-3 mm et 6-9 mm), la proportion de bactéries dégradantes a augmenté significativement de $8,8 \pm 2,1$ % à $34,1 \pm 7,1$ (n = 12) entre 3 et 6 semaines. Globalement, les sections rhizosphériques (n = 6) des plantes les plus âgées (19 semaines) contenaient un pourcentage de gènes HAP-diox GN significativement plus élevé que les plantes plus jeunes (7 semaines) alors que le nombre de copies du gène ARNr 16S n'était pas différent. L'âge des plantes a semblé augmenter la proportion de bactéries dégradantes possédant le gène HAP-diox GN à proximité du tapis racinaire (0-3 mm) sans être toutefois significatif (Figure 15).

L'analyse individuelle des données de la série 19/6 sem a montré que le pourcentage de gène HAP-diox GN a été significativement plus élevé dans les sections rhizosphériques (0-3 mm) (55 %) que dans les témoins non plantés (NP) (6 %). Cependant l'inverse a été observé dans la série d'échantillons 13/3 sem, où le pourcentage de gènes de dégradation a été significativement plus élevé dans la section non plantée (Figure 15).

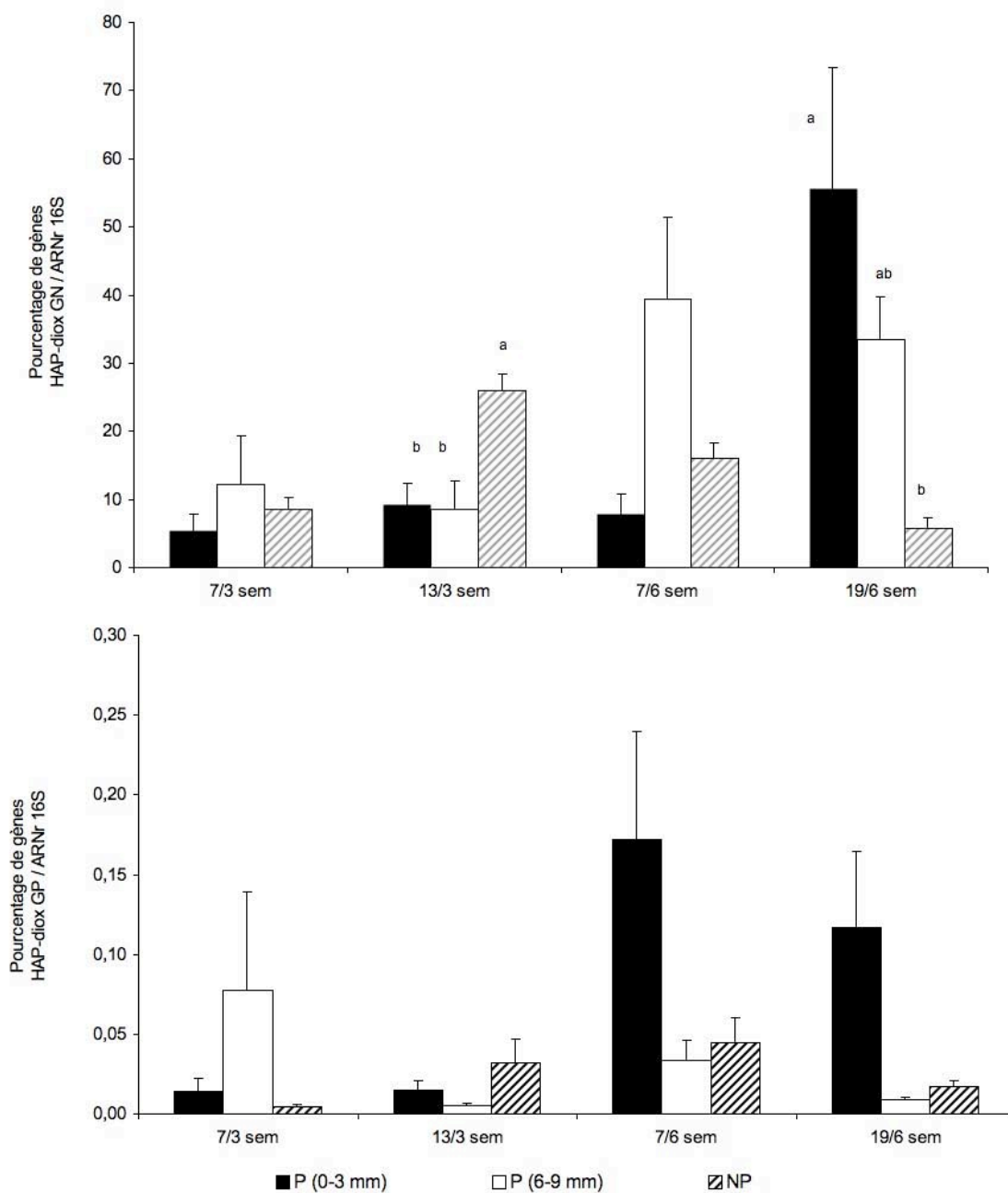


Figure 15 : Pourcentage de gènes HAP-diox GN et HAP-diox GP par rapport au gène ARNr 16S dans les sections rhizosphériques 0-3 mm, 6-9 mm et non plantées (NP) après 3 ou 6 semaines d'incubation des compartiment latéraux sur des plantes âgées de 7, 13 et 19 semaines. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$) entre les traitements.

4.2.4. Structure des communautés bactériennes

L'analyse de la structure des communautés par électrophorèse TTGE a montré des profils proches pour les séries d'échantillons 7/3 sem, 13/3 sem, 7/6 sem et 19/3 sem. Les gels de TTGE ont présenté peu de bandes comme le montre le gel de la série 13/3 sem (Figure 16). Ces bandes ont été séquencées et la comparaison avec des banques de données a permis de les identifier. La bande (I.8) n'est apparue que dans les échantillons rhizosphériques. Cette bande correspond à une espèce de *Burkholderia* sp.. D'autres bandes ont été identifiées comme correspondant aux espèces *Herbaspirillum* sp., *Microbacterium* non-cultivable et *Ralstonia* sp (Tableau 17).

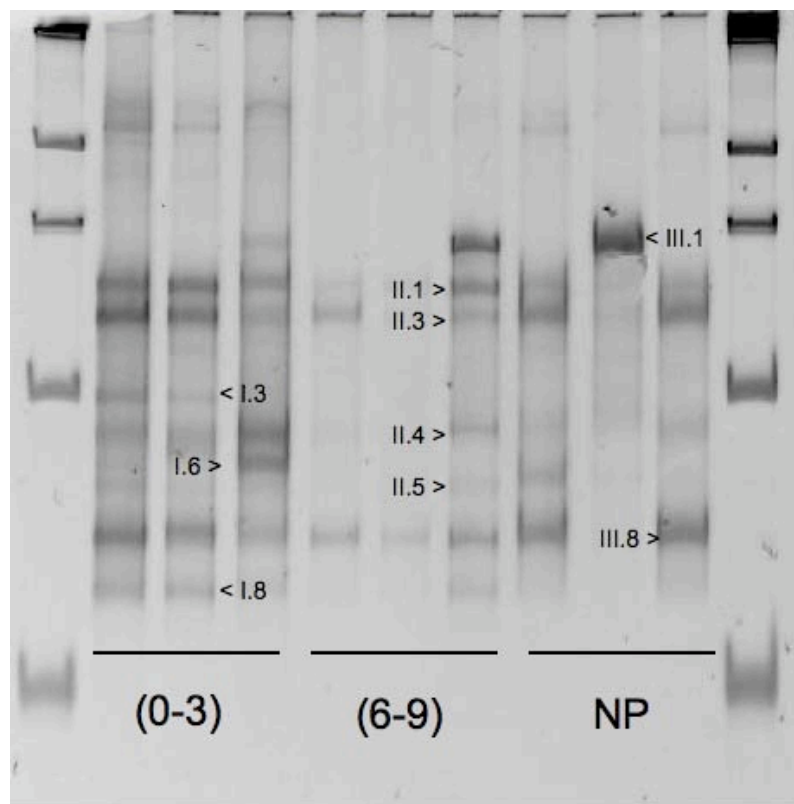


Figure 16 : Profil TTGE des communautés bactériennes dans les sections rhizosphériques (0-3, et 6-9) et non plantées (NP) pour des plantes âgées de 13 semaines et un temps de contact des compartiments latéraux de 3 semaines (13/3 sem).

Tableau 17 : Identification des espèces bactériennes de la série 13/3 sem.

Bandes	Espèces	N°accession	Recouvrement
I.3	<i>Herbaspirillum sp.</i>	AY367037	99%
I.6	<i>Uncultured Microbacterium sp.</i>	AM936863	96%
I.8	<i>Burkholderia sp.</i>	EU723088	100%
II.1	<i>Uncultured soil bacterium</i>	FJ184331	99%
II.3	<i>Uncultured Herbaspirillum sp.</i>	AM936250	100 %
II.4	<i>Ralstonia sp.</i>	EU375662	98%
II.5	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	AJ491845	99%
III.1	<i>Uncultured soil bacterium</i>	EU703536	99%
III.8	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ884202	98%

Les profils des communautés ont été analysés par analyse multidimensionnelle (multidimensional scaling) qui montre que deux groupes tendaient à se différencier, l'un majoritairement composé d'échantillons plantés, l'autre d'échantillons non plantés (NP) (Figure 17). L'âge des plantes n'a pas contribué à discriminer la structure des communautés bactériennes.

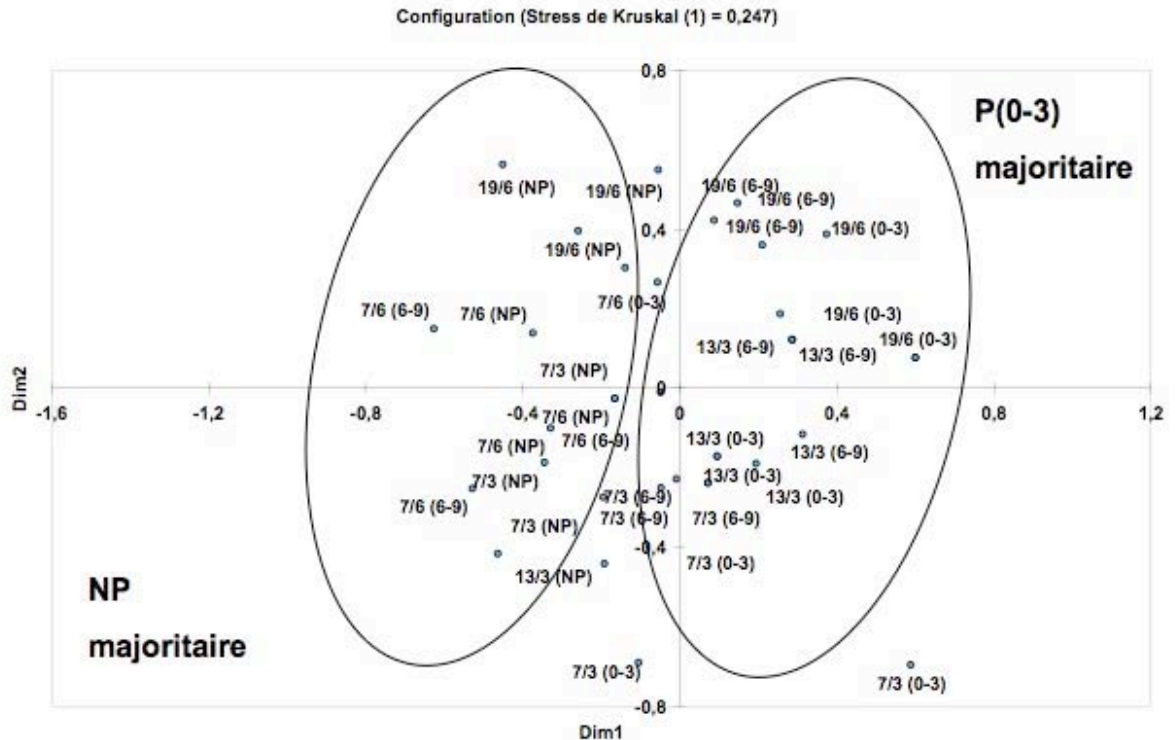


Figure 17 : Analyse multidimensionnelle à partir de la présence/absence des bandes d'ARNr 16S sur les profils de TTGE des quatre séries d'échantillons (7/3, 7/6, 13/3, 19/6 sem).

4.3. Discussion

4.3.1. Gradients racinaires

Les résultats de cette expérience ont montré que la dégradation du phénanthrène a diminué à mesure de l'éloignement du tapis racinaire. Elle a été supérieure dans la section rhizosphérique (0-3 mm) comparée à la section rhizosphérique (6-9 mm). Joner et Leyval (2003) et Corgié *et al.*, (2003) ont précédemment montré ce gradient de dégradation des HAP en fonction de la distance aux racines. Cependant, les concentrations en phénanthrène résiduel étaient similaires dans les sections plantées (0-3 mm) et non plantées. Corgié *et al.* (2003) avaient antérieurement observé ce phénomène. Les auteurs ont supposé un manque d'oxygène dans les sections les plus éloignées de la racine dû aux respirations microbiennes et racinaires. En effet l'oxygène est nécessaire pour ouvrir le cycle aromatique des HAP (Resnick *et al.*, 1996). Cependant, dans notre expérience, des mesures compensatoires avaient été prises pour augmenter la diffusion de l'oxygène. Les compartiments latéraux ont été modifiés en réduisant leur longueur de 6 à 3 cm et l'extrémité du compartiment latéral a été fermée par un film perméable aux gaz à la place de la paroi étanche. Une autre hypothèse pourrait expliquer cette absence d'effet rhizosphérique sur la prolifération bactérienne : le taux d'humidité. En effet, l'alimentation en eau du compartiment central a été réalisée à partir d'un réservoir de solution nutritive. L'eau montait par capillarité

dans le compartiment latéral via le compartiment central qui a été au maximum de la capacité de rétention en eau dans les dispositifs non plantés. Le taux d'humidité d'un sol peut être le facteur limitant de la dégradation des HAP (Bengtsson et Zerhouni, 2003). En présence de plantes, les racines ont rempli entièrement le compartiment central et ont prélevé près de 500 mL d'eau par semaine. Ainsi le taux d'humidité dans les compartiments latéraux a pu être réduit par évapotranspiration et limiter la biodégradation. D'autres essais non présentés et réalisés sur des temps plus longs (9 semaines de contact) ont montré des taux d'humidité entre 30 et 60 % à proximité du tapis racinaire. Ces résultats pourraient aussi expliquer la diminution de la quantité de gènes entre 3 et 6 semaines. Ainsi, les dispositifs à compartiments avec et sans plantes pourraient ne pas être comparables quant à l'évolution du taux d'humidité.

La concentration en carbone organique dissous dans le compartiment latéral n'était pas différente entre les sections rhizosphériques et non plantées. Le sable du compartiment latéral contenait au début de l'expérience 500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de phénanthrène, constitué de 94 % de carbone, soit 470 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de carbone non détectable en solution, le phénanthrène étant peu soluble (1,1 mg.L^{-1}). La concentration de carbone organique autour de 30 $\mu\text{g. g}^{-1}$ retrouvée en fin d'expérience pourrait correspondre aux métabolites de dégradation du phénanthrène. D'autre part, d'après les résultats de Hodge *et al.* (1998), la quantité de carbone organique total libérée par des jeunes plantules de ray-grass peut être estimée à 5 $\mu\text{g. g}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$. Dans notre expérience, les plantes étaient plus âgées, mais la diffusion des exsudats a été limitée par la surface du tapis racinaire (9,5 cm^2) et seule la fraction soluble de carbone a été analysée dans les compartiments latéraux. Cette estimation suggère que le carbone provenant des métabolites du phénanthrène a pu être responsable de la majeure partie du carbone organique dissous mesuré dans le sable, ce qui masquerait le carbone apporté par les exsudats racinaires. Des mesures de carbone organique total ou un suivi de composés spécifiques exsudés comme des acides organiques et des mesures cinétiques auraient peut-être permis de quantifier les exsudats dans les compartiments latéraux.

Le nombre de copies de gène codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal 16S n'a pas montré de gradient racinaire dans les séries d'échantillons 7/3 sem, 7/6 sem, 13/3 sem et 19/6 sem. Le rapport R/S, nombre de bactéries dans la Rhizosphère rapporté à celui dans le Sol, a été utilisé pour mettre en évidence l'effet rhizosphérique (Katznelson, 1946). Nous l'avons calculé ici en utilisant le nombre de copies de gène dans le sable des dispositifs plantés (0-3 mm) et non plantés. Dans les 4 séries d'échantillons, le rapport R/S était compris entre 0,06 et 5 (Tableau 18). Ces valeurs sont assez faibles par rapport à celles disponibles dans la littérature qui montrent des rapports de 5 à 100 (Liste et Prutz, 2006; Muratova *et al.*, 2003; Nichols *et al.*, 1997). Toutefois, les valeurs de la littérature correspondaient le plus souvent à des bactéries cultivables et non à des nombres de copies de gènes. Des études sur la quantification de l'ARNr 16S, par PCR en temps réel, ont montré des rapports R/S inférieurs à 2 (Da Silva *et al.*, 2006; Stubner, 2004). Il faut cependant noter que ce rapport R/S variait avec l'âge de la plante et le temps de contact des compartiments latéraux.

Tableau 18 : Rapport du nombre de copies des gènes dans les sections rhizosphériques (0-3) et non plantées (R/S).

R(0-3)/S	ARNr 16S	HAP-diox GN	HAP-diox GP
7/3 sem	0,06	0,06	0,5
13/3 sem	4,3	1,8	3,1
7/6 sem	2,7	1,0	4,7
19/6 sem	0,1	0,4	0,2

Les profils de gels TTGE ont montré des structures de communautés différentes entre les sections plantées et non plantées. Parmi les espèces bactériennes dominantes identifiées, *Burkholderia* sp est apparue uniquement dans les échantillons rhizosphériques. Cette espèce a antérieurement été isolée à partir d'un sol rhizosphérique (DeAngelis *et al.*, 2008). *Pseudomonas* sp. était présente dans l'ensemble des sections plantées ou non des dispositifs à compartiments. Ce genre bactérien ubiquiste a antérieurement été montré pour être rhizosphérique (Rangel-Castro *et al.*, 2005) et a été isolé à partir de sols contaminés en HAP (Aitken *et al.*, 1998; Daane *et al.*, 2001; Cébron *et al.*, 2009). Le genre *Herbaspirillum* a été montré pour être rhizosphérique (Olivares *et al.*, 1996; Palmroth *et al.*, 2007) et une espèce de ce genre a été capable de croître sur du naphthalène (Wilson *et al.*, 2003) et du phénanthrène (Vacca *et al.*, 2005). *Ralstonia* sp. a antérieurement été décrite pour sa capacité à dégrader divers polluants organiques (Kanaly *et al.*, 2000; Singleton *et al.*, 2008), de même que *Achromobacter xylooxidans* (La Rosa *et al.*, 2006). Tous les genres identifiés ont été décrits comme capables de dégrader les HAP, ce qui est cohérent avec le milieu de culture sélectif utilisé dans notre expérience, composé de sable et de phénanthrène. Les espèces bactériennes identifiées sont majoritairement Gram négatives ce qui est cohérent avec les résultats obtenus en PCR en temps réel où le nombre de copies des gènes codant une HAP-dioxygénase de bactéries à Gram négatif était largement plus élevé que celui des Gram positives.

4.3.2. Effet du temps de contact sur les bactéries totales et dégradantes

Les compartiments latéraux des séries 7/3 sem et 7/6 sem ont été incubés avec des plantes du même âge pour comparer l'effet du temps de contact sur les populations bactériennes totales et dégradantes. Dans les modalités plantées (0-3 mm) et non plantées, le phénanthrène a été majoritairement dégradé dès le prélèvement après trois semaines. Le phénanthrène a été la seule source de carbone dans la modalité non plantée et le nombre de copies du gène ARNr 16S a diminué environ 105 fois entre les deux temps de prélèvements, ce qui peut être expliqué par la diminution de la source de carbone.

La proximité du tapis racinaire n'a pas conduit à une quantité de copies d'ARNr 16S plus importante que dans les témoins après 3 semaines ($R/S = 0,06$, Tableau 18) alors qu'un effet rhizosphérique a été observé après 6 semaines d'incubation ($R/S = 2,7$). Dans la modalité plantée, les bactéries ont disposé de deux sources de carbone : le phénanthrène et les exsudats racinaires. Malgré une diminution rapide de la quantité de phénanthrène (dès 3 semaines), la plante a semblé favoriser davantage le maintien des populations bactériennes hétérotrophes et dégradantes après trois semaines puisque les 3 rapports R/S (gènes ARNr 16S, HAP-diox GN et GP) ont augmenté entre 7/3 et 13/3 (Tableau 18). Les bactéries possédant des gènes codant une HAP-dioxygénase ont semblé mieux se maintenir dans le temps en présence de plantes et ce malgré une concentration en phénanthrène résiduelle très faible. La présence de la plante a été précédemment montrée pour stimuler les bactéries capables de dégrader les HAP (Joner et Leyval, 2003; Parrish *et al.*, 2005; Corgié *et al.*, 2006 a; Chiapusio *et al.*, 2007). Néanmoins, ces résultats suggèrent un décalage entre la cinétique de dégradation du phénanthrène et la cinétique de diffusion des exsudats racinaires. Les exsudats racinaires ont stimulé la microflore au-delà de trois semaines. Or la cinétique de dégradation du phénanthrène a été rapide et s'est déroulée principalement en moins de trois semaines. Une des raisons de cette dégradation rapide a pu être que le phénanthrène a présenté peu d'interactions avec la surface du sable, ce qui le rendait facilement accessible pour les bactéries dégradantes. D'autres études ont aussi montré une cinétique de dégradation du phénanthrène fraîchement ajouté de quelques jours (Miya et Firestone, 2001; Xu *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'inoculum bactérien extrait à partir du sol contaminé de Neuves-Maisons possédait des gènes de HAP-dioxygénases (Cébron *et al.*, 2008), ces bactéries étaient donc potentiellement capables de dégrader des hydrocarbures aromatiques. L'origine de l'inoculum bactérien a pu jouer un rôle important dans l'efficacité à dégrader le phénanthrène. Les temps d'incubation de 3 et 6 semaines de cette expérience avaient été choisis à partir des résultats obtenus par Corgié (2003), mais n'ont pas semblé adaptés pour suivre les populations bactériennes dégradantes. Il pourrait être intéressant de suivre la cinétique de dégradation du phénanthrène dans la rhizosphère avec des temps de mesure plus courts, de l'ordre de quelques jours.

4.3.3. Effet du vieillissement de la plante

La concentration en phénanthrène résiduel n'a pas montré de différence avec l'âge des plantes, mais elle était déjà très faible avec des plantes de 7 semaines. La proportion de bactéries dégradantes dans la population totale (HAP-diox / ARNr 16S) a semblé plus importante lorsque la plante était plus âgée (Figure 15) alors que la quantité d'exsudats libérés par le ray-grass a semblé peu dépendante de l'âge de la plante (Meharg et Killham, 1990). Les exsudats racinaires du ray-grass contiennent des composés aromatiques (Hodge *et al.*, 1998) et les plantes plus âgées produisent plus de composés phénoliques que les plantes plus jeunes (Fletcher et Hegde, 1995). Les composés phénoliques, comme le salicylate, ont pu stimuler l'induction de HAP-dioxygénases (Kamath *et al.*, 2004; Ogunseitan *et al.*, 1991). Cependant, bien que le rapport R/S ait augmenté lorsque les plantes étaient âgées de 13 semaines avec un temps d'incubation de trois semaines, il a diminué lorsque les plantes étaient âgées de 19 semaines (Tableau 18). Ces résultats montrent peut être une limite de l'utilisation des dispositifs à compartiments sur une longue période de culture. En effet, les racines de ray-grass se renouvellent toutes les deux à quatre semaines (Forbes *et al.*, 1997). Le confinement des racines dans le compartiment central de 250 cm³ a pu limiter le renouvellement des racines mortes par des racines actives bien que les plantes soient demeurées vertes tout au long de l'expérience.

4.4. Conclusion

L'inoculum bactérien utilisé dans cette expérience a été bien adapté pour dégrader le phénanthrène et la cinétique de dégradation dans le sable a été rapide avant 3 semaines. Un gradient racinaire dans la dégradation du phénanthrène a été de nouveau observé dans cette expérience et le phénanthrène a été davantage dégradé à proximité de la racine. Cependant, les dispositifs à compartiments ont mis en évidence des processus rhizosphériques mal maîtrisés malgré des modifications apportées aux dispositifs. La section rhizosphérique la plus éloignée du tapis racinaire (6-9 mm) a ralenti la dégradation du phénanthrène par rapport aux sections rhizosphérique (0-3 mm) et non plantées.

Ces travaux ont confirmé des résultats antérieurs tout en apportant des résultats supplémentaires, notamment au niveau de la quantification de gènes de dégradation des HAP. Les plantes ont ainsi maintenu dans leur rhizosphère une population bactérienne potentiellement dégradante au cours du temps, même lorsque que la concentration de phénanthrène résiduel était faible. Les plantes les plus âgées ont semblé favoriser les bactéries possédant les gènes codant une HAP-dioxygénase. Cependant, les effets des exsudats racinaires sur la dégradation des HAP et sur le développement des bactéries possédant des gènes codant des HAP-dioxygénases restent à préciser.

5. Étude en dispositifs à compartiments de l'effet du gradient racinaire de ray-grass sur la dissipation des HAP dans une terre contaminée et les bactéries dégradantes

5.1. Objectif de l'expérience

Dans les travaux précédents (Corgié *et al.* 2003, Corgié *et al.*, 2006a, chapitre 4), les expériences ont été réalisées avec du sable artificiellement contaminé avec du phénanthrène, dans des conditions où celui-ci était très disponible. Les résultats ont montré un gradient racinaire dans la dégradation du phénanthrène. Le polluant a été davantage dégradé à proximité de la racine. Les plantes ont contribué au maintien d'une population bactérienne potentiellement dégradante au cours du temps, les plantes les plus âgées ont semblé favoriser les bactéries possédant les gènes codant pour une HAP-dioxygénase. Dans ce chapitre, en utilisant les mêmes dispositifs à compartiments, l'objectif a été d'étudier les bactéries possédant des gènes codant une HAP-dioxygénase et la dissipation des HAP dans la terre de Neuves-Maisons. Toutefois, comme des travaux précédents (Norini, 2007) ont montré que la biodégradation des HAP historiques était très faible lors d'une expérience de courte durée, un ajout de phénanthrène à cette terre historiquement contaminée a été réalisé dans une partie des compartiments pour stimuler la microflore dégradante et augmenter la dissipation. Ces dispositifs ont permis de suivre ces processus en fonction d'un gradient racinaire et la biodisponibilité des HAP. Les quantités des HAP totaux et labiles ont été appréhendées par deux méthodes d'extraction: l'une considérée comme exhaustive au dichlorométhane par extraction liquide sous pression, l'autre ménagée par la cyclodextrine (Reid *et al.*, 2000).

5.1.1. Description de l'expérience en dispositifs à compartiments avec de la terre polluée

L'expérience a été menée dans des dispositifs à compartiments plantés et non plantés (§3.2.4.1). Les compartiments latéraux contenaient un mélange de terre contaminée de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons (NM) et du sable (50/50 en masse). Deux modalités ont été réalisées, sans (NM) et avec (NM+PHE) ajout de

phénanthrène (§3.2.4.1.3). La terre a été artificiellement contaminée avec du phénanthrène ($500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Après sept semaines de culture en chambre phytotronique dans les conditions précédemment décrites (§ 3.2.4.1.4), les racines de ray-grass ont formé un tapis racinaire dense dans le compartiment central. Les compartiments latéraux contenant la terre contaminée avec ou sans PHE ajouté ont été placés contre les tapis racinaires (Tableau 19). Après 3 et 6 semaines d'incubation, chaque compartiment latéral a été découpé en sections de 3 mm d'épaisseur. Les sections ont été notées (0-3 mm), (3-6 mm) et (6-9 mm) en fonction de la distance au tapis racinaire.

5.1.2. Analyses

Les HAP ont été extraits par extraction liquide sous pression à l'hexane (§3.3.4.1.1) puis analysés par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur FID (§3.3.4.3.1) dans les trois sections rhizosphériques (0-3 mm, 3-6 mm et 6-9 mm) et dans la section non plantée (NP, 3-6 mm). Dans ce cas, seuls 11 des 16 HAP suivis ont pu être analysés. Le dosage du carbone organique dissous (§3.3.3), la quantité de HAP extraits par la solution de cyclodextrine (16 HAP) (§3.3.4.2.2), la quantification des gènes (§3.4.3) et des gels d'électrophorèse TTGE (§3.4.4) ont été réalisés dans les sections plantées (0-3 mm) et non plantées (NP). Les traitements ont été réalisés avec 3 répétitions puis analysés statistiquement (§3.5).

Tableau 19 : Modalités et effectifs des compartiments latéraux contenant de la terre contaminée de Neuves-Maisons sans (NM) et avec phénanthrène (NM+PHE).

Temps de contact des compartiments latéraux	NM		NM+PHE	
	Planté	NP	Planté	NP
3 semaines	3	3	3	3
6 semaines	3	3	3	3

5.2. Résultats

5.2.1. Carbone organique dissous

Les concentrations de carbone organique dissous dans la terre, mesurées dans la fraction hydrosoluble, ont été comprises entre 19 et 80 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Ces concentrations n'étaient pas significativement différentes entre les modalités plantées (0-3 mm) et non plantées (NP). L'ajout de phénanthrène (NM+PHE) n'a pas eu d'effet sur la concentration en carbone organique dissous par rapport à la modalité NM (Figure 18). La concentration de carbone organique dissous a diminué significativement entre 3 et 6 semaines dans la modalité avec ajout de phénanthrène (Figure 18b).

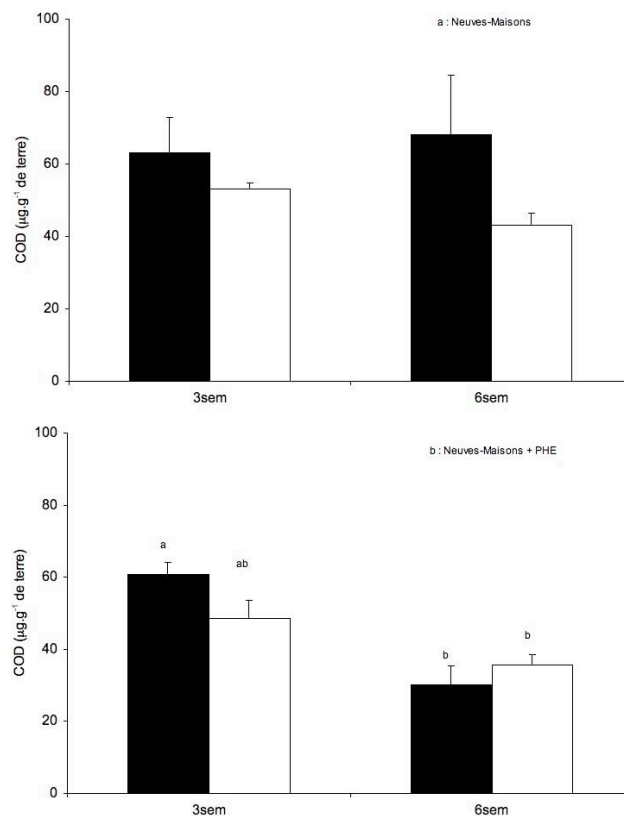


Figure 18 : Concentration du carbone organique dissous ($\mu\text{g.g}^{-1}$) dans les compartiments latéraux contenant de la terre contaminée de Neuves-Maisons sans (a) et avec (b) apport de phénanthrène dans les sections plantées (0-3) (■) et non plantées (NP) (□) (moyenne et erreur standard, n=3). Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$) entre les traitements.

5.2.2. Dissipation des HAP

5.2.2.1. Dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons

Dans le mélange de terre de Neuves-Maisons et de sable (NM), la concentration des 11 HAP au début de l'expérience était de $380 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (extraction à l'ASE). Après trois semaines d'incubation, la concentration des HAP a diminué de $60 \pm 5 \%$ par rapport à la concentration au début de l'expérience. La concentration des HAP n'a pas présenté de différence significative entre les sections rhizosphériques (0-3 mm), (3-6 mm), (6-9 mm) et non plantées (Figure 19a). Les concentrations des HAP entre 3 et 6 semaines n'ont pas présenté de différence significative à l'exception de celles de l'anthracène et des benzo(b,k)fluoranthènes qui étaient plus élevées à 6 semaines (Annexe 1 et 2). À 6 semaines, les concentrations du benzo(a)anthracène et du chrysène étaient significativement plus faibles dans les sections plantées que dans les sections non rhizosphériques ($P_{\text{b(a)ANT}} = 4 \pm 1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; $NP_{\text{b(a)ANT}} = 9 \pm 1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ et $P_{\text{CHY}} = 4 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; $NP_{\text{CHY}} = 6 \pm 0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) mais la somme des HAP à 4 cycles aromatiques n'était pas significativement différente (Figure 20a).

5.2.2.2. Dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons avec ajout de phénanthrène

Le mélange de terre contaminée et de sable avait une concentration initiale de phénanthrène de $30 \pm 4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Après ajout de phénanthrène, la quantité totale de phénanthrène (historique + ajouté) était de $480 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ au début de l'expérience. Après trois semaines d'incubation, la concentration totale de phénanthrène était de $81 \pm 24 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ et après six semaines de $55 \pm 14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dans les quatre sections confondues, ce qui a représenté une dissipation de 83 % et 89 % par rapport à la concentration initiale. La concentration des HAP autres que le phénanthrène a diminué de $60 \pm 9 \%$ après trois semaines. Cependant, aucun gradient rhizosphérique n'a été observé après trois semaines d'incubation et les concentrations des HAP de 3 et 4 cycles n'ont pas présenté de différence entre les sections (Figure 19a). De même, la concentration des onze¹ HAP n'a pas présenté de différence significative entre les sections après 6 semaines d'incubation, ni entre 3 et 6 semaines d'incubations (Figure 20b).

¹ HAP quantifiés en GC-FID : Acénaphthylène ; Acénaphthène ; Fluorène ; Phénanthrène ; Anthracène ; Fluoranthène ; Pyrène ; Benzo(a)anthracène ; Chrysène ; Benzo(b,k) fluoranthène ; Benzo (a)pyrène

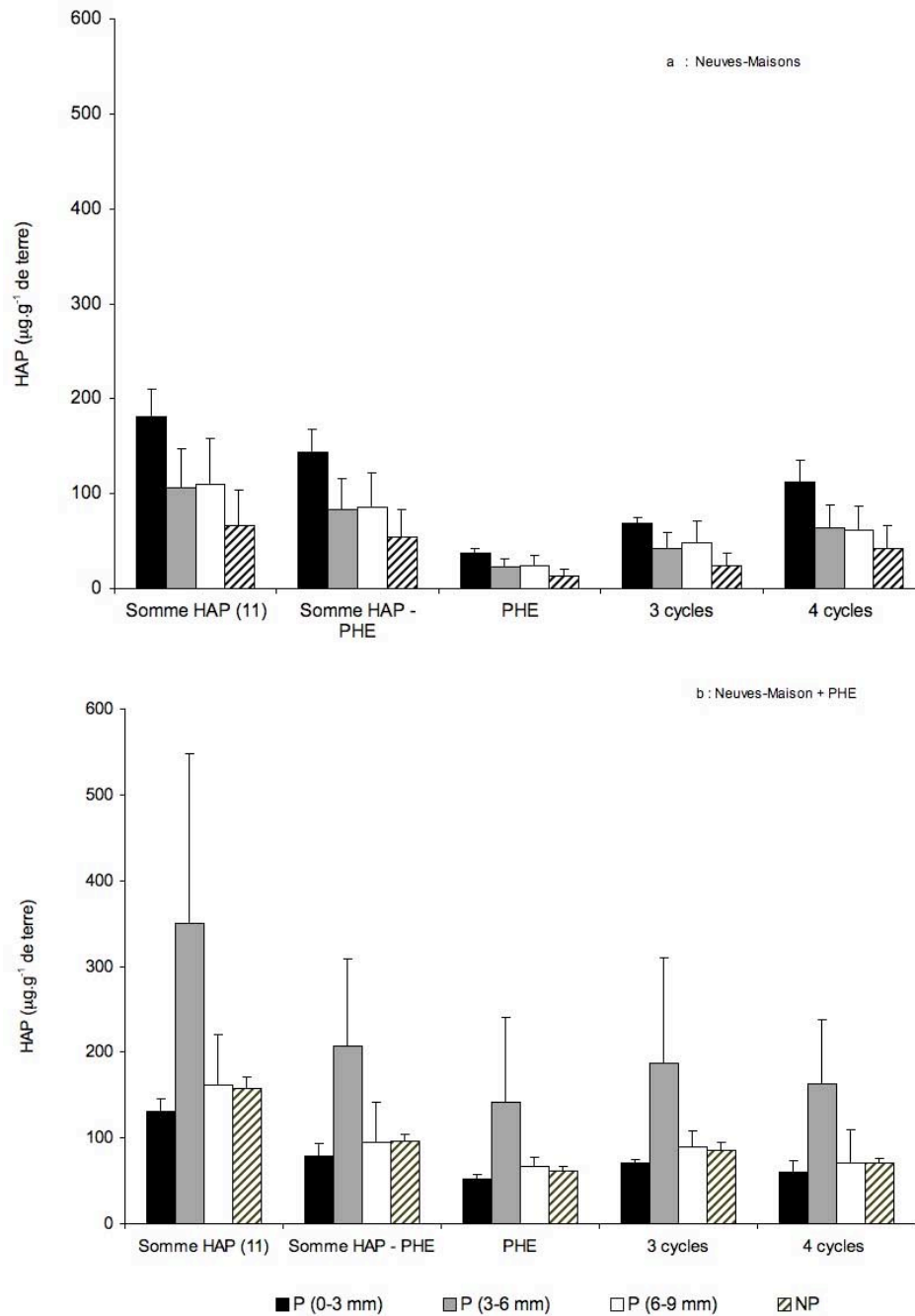


Figure 19 : Concentration en HAP ($\mu\text{g. g}^{-1}$) extractibles sous pression à l'hexane (ASE) dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons sans (a) et avec (b) ajout de phénanthrène dans les sections rhizosphériques (0-3, 3-6 et 6-9 mm) et non plantées (NP) après 3 semaines d'incubation.

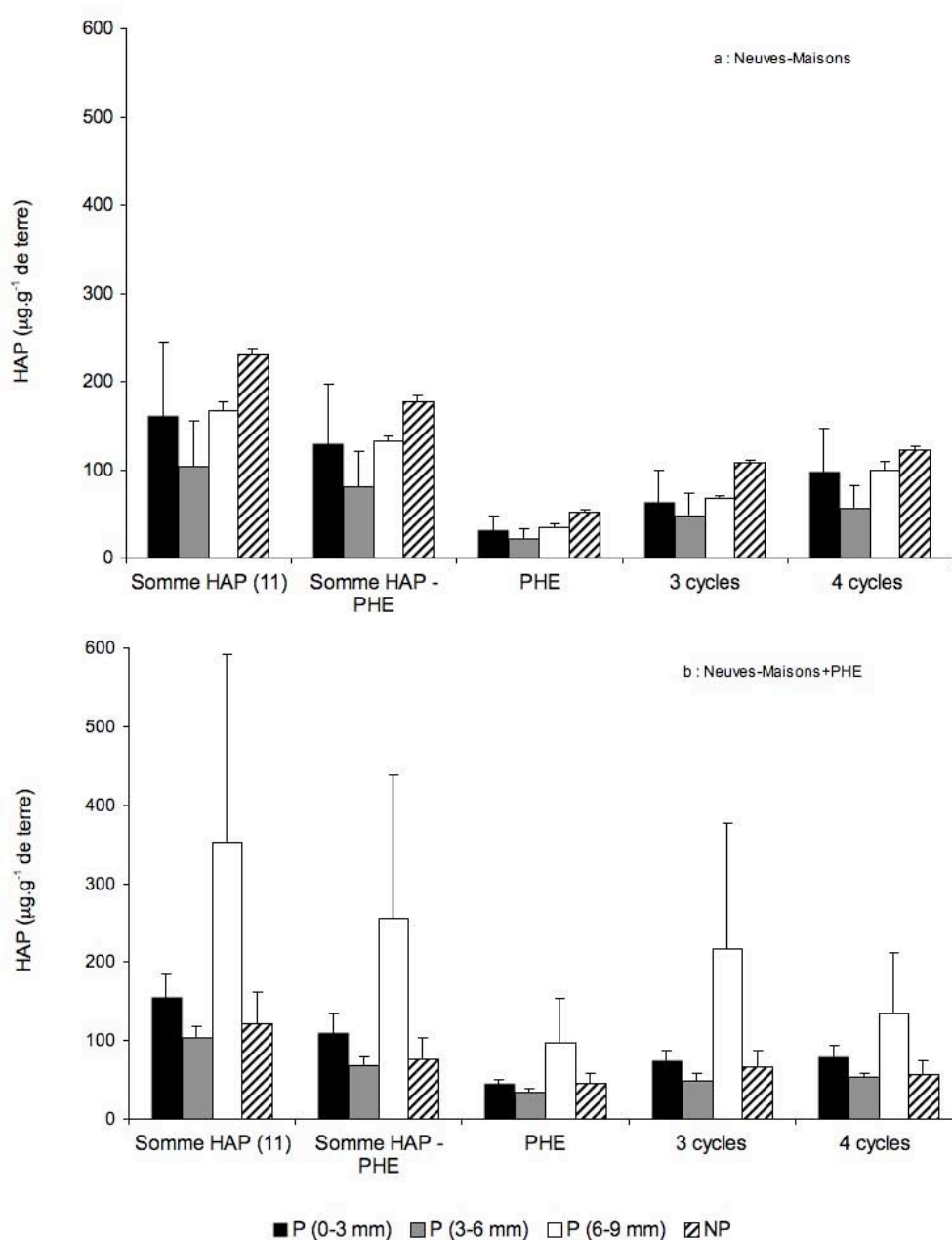


Figure 20 : Concentration en HAP ($\mu\text{g. g}^{-1}$) extractibles sous pression à l'hexane (ASE) dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons sans (a) et avec (b) ajout de phénanthrène dans les sections rhizosphériques (0-3, 3-6 et 6-9 mm) et non plantées (NP) après 6 semaines d'incubation.

5.2.3. Biodisponibilité des HAP

5.2.3.1. Dans les compartiments latéraux contenant de la terre de Neuves-Maisons

La concentration des 16 HAP extractibles à la cyclodextrine dans les compartiments latéraux à T_0 était de $54 \pm 2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de HAP. Après 3 semaines de contact des compartiments latéraux dans les dispositifs plantés, les concentrations des 16 HAP et des HAP à 2 cycles (naphtalène) et 3 cycles extractibles à la cyclodextrine ont été significativement plus élevés qu'à T_0 , tandis qu'après 6 semaines de contact, ces concentrations ont été significativement plus faibles qu'à 3 semaines et équivalentes à celles de T_0 (Figure 21a). Pour les HAP à 4 cycles, la concentration extractible à la cyclodextrine n'a pas été significativement plus élevée après 3 semaines qu'à T_0 , mais elle a été plus faible après 6 qu'après 3 semaines. Pour les HAP à 5 cycles, aucune différence significative n'a été observée en fonction du temps.

Avec les dispositifs non plantés, la même tendance à l'augmentation de concentration des HAP extractibles à la cyclodextrine par rapport à T_0 a été observée, mais elle n'était pas significative, sauf pour le HAP à 2 cycles (Figure 21a). Après 3 et 6 semaines, les sommes des seize HAP, et des HAP de trois et quatre cycles n'étaient pas significativement différentes entre les modalités plantées et non plantées malgré une tendance à des valeurs plus élevées dans la modalité plantée (Figure 21a).

5.2.3.2. Dans les compartiments contenant la terre de Neuves-Maisons avec ajout de phénanthrène

A T_0 la concentration de HAP extractibles à la cyclodextrine dans la terre de Neuves-Maisons avec ajout de phénanthrène (NM+PHE) était de $191 \pm 7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (Σ 16 HAP). Le phénanthrène représentait plus de la moitié des HAP extraits ($119 \pm 3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Par rapport au phénanthrène extrait à T_0 , seulement 14 % a été extractible à la cyclodextrine après 3 semaines d'incubation pour la modalité plantée et 8 % pour la modalité non plantée. L'ensemble des HAP a été significativement plus extrait à T_0 qu'après 3 et 6 semaines d'incubation. Le naphtalène a été significativement plus extrait à trois semaines qu'à six semaines (Figure 21b). Les quantités de phénanthrène et de benzo(a)pyrène extraites ont diminué significativement entre 3 et 6 semaines (Annexe 3 et 4). Au cours de l'expérience, les concentrations extraites n'ont pas présenté de différence significative entre les sections plantées et non plantées (Figure 21b).

Les concentrations des HAP (autres que le phénanthrène) extractibles à la cyclodextrine à T_0 ont été significativement plus élevées dans la modalité avec ajout de phénanthrène (NM+PHE) que dans la modalité sans phénanthrène (NM).

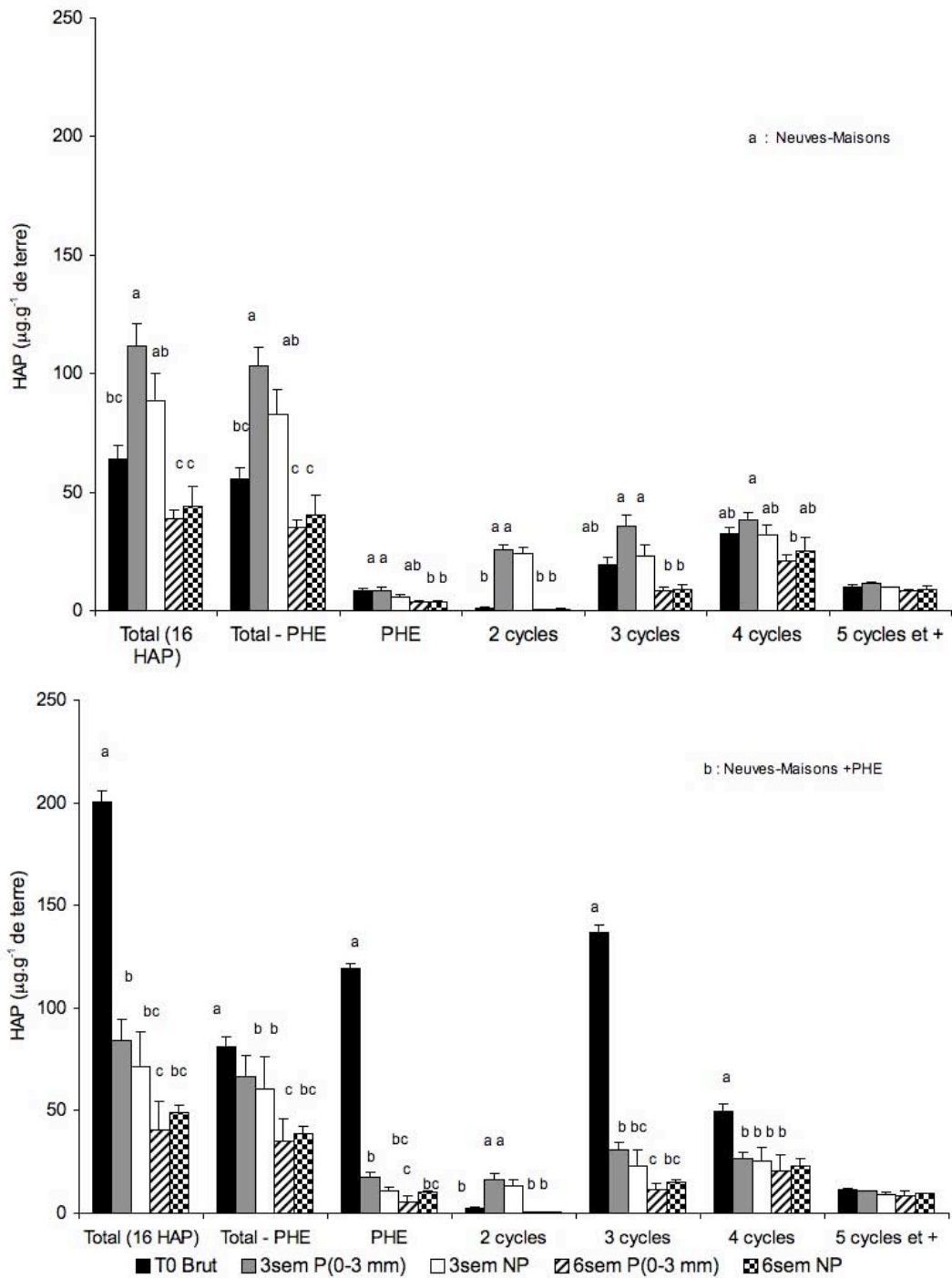


Figure 21 : Concentrations de HAP ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) extraits à la cyclodextrine à partir des compartiments latéraux contenant de la terre de Neuves-Maisons sans (a) et avec (b) ajout de phénanthrène dans les sections rhizosphériques (0-3) et dans les sections non plantées (NP). Les extractions ont été réalisées au début de l'expérience (T_0) et après trois et six semaines d'incubation. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$) entre les traitements.

5.2.4. Quantification des gènes codant pour l'ARNr 16S et les HAP-dioxygénases

5.2.4.1. Dans les compartiments latéraux contenant de la terre de Neuves-Maisons

Au début de l'expérience, le nombre de copies du gène codant pour la petite sous-unité du ribosome (ARNr 16S) était de $4,8 \pm 1,8 \times 10^9$ copies.g⁻¹ de sol. Après trois semaines d'incubation, il était peu différent ($5,7 \pm 1,3 \times 10^9$ copies.g⁻¹ de sol) et aucune différence significative n'a été observée entre les traitements plantés et non plantés (Figure 22). Cependant, entre 3 et 6 semaines d'incubation, le nombre de copies de gènes a diminué significativement jusqu'à $5,5 \pm 3,9 \times 10^8$ copies.g⁻¹ de sol (n=6, P+NP).

Les nombres de copies de gènes codant des HAP-dioxygénases appartenant à des bactéries à Gram négatif (HAP-diox GN) et à Gram positif (HAP-diox GP) ont été respectivement de $1,3 \pm 0,4 \times 10^8$ copies.g⁻¹ et $8,5 \pm 4,6 \times 10^6$ copies.g⁻¹ au début de l'expérience. Ces nombres de copies des gènes HAP-diox GN et HAP-diox GP n'ont pas montré de différence significative entre 3 et 6 semaines d'incubation, malgré une tendance à la diminution au cours du temps, ni entre les modalités plantées (0-3 mm) et non plantées (NP).

Le rapport des gènes HAP-diox / ARNr 16S dans le sol de Neuves-Maisons sans ajout de phénanthrène (NM) a été plus important dans la modalité plantée (3,0 %) que dans la modalité non plantée (1,0 %) à 3 semaines (Tableau 20). L'ANOVA sur l'ensemble de données (3 et 6 semaines, n=6) a montré que la proportion de gènes de dégradation (HAP-diox GN) était significativement supérieure dans les sections rhizosphériques (2,4%) par rapport aux sections non rhizosphériques (0,7 %) (Tableau 20).

5.2.4.2. Dans les compartiments latéraux contenant de la terre de Neuves-Maisons avec ajout de phénanthrène

L'ANOVA sur l'ensemble des données (n=12 ; sections P/NP et 3/6 sem) a montré que le nombre de copies de gènes ARNr 16S était significativement plus faible dans le traitement avec phénanthrène (NM+PHE) que dans le traitement sans phénanthrène (NM), mais le nombre de copies des gènes HAP-diox GN et GP n'a pas présenté de différence significative.

Dans les échantillons NM+PHE, le nombre de copies du gène ARNr 16S était de $4,3 \pm 1,5 \cdot 10^8$ copies.g⁻¹ de terre à T₀. Aucune différence significative n'a été observée entre les modalités plantées et non plantées (Figure 22). Après trois semaines d'incubation, la quantité de gène HAP-diox GN était de $4,0 \pm 1,5 \cdot 10^7$ copies.g⁻¹ et la quantité de gène HAP-diox GP de $2,4 \pm 1,0 \cdot 10^6$ copies.g⁻¹. Au cours du temps, une tendance à la diminution du nombre de copies des gènes codant une HAP-dioxygénase a été observée sans être significative.

Le pourcentage des gènes de dégradation HAP-diox GN par rapport au gène ARNr 16S a été significativement plus élevé dans ces échantillons de terre NM+PHE que pour NM, ce qui n'était pas le cas pour les gènes HAP-diox GP. Le pourcentage des gènes HAP-diox GN paraissait plus élevé dans les sections plantées (0-3mm) que les non plantées particulièrement après 3 semaines mais la différence n'est pas significative. L'analyse de variance sur l'ensemble des données (NM+PHE) a indiqué une diminution significative de la proportion de bactéries possédant le gène HAP-diox GN dans la population totale (HAP-diox / ARNr 16S) entre 3 et 6 semaines (Tableau 20).

Tableau 20 : Pourcentage du nombre de copies de gènes HAP-dioxygénases GN et GP par rapport au nombre de copies du gène ARNr 16S pour le sol de Neuves-Maisons sans (a) et (b) avec ajout de phénanthrène. Moyenne et erreur standard à partir de la moyenne des trois répétitions. (x) : $p \leq 0,05$; n.s : non significatif.

	3 semaines		6 semaines	
	P (0-3 mm)	NP	P (0-3 mm)	NP
(a)				
% HAP-diox GN	3,0 ± 1,3	1,0 ± 0,5	1,8 ± 0,1	0,4 ± 0,04
% HAP-diox GP	0,1 ± 0,04	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,5	1,2 ± 0,1
	3 semaines		6 semaines	
	P (0-3 mm)	NP	P (0-3 mm)	NP
(b)				
% HAP diox GN	13,0 ± 5,2	4,0 ± 0,8	2,6 ± 1,5	1,4 ± 0,1
% HAP-diox GP	1,5 ± 0,7	0,1 ± 0,03	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2

		Plante P v.s. NP	Temps d'incubation 3sem v.s. 6sem	Plante x Temps d'incubation
NM	% HAP-diox GN	x	N.S.	N.S.
NM	% HAP-diox GP	N.S.	x	N.S.
NM+PHE	% HAP-diox GN	N.S.	x	N.S.
NM+PHE	% HAP-diox GP	N.S.	N.S.	N.S.

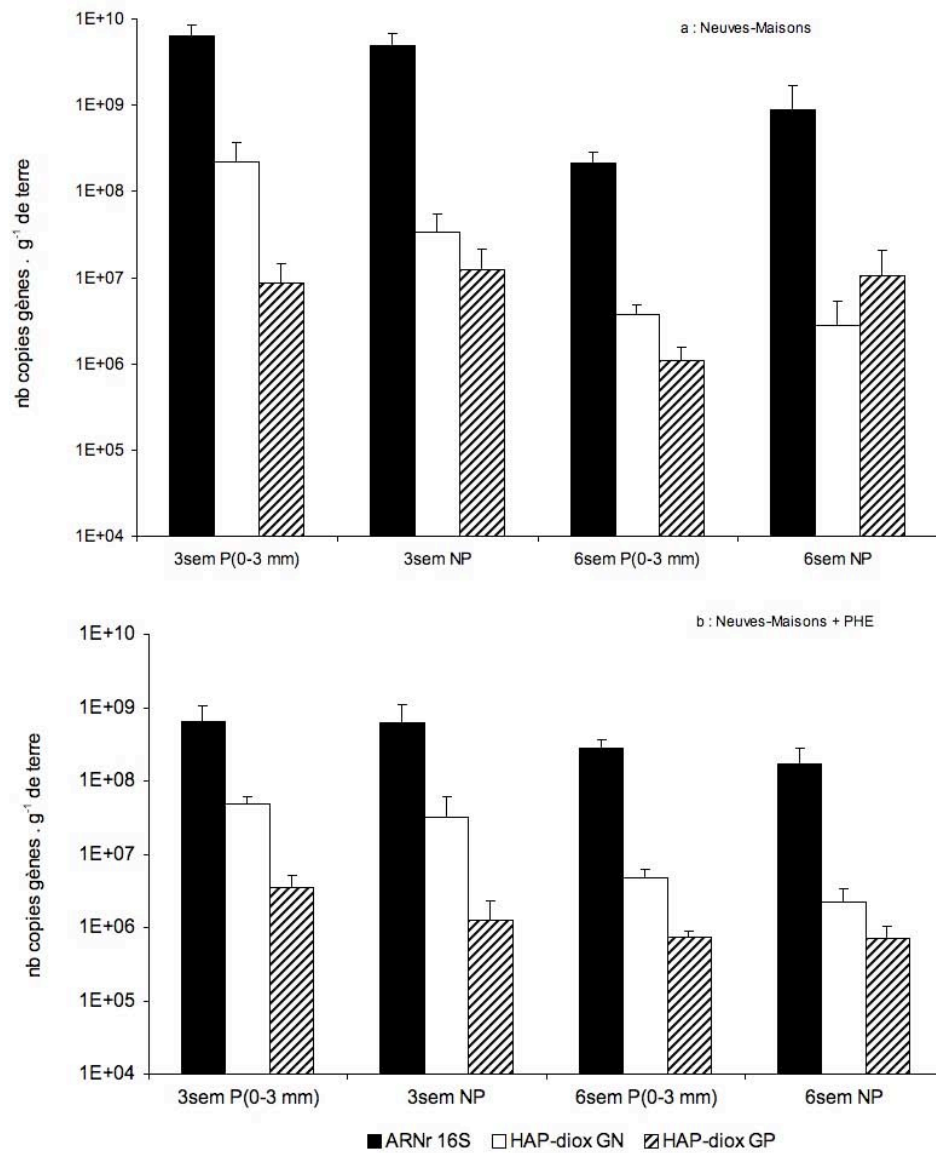


Figure 22 : Nombre de copies des gènes ARNr 16S, HAP-diox GN et HAP-diox GP dans le sol de Neuves-Maisons sans (a) et avec (b) ajout de phénanthrène dans les modalités rhizosphériques (0-3 mm) et non plantées (NP) après 3 et 6 semaines d'incubation.

5.2.5. Structure des communautés bactériennes

La structure des communautés bactériennes a été révélée par électrophorèse TTGE à partir des extraits d'ADN des échantillons de terre (Figure 23). Après trois semaines d'incubation dans les compartiments latéraux, la structure des communautés bactériennes a peu varié dans les traitements plantés et non plantés avec ajout ou non de phénanthrène. La plante a légèrement modifié la structure des communautés et une bande (n°1) est apparue en sa présence. Dans la modalité avec le phénanthrène fraîchement ajouté (NM+PHE) est apparue une bande (n°3) dans le traitement non planté.

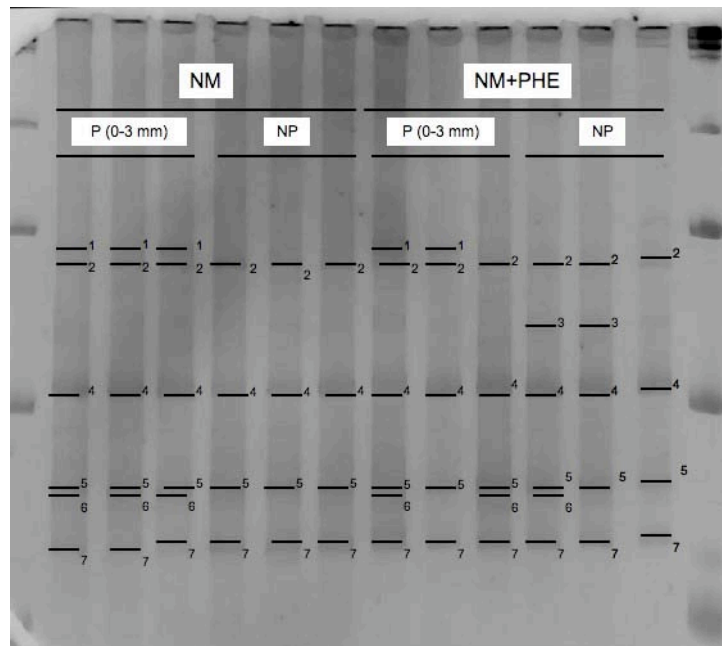


Figure 23 : Structure des communautés bactériennes révélée par analyse TTGE et détection des bandes par le logiciel Geldoc. L'ADN a été extrait des terres contaminées de Neuves-Maisons sans (NM) et avec (NM+PHE) ajout de phénanthrène à partir des traitements plantés P(0-3 mm) et non plantés (NP).

5.3. Discussion

5.3.1. Dissipation et biodisponibilité des HAP

La concentration des HAP de la terre contaminée de Neuves-Maisons a diminué de 60 % par rapport à la valeur initiale. Ce taux de dissipation semble très élevé par rapport aux résultats observés précédemment au LIMOS *in situ* et au laboratoire avec cette même terre. En effet, les concentrations des 16 HAP ont varié très peu après 2 ans de traitement par phytoremédiation et atténuation naturelle (Cébron *et al.*, 2009) et après 8 semaines dans des cultures en pots avec la luzerne (Norini, 2007). Cependant, d'autres études ont montré que les expériences menées au laboratoire peuvent conduire à une dissipation des HAP plus importante par rapport aux résultats obtenus *in situ*, notamment grâce à des conditions d'incubation contrôlées plus favorables (température, humidité, nutriments) (Joner *et al.*, 2002). La température semble jouer un rôle important sur la libération des HAP dans la solution du sol (Kim et Osako, 2003). En outre, les interactions entre le polluant et le sol sont dépendantes de la structure de la molécule et des groupes fonctionnels présents à la surface des phases minérales et organiques du sol. La conformation des particules de sol en micro- et nano-pores a un rôle prépondérant dans les processus de sorption et de diffusion des composés organiques (Pignatello et Xing, 1996, Yang *et al.*, 2001). Or le mélange de la terre contaminée et de sable (1:1) utilisé dans cette expérience a pu favoriser la mobilisation des HAP par la déstructuration des agrégats. Dans notre expérience, le travail du sol et la destruction des agrégats par l'ajout de sable ont pu créer des conditions favorables pour la dissipation des HAP, notamment par une aération et une augmentation de la surface spécifique du sol. Cependant, la désorption et la volatilisation des HAP sont fonction de leurs propriétés chimiques (Kottler et Alexander, 2001) or, la dissipation a été observée sur l'ensemble des 11 HAP. Par précaution, les compartiments latéraux en polypropylène ont été recouverts de papier d'aluminium pour limiter l'adsorption des HAP sur les parois. Le dosage des HAP a été effectué en GC-FID et seuls 11 des HAP ont été mesurés mais certains échantillons ont été également dosés par HPLC ce qui a permis de valider les résultats obtenus.

L'ajout de phénanthrène à la terre de Neuves-Maisons n'a pas eu d'effet sur la dissipation des autres HAP présents. Pourtant la dégradation par co-métabolisme bactérien, c'est-à-dire la dégradation de HAP récalcitrants suite à l'ajout d'un HAP facilement dégradé, a été parfois rencontrée chez les bactéries. Notamment la dégradation des HAP à cinq cycles (benzo(a)pyrène, benzo(a)anthracène) a été conditionnée par l'ajout de co-substrat comme le phénanthrène (Aitken *et al.*, 1998; Juhasz *et al.*, 1997). Dans d'autres cas, l'ajout de phénanthrène a stimulé la dégradation du fluorène (Boldrin *et al.*, 1993). En plus de favoriser le co-métabolisme bactérien, l'ajout de phénanthrène dans une matrice contenant initialement des HAP peut conduire à une compétition des composés organiques pour les sites d'adsorption de la matrice et ainsi augmenter la

désorption globale des HAP natifs (Cornelissen et Gustafsson, 2006; Cornelissen et Gustafsson, 2004; Doick *et al.*, 2006). Cependant la terre de Neuves-Maisons contient une forte quantité de "black carbon" (Barnier, 2009), lequel permet l'adsorption des HAP de façon non-compétitive (Luthy *et al.*, 1997; Accardi-Dey et Gschwend, 2002; Ran *et al.*, 2007).

Au début de l'expérience (à T_0), la concentration des HAP extraits à la cyclodextrine autre que le phénanthrène a été plus importante dans la terre de Neuves-Maisons avec ajout de phénanthrène (NM+PHE) par rapport à la terre sans phénanthrène ajouté (NM). Ce résultat a pu être lié au phénomène de désorption, mais il pourrait être dû aussi à une pré-extraction des HAP lors de l'ajout du phénanthrène dans l'hexane sur une partie du sol (1/5). Pour éviter ce biais, un ajout d'un volume d'hexane équivalent aurait pu être réalisé dans la terre de Neuves-Maisons sans phénanthrène. Un essai postérieur a effectivement montré qu'une plus grande quantité de HAP (environ 30 %) a été extraite à la cyclodextrine lorsque 1/5 du sol avait reçu de l'hexane (0,3 mL d'hexane dans 1 g de sol puis ajout de 4 g de sol).

La concentration de cyclodextrine de 50 mM a semblé être suffisante pour extraire la fraction la plus labile des HAP de la terre contaminée de Neuves-Maisons. Cette concentration a été utilisée antérieurement pour une terre de cokerie où la quantité de HAP extraits a été fortement corrélée à la quantité de HAP minéralisée par la microflore indigène (Stokes *et al.*, 2005). Dans notre expérience, le phénanthrène fraîchement ajouté ($500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a été dégradé à plus de 90 % en 3 semaines et la dissipation des autres HAP atteignait 60%. Cette forte biodégradation est confortée par l'extraction des HAP à la cyclodextrine, qui reflète la part facilement minéralisable par les bactéries (Allan *et al.*, 2006; Doick *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2000). L'extraction ménagée à la cyclodextrine a permis de montrer que la concentration des HAP disponibles pour la modalité NM a augmenté entre T_0 et 3 semaines, probablement en raison de la mise en place de l'expérience, ce qui pourrait expliquer en partie la dissipation relativement importante des HAP. Entre trois et six semaines, la concentration extractible à la cyclodextrine a significativement diminué et aucune évolution significative des HAP totaux n'a été observée. Des résultats similaires ont été antérieurement observés dans des sols où du phénanthrène avait subi un vieillissement allant de quelques jours à plusieurs mois (Hatzinger et Alexander, 1995), et où la quantité de HAP extraits à la cyclodextrine diminuait avec le temps (Allan *et al.*, 2006). En revanche, pour la terre qui a reçu un apport de phénanthrène, à T_0 la fraction de HAP extractible à la cyclodextrine est très élevée, ce qui est lié au phénanthrène ajouté, mais cette valeur est significativement diminuée après 3 semaines lorsque ce phénanthrène a été dégradé. Elle diminue encore entre trois et six semaines, ce qui est cohérent avec l'absence de dissipation significative des HAP durant cette période. Ce résultat confirme la forte disponibilité des HAP fraîchement ajoutés dans un sol par rapport à une contamination ancienne ayant subi un vieillissement.

Pour les molécules de plus de 5 cycles aromatiques, les concentrations des HAP extraits à la cyclodextrine n'ont pas montré d'évolutions significatives. Contrairement aux HAP à 2 et 3 cycles aromatiques qui forment des complexes cyclodextrine:HAP de type 1:1 ou aux HAP de 4 cycles qui peuvent former des

complexes 2:1, les molécules dont l'encombrement spatial est important sont plus difficilement encapsulées par les molécules de cyclodextrine (Wang et Brusseau, 1995; Cescutti *et al.*, 1996). Cependant, les HAP présentant de nombreux cycles aromatiques sont aussi peu accessibles pour les bactéries et restent récalcitrants à la biodégradation (Juhasz et Naidu, 2000; Kanaly et Harayama, 2000).

La proximité du tapis racinaire n'a pas eu d'effet sur la dissipation des HAP totaux et la concentration des HAP résiduelle n'a pas suivi de gradient racinaire. Les sections de 3 mm d'épaisseur ont été adaptées pour mettre en évidence un gradient racinaire lorsque le substrat a été du sable (Corgié *et al.*, 2003), mais cette épaisseur n'a peut-être pas permis de mettre en évidence un tel gradient dans un substrat plus complexe qu'est un sol. Dans un sol, la zone d'influence de la rhizosphère est généralement comprise entre 1 et 4 mm (Wenzel *et al.*, 2001) voir moins d'un millimètre pour les acides organiques (Jones, 1998). Dans une expérience avec un sol, Joner et Leyval (2003) ont montré un gradient racinaire où l'influence de la racine sur la dissipation des HAP n'a pas porté au-delà d'une distance d'un millimètre. Cependant, il ne s'agissait pas de dispositifs à compartiments, mais de cultures en pot avec récupération du sol adhérent et les résultats ne sont pas comparables quantitativement. Dans notre expérience avec la terre sans ajout de phénanthrène, l'augmentation de la concentration des composés à 2 et 3 cycles extraits à la cyclodextrine entre T_0 et 3 semaines a été significative en présence de plantes mais ne l'a pas été pas en absence de plante (Figure 21). Ce résultat suggère que la proximité des racines a pu favoriser l'augmentation de l'extractibilité ou disponibilité des HAP. Toutefois, cet effet n'a pas été observé lorsqu'un apport de phénanthrène a été réalisé, peut-être en raison de la disponibilité déjà élevée du phénanthrène dans ce cas. Des questions demeurent sur l'effet de la plante sur la disponibilité des HAP extraits par la solution de cyclodextrine, alors que les concentrations totales en HAP extraites sous pression à l'ASE n'ont pas montré d'effet plante significatif. Deux hypothèses peuvent être émises : (1) Les exsudats racinaires ont augmenté la désorption des HAP du sol. Cette hypothèse conforte l'idée que la présence de plantes faciliterait la désorption des HAP du sol ce qui favoriserait à terme l'acquisition des polluants par les bactéries (Yang *et al.*, 2001) ; (2) Les exsudats racinaires ont pu ralentir la dégradation bactérienne des HAP par la régulation du cycle global du carbone (Marques *et al.*, 2006). Les bactéries ont pu utiliser les exsudats racinaires, comme source de carbone et d'énergie facilement accessible et métabolisable, au détriment des HAP (Kamath *et al.*, 2004; Rentz *et al.*, 2004). Cette régulation a pu conduire à ralentir la dégradation des HAP bien que leur disponibilité ait pu augmenter.

5.3.2. Bactéries totales et dégradantes

La terre de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons contenait une microflore indigène laquelle a été soumise à l'influence d'un tapis racinaire dense et sain même après 6 semaines de temps de contact. Cependant le nombre de copies de gènes ARNr 16S, permettant d'estimer la population totale de bactéries (Felske *et al.*, 1998), n'a pas révélé de différence entre les modalités plantées (0-3 mm) et non plantées. Pourtant la méthode de PCR en temps réel a été montrée comme relativement précise pour la quantification des gènes (Gibson *et al.*, 1996; Widada *et al.*, 2001). Aucun effet rhizosphérique, estimé par le rapport R/S, n'a été observé sur la quantité de gènes ARNr 16S tout comme dans le chapitre 4 où du sable avait été utilisé dans des dispositifs à compartiments. Néanmoins, la présence de plantes a semblé favoriser spécifiquement les bactéries possédant des gènes codant pour une HAP-dioxygénase, notamment pour les bactéries à Gram négatif (HAP-diox GN). En effet, des valeurs de R/S plus élevées ont été obtenues pour ces gènes HAP-diox GN, plus particulièrement dans l'expérience avec la terre sans ajout de PHE après 3 semaines (Tableau 21). Cependant, même supérieurs à 1, les rapports R/S sont restés faibles peut-être à cause de la technique de quantification par PCR en temps réel car des résultats similaires ont été obtenus pour des échantillons prélevés *in situ* (Cébron *et al.*, 2009). De même, les proportions de bactéries dégradantes à Gram négatif dans la population totale, estimées par le rapport HAP-diox GN/ARNr 16S, ont été plus importantes en présence de plante montrant ainsi un effet positif de celle-ci sur ces bactéries possédant des gènes codant une HAP-dioxygénase (Cébron *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2009).

Tableau 21 : Rapport du nombre de copies des gènes dans les sections rhizosphériques (0-3) et non plantées (R/S) sans(NM) et avec (NM+PHE) ajout de phénanthrène.

R/S	ARNr 16S	HAP-diox GN	HAP-diox GP
NM 3 sem	1,3	6,5	0,7
NM 6 sem	0,2	1,3	0,1
NM+PHE 3sem	1,0	1,5	2,9
NM+PHE 6sem	1,6	2,2	1,0

Les échantillons de terre contaminée avec ajout de phénanthrène (NM+PHE) ont présenté significativement moins de gènes ARNr 16S que ceux de la terre sans PHE ajouté. Le phénanthrène et ses métabolites peuvent être toxiques pour les bactéries notamment par la destruction des membranes (Sikkema *et al.*, 1995; Maliszewka-Kordybach *et al.*, 2007). Cependant l'ajout de phénanthrène a augmenté significativement la proportion de bactéries possédant le gène HAP-diox GN dans la population totale. D'autres études ont montré que l'ajout de HAP fortement disponibles a augmenté la quantité de gènes codant pour une HAP-dioxygénase

(Marlowe *et al.*, 2002; Palmroth *et al.*, 2007; Park et Crowley, 2006). Après trois semaines d'incubation, lorsque la majeure partie du phénanthrène fraîchement ajouté (NM+PHE) a été dégradée et que la fraction de HAP extraits à la cyclodextrine a été faible, la proportion de bactéries dégradantes dans la population totale a diminué. Ces deux paramètres suggèrent que ce sont les HAP facilement disponibles qui ont stimulé le plus les bactéries dégradantes.

La structure des communautés bactériennes a été légèrement modifiée par la présence de phénanthrène, une bande spécifique (n°3) est apparue dans les sections non plantées. Ce faible effet apparent du phénanthrène fraîchement ajouté a pu être lié à sa rapide dégradation (90% lors du prélèvement à 3 semaines), et à la présence de PHE dans la terre historiquement contaminée. L'empreinte moléculaire prise après trois semaines d'incubation ne correspondait pas nécessairement à la diversité bactérienne au moment de la dégradation. De même, la structure des communautés bactériennes s'est révélée peu dépendante de la présence de plante. Seule une bande d'ADN (n°1) a été spécifiquement présente dans les sections plantées. Contrairement aux expériences avec du sable (chapitre 4; Corgié *et al.*, 2006 b), où les exsudats et le HAP étaient la seule source de carbone et d'énergie pour les microorganismes, la terre utilisée ici apportait 70 mg g⁻¹ de carbone organique, dont une faible partie seulement était constituée de HAP. Dans la modalité NM+PHE, l'ajout de phénanthrène (500 µg.g⁻¹) a apporté 480 µg.g⁻¹ de carbone dans la terre. La quantité d'exsudats apportés par le tapis racinaire dans le compartiment latéral n'a pas pu être estimée, mais elle serait de l'ordre de 5 µg.g⁻¹jour⁻¹ d'après certains auteurs (Domanski *et al.*, 2001; Kuzyakov *et al.*, 2001). Ainsi l'apport des exsudats a pu être trop faible pour avoir une influence sur les communautés microbiennes.

5.4. Conclusion

Les terres historiquement contaminées ont présenté une forte dissipation des HAP probablement liée à la mise en place de l'expérience mais nous n'avons pas observé d'évolution dans les teneurs en HAP entre 3 et 6 semaines d'incubation. Les HAP totaux n'ont pas présenté de différence de concentration en fonction du gradient racinaire de 0 à 9 mm et aucune différence significative n'a été observée entre la section la plus rhizosphérique (0-3 mm) et la section non plantée. Les sections de trois millimètres ont peut-être été trop épaisses pour permettre la diffusion des exsudats racinaires.

La méthode d'extraction non exhaustive, utilisant une solution de cyclodextrine, a cependant confirmé la faible disponibilité des HAP présents dans la terre de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons. À l'inverse, le phénanthrène fraîchement ajouté (NM+PHE), qui a été extrait en grande quantité par la solution de cyclodextrine au début de l'expérience, a été rapidement dégradé pendant les 3 premières semaines d'incubation. L'utilisation de l'extraction ménagée à la cyclodextrine a permis de suggérer un effet de la plante sur la disponibilité des HAP, lesquels ont semblé davantage extractibles en présence de plante. Cependant les forts écart-types sur la quantification totale des HAP n'ont pas permis de conclure et le rôle des exsudats racinaires sur la disponibilité des HAP reste à préciser.

L'ajout de phénanthrène, ainsi que la présence de plantes (sans ajout de phénanthrène) ont significativement stimulé la proportion de bactéries possédant des gènes codant pour des HAP-dioxygénases, et dans les deux cas, ce sont des gènes de bactéries à Gram négatif qui sont concernés.

6. Etude en microcosme de l'effet des exsudats racinaires de ray-grass sur la dissipation du phénanthrène et les communautés bactériennes

Dans les expériences avec des plantes et des dispositifs à compartiments, la comparaison des modalités plantées et non plantées peut être compliquée par des processus secondaires liés à la plante entière. Le prélèvement de nutriments et de l'eau dans le sol peut avoir une influence sur la composition de la microflore bactérienne et donc sur la dissipation des HAP. Pour étudier l'influence de la plante sur les communautés bactériennes, certains auteurs ont utilisé des exsudats racinaires artificiels lors d'expériences en flacons ce qui réduit la complexité du système sol/plante/bactéries (Griffiths *et al.*, 1999). L'ajout d'exsudats racinaires artificiels a ainsi augmenté la dégradation des HAP et la quantité de bactéries dégradantes cultivables (Joner *et al.*, 2002). Cependant, ce mélange de composés simples n'a été efficace que sous certaines conditions comprenant un ajout d'azote et de phosphore. La diversité des composés exsudés est remarquable (Schlichting et Leinweber, 2009), et ne peut pas être reproduite en totalité dans des exsudats artificiels, et certains de ces composés peuvent avoir une influence sur les bactéries dégradant les HAP. L'objectif de cette expérience a été d'étudier l'effet d'exsudats racinaires naturels sur la dégradation des HAP et sur les bactéries possédant des gènes codant pour une HAP-dioxygénase. Une quantité d'exsudats racinaires a été ajoutée en début d'expérience dans des flacons fermés afin de pouvoir suivre, entre autres, la minéralisation du carbone (exsudats; polluants). Cette expérience avait aussi pour objectif de définir des conditions opératoires pour étudier les espèces bactériennes impliquées dans la dégradation des HAP par la technique de SIP (chapitre 8).

6.1. Description de l'expérience

6.1.1. Microcosmes avec du sable

L'expérience a été menée dans des microcosmes contenant 10 g de sable, du phénanthrène (200 µg.g⁻¹) et un inoculum bactérien provenant de la terre contaminée de Neuves-Maisons (§3.2.3.2) ajouté à raison de 10⁶ bactéries par gramme de sable. Les exsudats racinaires ont été ajoutés de manière unique au début de l'expérience (§3.2.4.2.2). Cinq modalités ont été réalisées, quatre contenaient l'inoculum bactérien et une modalité ne contenait que du phénanthrène (+PHE Abiotique). Les quatre modalités avec inoculum bactérien ont été : avec phénanthrène et exsudats (+PHE+exsudats); avec phénanthrène sans exsudats (+PHE-exsudats); sans phénanthrène avec exsudats (-PHE+exsudats) et avec l'inoculum bactérien seul (-PHE-exsudats). Les

microcosmes ont été fermés hermétiquement et incubés pendant 2, 3, 4, 5 et 10 jours à l'obscurité et à 24°C dans une chambre d'incubation, l'échantillonnage a été destructif. Les modalités ont été réalisées avec cinq répétitions, mais les "contrôles" (-PHE+exsudats, -PHE-exsudats et +PHE Abiotique) n'ont été réalisés que pour le temps d'incubation de 5 jours (Tableau 22).

Tableau 22 : Modalités effectuées et temps d'incubation (jours) pour les microcosmes avec du sable. Les croix correspondent à 5 répétitions par traitement.

	Temps d'incubation (jours)				
	2	3	4	5	10
+ PHE+exsudats	X	X	X	X	X
+ PHE - exsudats	X	X	X	X	X
- PHE+exsudats				X	
- PHE-exsudats				X	
+ PHE Abiotique				X	

6.1.2. Analyses

L'analyse des exsudats racinaires comprenait le dosage du carbone organique et de l'azote (§3.3.1.4), le dosage des sucres totaux par équivalent glucose (§3.3.1.3), le dosage des éléments minéraux majeurs (§3.3.1.1) et le dosage des acides organiques (§3.3.1.2). Le dosage des acides organiques dans le sable a été effectué après 2, 5 et 10 jours d'incubation (dans un tube centrifugeuse, 1g de sable et 5 mL d'eau ont été agités pendant 15 min, le surnageant a été analysé). Le carbone organique minéralisé en CO₂ présent dans l'atmosphère du flacon a été mesuré de manière non-destructive pour les flacons toutes les douze heures pendant les cinq premiers jours puis chaque jour jusqu'à dix jours (§3.3.2). Le phénanthrène a été extrait à l'hexane puis analysé par HPLC (§3.3.4.1.3). Des métabolites du phénanthrène ont été recherchés en GC-MS après 3 jours d'incubation à partir d'une extraction au dichlorométhane (4 x 1,5 g de sable) et silylation au BSTFA (§3.3.4.3.2).

Le nombre de copies de gènes codant pour la petite sous-unité du ribosome (ARNr 16S) a été utilisé pour estimer la quantité totale de bactéries par gramme de sable (§3.5.2). Les gènes de dégradation HAP-diox GN et HAP-diox GP ont été quantifiés (§3.4.3). Des gels d'électrophorèses TTGE ont été réalisés pour analyser la structure des communautés bactériennes à partir des extraits d'ADN des échantillons de terre et un séquençage des bandes majoritaires a été réalisé (§3.4.4).

6.2. Résultats

6.2.1. Exsudats racinaires

Les exsudats racinaires étaient composés de 178 mg.g⁻¹ de carbone organique, 24 mg.g⁻¹ de carbone inorganique et 15 mg.g⁻¹ d'azote organique. La concentration en équivalent glucose des exsudats racinaires était de 42 mg.g⁻¹. Les concentrations des acides organiques et des minéraux sont présentées ci-dessous (Tableau 23). Aucun acide organique aromatique n'a été détecté. L'acide succinique a été l'acide organique majoritaire. Au cours de l'incubation de 2, 5 et 10 jours, les concentrations de succinate et d'oxalate ont diminué significativement dans les microcosmes.

Tableau 23 : Concentrations des acides organiques et des éléments minéraux dans la poudre d'exsudats racinaires lyophilisés à T₀ (mg.g⁻¹ d'exsudats racinaires). <LQ : inférieure à la limite de quantification, N.Q. : non quantifié car co-élution avec le succinate.

Exsudats (Lot 1) mg.g ⁻¹		Exsudats (Lot 1) mg. g ⁻¹	
Gluconate	< L.Q.	Ca	11,97
Lactate	10,40	Fe	1,08
Acétate	13,80	K	106,23
Propionate	< L.Q.	Mg	14,42
Formate	6,00	Mn	0,04
Butyrate	< L.Q.	Na	12,10
Pyruvate	0,40	Si	0,49
Succinate	47,30	P	1,07
Malate	N.D.	Carbone Total	178,10
Oxalate	1,80	Carbone inorganique	23,85
Fumarate	< L.Q.	Azote total	15,00
Citrate	19,50		

6.2.2. Carbone organique minéralisé

La minéralisation du carbone a démarré dès le premier jour d'incubation dans les flacons contenant les exsudats avec et sans phénanthrène (+PHE+exsudats et -PHE+exsudats). Toutefois, un retard significatif de la minéralisation a été observé pendant les deux premiers jours d'incubation dans les flacons contenant du phénanthrène (+PHE+exsudats) (Figure 24). La production de CO₂ a atteint un palier après 4 jours dans les flacons contenant les exsudats avec et sans phénanthrène. La production de CO₂ a redémarré entre 4 et 6 jours d'incubation en présence de phénanthrène et d'exsudats (+PHE+exsudats). En présence de phénanthrène seul (+PHE-exsudats), la minéralisation du carbone a démarré seulement après quatre jours d'incubation. La concentration en CO₂ a cessé d'augmenter dans les flacons après sept jours d'incubation. Entre 4 et 7 jours, la production cumulée de carbone du CO₂ dans les modalités +PHE+exsudats et +PHE-exsudats a été respectivement de $32,0 \pm 4,2$ et $49,4 \pm 1,4$ µg de C par gramme de sable. Après 10 jours d'incubation, la quantité finale de carbone minéralisé dans la modalité sans exsudats (+PHE-exsudats) correspondait à 32 ± 1 % de la quantité de carbone initialement apportée par le phénanthrène (188 µg de C par gramme de sable +PHE-exsudats). Aucune production de CO₂ n'a été observée dans les flacons contrôles abiotiques (+ PHE Abiotique) et inoculum seul (-PHE-exsudats).

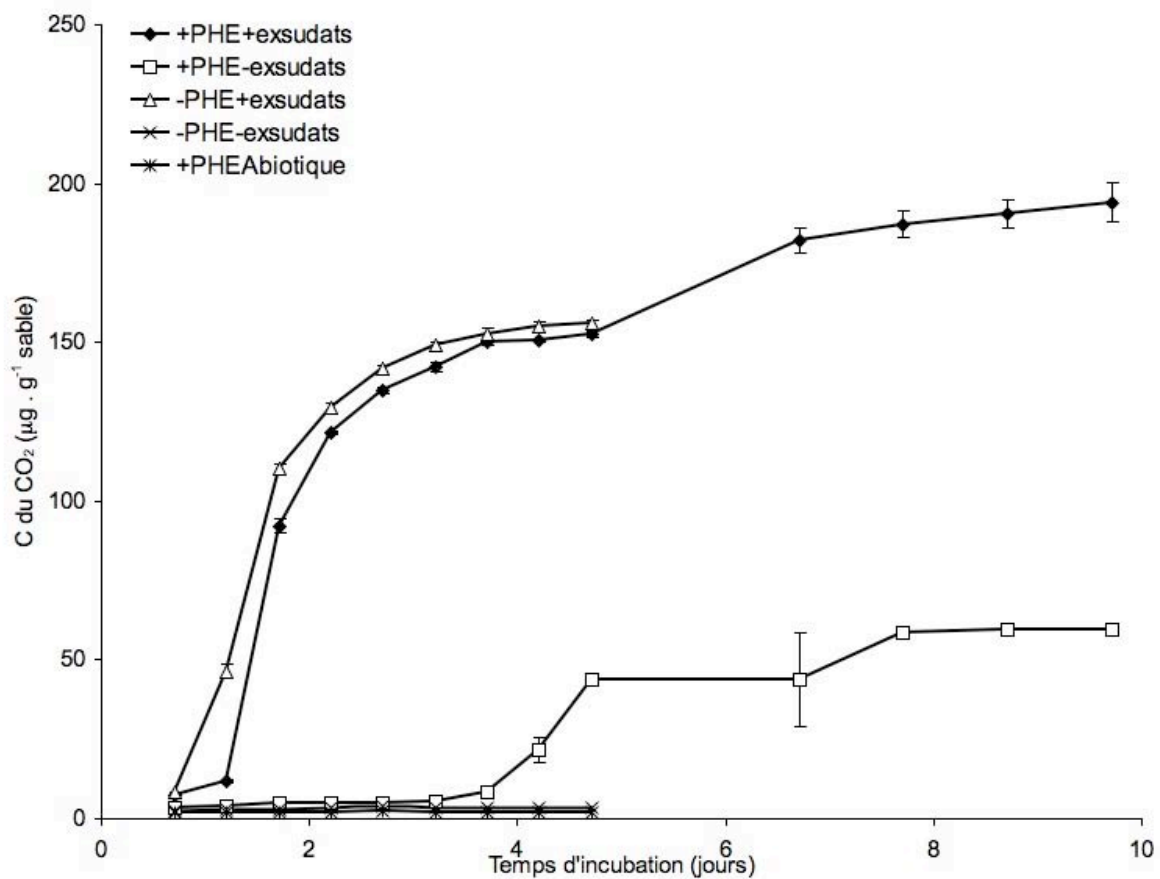


Figure 24 : Cinétique de libération du C du CO₂ (µg.g⁻¹ de sable) dans les microcosmes avec du sable au cours du temps en fonction de la présence ou non de phénanthrène et d'exsudats racinaires. Moyenne et erreur standard de 5 répétitions.

6.2.3. Dégradation du phénanthrène

La concentration initiale de phénanthrène était de $204 \pm 10,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ ($n = 9$). En absence d'exsudats ajoutés au phénanthrène (+PHE-exsudats), la concentration de phénanthrène a diminué rapidement dès le deuxième jour d'incubation (Figure 25). Près de 94 % du phénanthrène a été dégradé après 5 jours et le phénanthrène n'était plus détecté après 10 jours d'incubation. L'ajout d'exsudats racinaires a retardé la dégradation du phénanthrène. À partir de trois jours d'incubation, la concentration en phénanthrène a été significativement plus importante en présence d'exsudats. Après 10 jours d'incubation, seulement 50 % de la quantité de phénanthrène initiale a été dégradée. En absence d'inoculum bactérien (+PHE abiotique) la dégradation du phénanthrène a été nulle. Aucun métabolite du phénanthrène n'a été détecté par analyse en GC-MS.

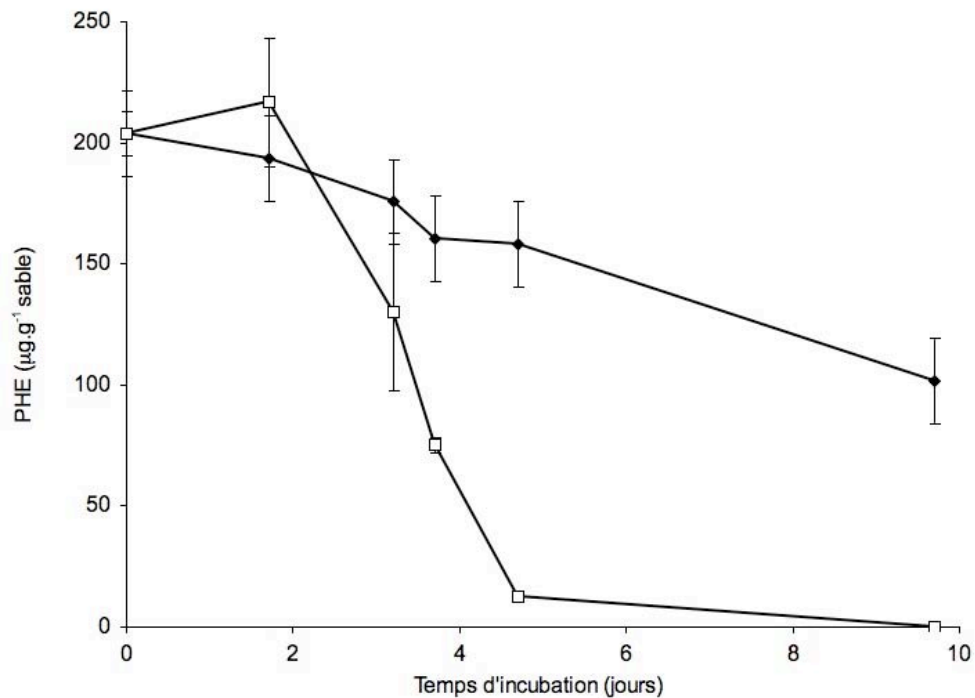


Figure 25 : Concentration en phénanthrène résiduel dans les microcosmes avec (■) et sans (□) exsudats racinaires ($\mu\text{g.g}^{-1}$) en fonction du temps d'incubation.

6.2.4. Quantification des gènes codant pour l'ARNr 16S et les HAP-dioxygénases

Au commencement de l'expérience, la concentration de gènes ARNr 16S était de l'ordre de 10^6 copies g^{-1} . Après deux jours d'incubation, le nombre de copies du gène ARNr 16S a augmenté jusqu'à $7,5 \pm 1,6 \times 10^{10}$ copies g^{-1} dans la modalité avec du phénanthrène et des exsudats racinaires (+PHE+exsudats) (Figure 26). Cette concentration de gènes est restée constante pendant les 10 jours de l'expérience. Sans ajout d'exsudats racinaires (+PHE-exsudats) la concentration de gène ARNr 16S a augmenté de manière constante pendant cinq jours et est restée stable jusqu'à la fin de l'expérience à $2,6 \pm 0,3 \times 10^{10}$ copies g^{-1} de sable. La modalité de contrôle avec exsudats racinaires (-PHE+exsudats) a présenté un nombre important de copies du gène ARNr 16S ($1,1 \pm 0,1 \times 10^{11}$ copies g^{-1}) après cinq jours d'incubation et a été significativement supérieure ($P < 0,05$) aux modalités +PHE+exsudats et +PHE-exsudats. Les nombres de copies du gène ARNr 16S dans les flacons témoins, "+ PHE abiotique" et "-PHE-exsudats", ont été sous le seuil de quantification (10^6 copies g^{-1} de sable).

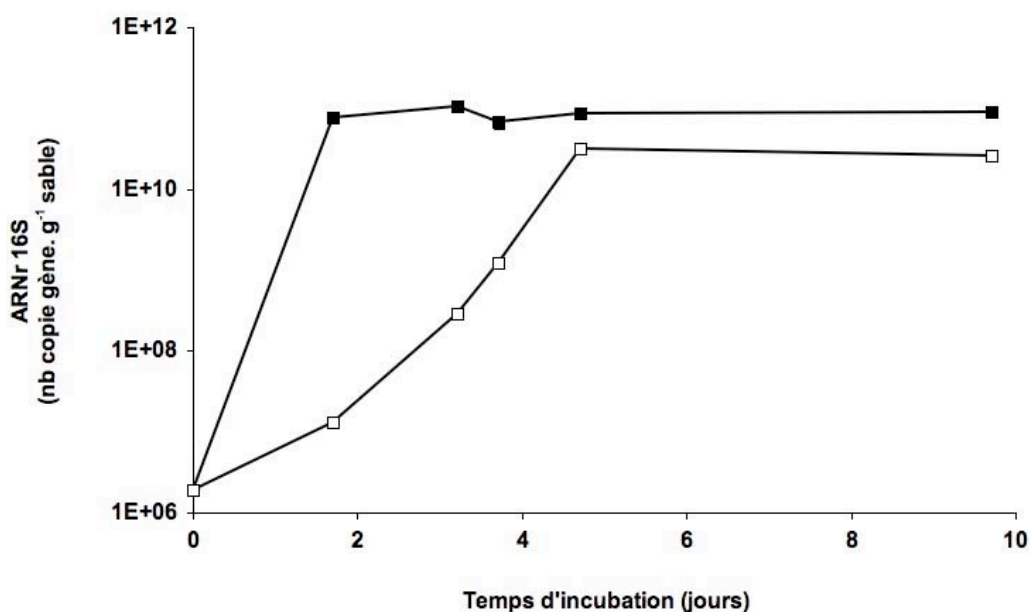


Figure 26 : Nombre de copies du gène codant la petite sous-unité de l'ARN ribosomal 16S par gramme de sable dans les microcosmes avec phénanthrène et avec (■) (+PHE+exsudats) et sans (□) (+PHE-exsudats) exsudats racinaires en fonction du temps.

Initialement le nombre de copies de gène codant pour une HAP-dioxygénase appartenant aux bactéries à Gram négatif (HAP-diox GN) était de $3,7 \times 10^4$ g^{-1} . En présence de phénanthrène et d'exsudats racinaires (+PHE+exsudats), ce nombre a augmenté en deux jours à $6,0 \pm 2,0 \times 10^9$ copies g^{-1} et est resté stable jusqu'à la fin de l'expérience (Figure 27). En absence d'exsudats racinaires (+PHE-exsudats), le nombre de copies du gène

HAP-diox GN a été de $7,6 \pm 2,4 \times 10^6$ copies g^{-1} après deux jours et a augmenté jusqu'à $1,6 \pm 0,05 \times 10^8$ copies g^{-1} après cinq jours d'incubation pour rester stable jusqu'à la fin de l'expérience. La quantité de gènes HAP-diox GN a été significativement supérieure dans la modalité avec phénanthrène et exsudats racinaires (+PHE+exsudats). Dans le traitement de contrôle avec exsudats sans phénanthrène (-PHE+exsudats), la quantité de gène HAP-diox GN a été de $5,6 \pm 1,9 \times 10^9$ copies g^{-1} de sable après cinq jours d'incubation et a été non significativement différente de la modalité avec phénanthrène et exsudats racinaires (+PHE+exsudats). Les nombres de copies du gène HAP-diox GN dans les flacons "+ PHE abiotique " et "-PHE-exsudats" ont été sous le seuil de quantification (10^4 copies g^{-1} de sable).

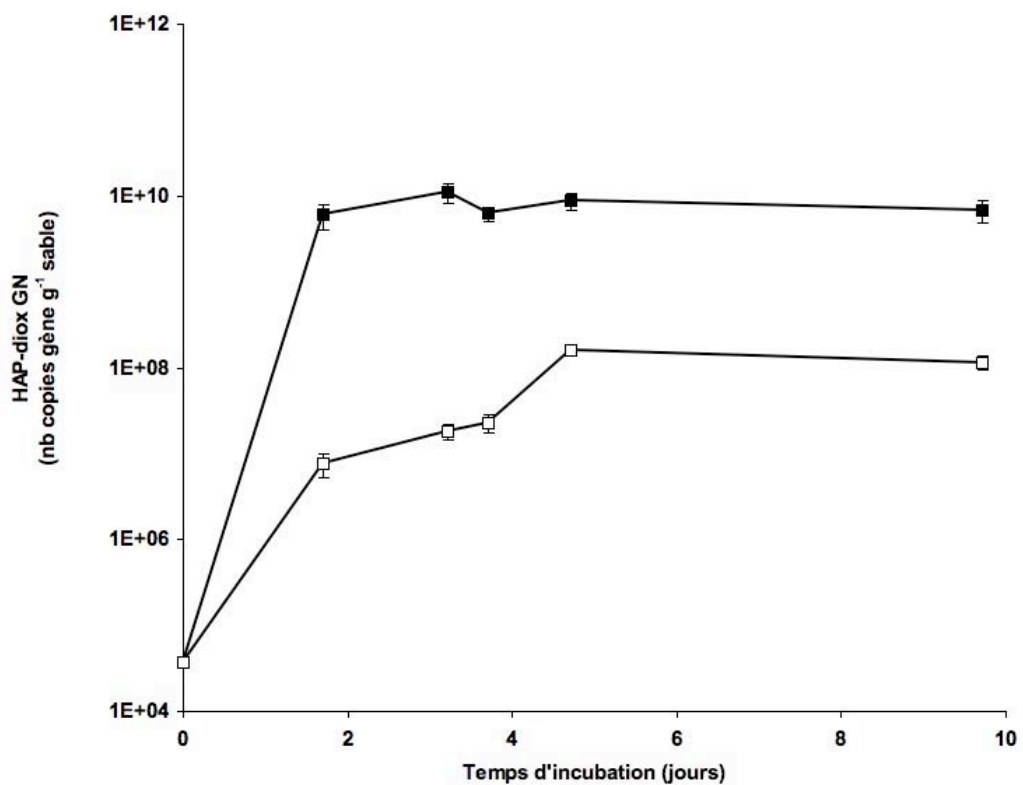


Figure 27 : Nombre de copies du gène codant une HAP-dioxygénase de bactéries à Gram négatif (HAP-diox GN) par gramme de sable dans les microcosmes avec phénanthrène avec (■) (+PHE+exsudats) et sans (□) (+PHE-exsudats) exsudats racinaires en fonction du temps.

La concentration en copies de gène codant pour une HAP-dioxygénase de bactéries à Gram positif (HAP-diox GP) a été sous le seuil de quantification au début de l'expérience. Les gènes HAP-diox GP ont été détectés au cours de l'expérience, mais ils sont restés en faible concentration. Après dix jours d'incubation, aucune différence n'a été observée dans les traitements avec et sans exsudats racinaires (+PHE+exsudats, et +PHE-exsudats), le nombre de copies de gènes HAP-diox GP a été de 10^6 copies g^{-1} de sable (donnée non

présentée). Dans la modalité de contrôle avec exsudats racinaires (-PHE+exsudats), le nombre de copies de gènes HAP-diox GP a été aussi de 10^6 copies g^{-1} de sable. Les nombres de copies du gène HAP-diox GP dans les flacons "+ PHE abiotique " et "-PHE-exsudats" ont été sous le seuil de quantification (10^4 copies g^{-1} de sable).

La proportion de bactéries dégradantes estimée par le rapport des gènes HAP-diox/ARNr 16S est restée stable (9 % de la population totale) dans le traitement avec phénanthrène et exsudats racinaires (+PHE+exsudats) à partir du deuxième jour d'incubation (Figure 28). En absence d'exsudats racinaires, la proportion de bactéries dégradantes atteignait 58 % de la population totale au deuxième jour d'incubation. Cette proportion a chuté rapidement pour atteindre 0,5 % après 5 jours d'incubation et est restée stable jusqu'à la fin de l'expérience. Dans le traitement contrôle avec les exsudats racinaires (-PHE+exsudats), la proportion de bactéries dégradantes dans la population totale a été de $6,8 \pm 1,1$ % après cinq jours d'incubation.

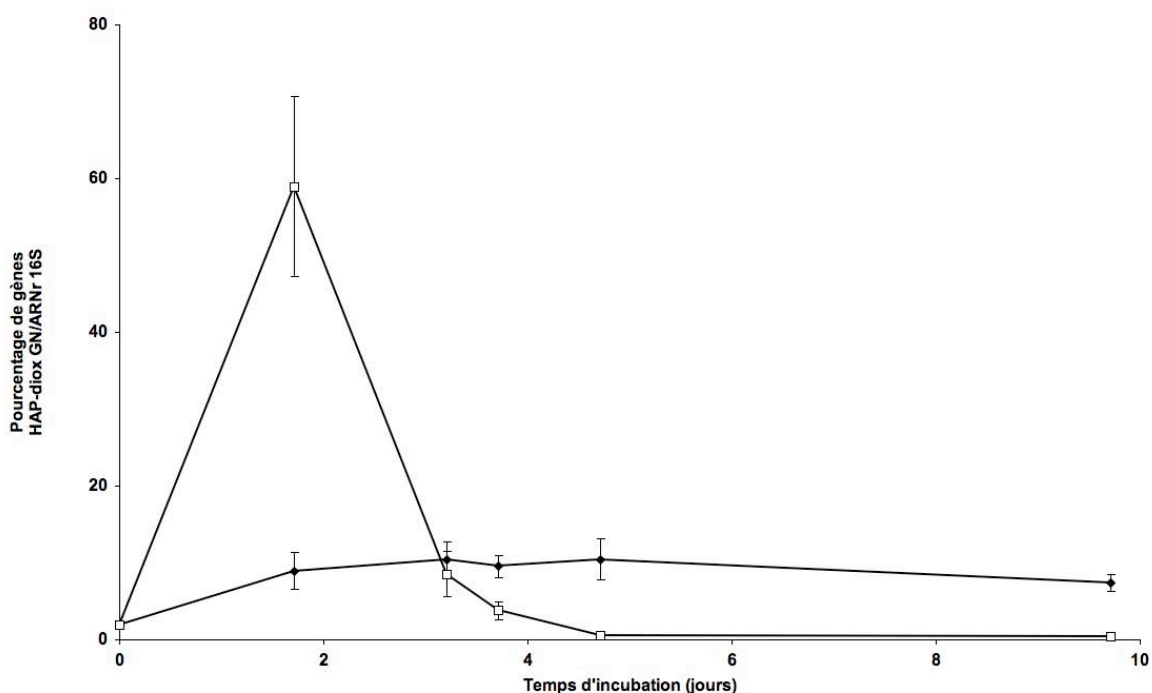


Figure 28 : Pourcentage du nombre de copies de gène codant une HAP-dioxygénase par rapport au gène ARNr 16S dans les microcosmes avec phénanthrène et avec (■) (+PHE+exsudats) et sans (□) (-PHE-exsudats) exsudats racinaires en fonction du temps.

6.2.5. Structure des communautés bactériennes

La structure des communautés bactériennes a été estimée par électrophorèse TTGE pour des échantillons prélevés après deux à cinq jours d'incubation. En absence d'exsudats racinaires, après deux jours d'incubation, aucune bande d'ADN n'a été détectée bien que la quantité de produit PCR injectée ait été augmentée dans les puits du gel (18 μ L à 2 jours, 7 μ L à 5 jours). Lorsque le phénanthrène a été la seule source de carbone disponible (+PHE-exsudats), seules trois bandes majoritaires ont été distinguées à partir de 3 jours d'incubation (Figure 29). La séquence d'ADN de la première bande (n°3; Tableau 24) présente une homologie à 99 % avec une espèce d'*Herbaspirillum* isolée sur plaque avec du phénanthrène dont l'inoculum provenait d'humus amendé en phénanthrène (Vacca *et al.*, 2005). Cette bande a été présente après 3, 4 et 5 jours d'incubation dans les microcosmes contenant du phénanthrène (+PHE-exsudats), mais n'a pas été observée dans les microcosmes contenant des exsudats (-PHE+exsudats et +PHE+exsudats). L'autre bande (n°5) avait une homologie de 99 % avec une espèce de *Pseudomonas putida* isolée de la rhizosphère du riz (Chen *et al.*, ncbi). Cette bande a été présente après 3 et 4 jours d'incubation, mais n'a pas été observée à 5 jours dans les microcosmes avec phénanthrène seul (+PHE-exsudats). En revanche, elle a été présente à 5 jours en présence d'exsudats avec et sans phénanthrène (+PHE+exsudats, -PHE+exsudats). La dernière bande (n°8), moins intense que les précédentes, avait une homologie de 99 % avec l'espèce *Achromobacter xylosoxidans* isolée d'un sol contaminé en HAP (La Rosa *et al.*, 2006). Elle n'a pas été observée en présence d'exsudats (-PHE+exsudats, +PHE+exsudats).

Dans les traitements avec exsudats, cinq bandes ont été présentes dont trois majeures. La bande n°5, correspondant à *Pseudomonas putida*, a été commune aux modalités avec et sans phénanthrène. La bande n°6 avait une homologie de 99 % avec une espèce de *Pseudomonas sp.* (Chen *et al.*, ncbi). La dernière bande (n°7) avait une homologie de 99 % avec une espèce de *Paenibacillus* isolée d'un environnement riche en CO₂ (Ueda *et al.*, 2008). Les bandes moins intenses correspondaient avec une homologie de 99 % à *Stenotrophomonas maltophilia* et *Enterobacter sp.*. Ces 5 bandes ont été retrouvées aussi bien en présence qu'en absence de phénanthrène (+PHE+exsudats et -PHE+exsudats). Les bandes 2 et 4 n'ont pas été détectées en absence d'exsudats racinaires.

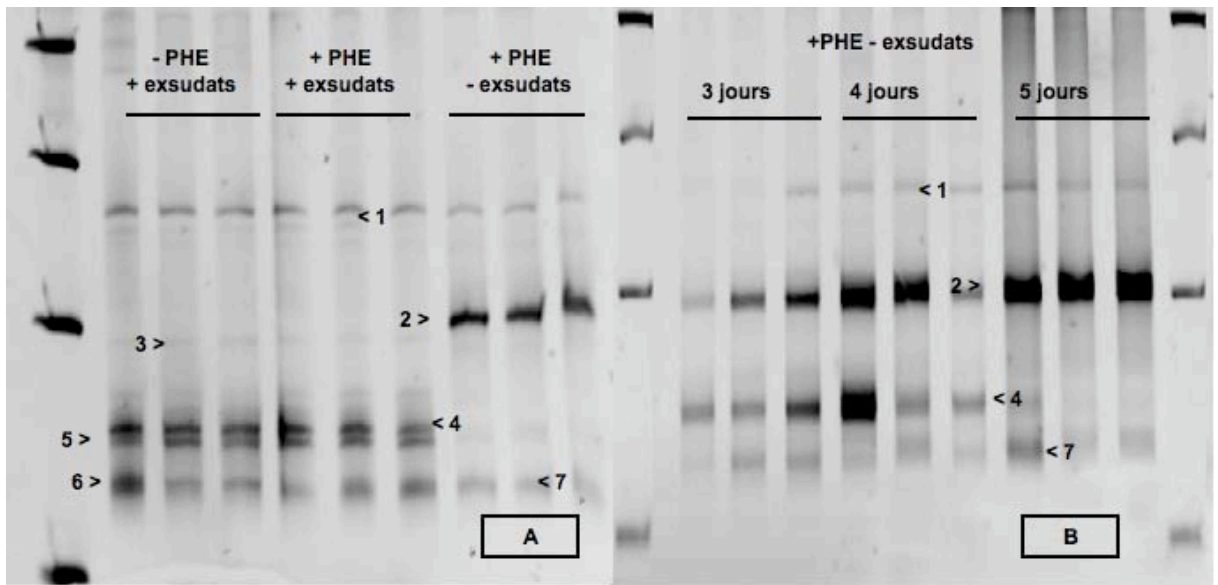


Figure 29 : Analyse par gel TTGE de la structure des communautés bactériennes (A) dans les microcosmes avec et sans PHE et exsudats après 5 jours d'incubation et (B) dans les microcosmes avec PHE sans exsudats après 3, 4 et 5 jours d'incubation (trois répétitions par traitement). Les numéros localisent les bandes des fragments d'ADNr 16S utilisées pour l'identification bactérienne (Tableau 24)

Tableau 24 : Identification par séquençage et comparaison avec la banque de données NCBI des fragments d'ADN codant pour la petite sous-unité 16S de l'ARNr

Bandes	Espèces	Homologie	N°accession	Classe phylogénétique	Réf
n°1	<i>Enterobacter sp. DIC4RS</i>	100 %	GQ891865	Gammaprotéobactérie	Molina <i>et al.</i> , 2009
n°2	<i>Herbaspirillum sp. Chnp3-5</i>	99 %	AY367037	Betaprotéobactérie	Vacca <i>et al.</i> , 2005
n°3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99 %	AJ131116	Gammaprotéobactérie	Hauben <i>et al.</i> , 1999
n°4	<i>Pseudomonas putida CT27</i>	99 %	CP000712	Gammaprotéobactérie	Chen <i>et al.</i> , soumission direct NCBI
n°5	<i>Pseudomonas sp. CT19</i>	99 %	EU111730	Gammaprotéobactérie	Chen <i>et al.</i> , soumission direct NCBI
n°6	<i>Paenibacillus sp.</i>	99 %	AB376084	Firmicutes	Ueda <i>et al.</i> , 2008
n°7	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	99 %	AJ491845	Betaprotéobactérie	La Rosa <i>et al.</i> , 2006

6.3. Discussion

Cette expérience en microcosmes a permis de mettre en contact au même moment et dans des conditions contrôlées, un inoculum bactérien, le polluant et une source de carbone racinaire naturelle facilement assimilable par les microorganismes. Lors d'expériences avec des plantes en pots, la plantule met généralement plusieurs semaines pour développer son système racinaire. Or, ce temps ne semble pas compatible avec la cinétique de dégradation du phénanthrène artificiellement amendé et particulièrement biodisponible. En effet, cette expérience a montré que la dégradation du phénanthrène ajouté artificiellement à du sable était de l'ordre de quelques jours. Dans les expériences avec des plantes en pots et un ajout de phénanthrène, la dégradation du polluant pourrait être due majoritairement à des processus biologiques non rhizosphériques (Chiapusio *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2006). Dans cette expérience, l'ensemble du sable recevait la même quantité d'exsudats racinaires ce qui conduit à supprimer les variations spatiales dans la qualité des exsudats racinaires en fonction de la distance à la racine (Hinsinger *et al.*, 2005). Cette expérience simplifiée en microcosmes a permis une bonne homogénéité entre les traitements, en particulier au niveau de l'humidité et de la répartition des exsudats racinaires dans les flacons, et a ainsi permis de préciser le rôle des exsudats dans la minéralisation du phénanthrène.

L'inoculum bactérien provenait d'un sol historiquement contaminé en HAP dont les bactéries possédaient des gènes codant pour des HAP-dioxygénases (Cébron *et al.*, 2008). Lorsque la seule source de carbone a été le phénanthrène, l'inoculum bactérien issu de la terre contaminée a montré une forte capacité de dégradation du polluant, puisque la quasi-totalité de celui-ci a été dégradée en 5 jours. Cependant, seul 30 % du carbone du phénanthrène a été minéralisé en CO₂, ce qui suggère que le phénanthrène a été métabolisé en composés intermédiaires. Des analyses complémentaires en GC-MS sur des extraits au dichlorométhane n'ont révélé aucun métabolite du phénanthrène dans le sable à 3 jours. Des souches bactériennes pures sont capables d'utiliser plusieurs voies cataboliques pour dégrader le phénanthrène ce qui crée de nombreux métaboliques (Seo *et al.*, 2006; Moody *et al.*, 2001; Kosheleva *et al.*, 2000). Dans cette expérience, l'inoculum utilisé a regroupé un mélange de bactéries et a pu ainsi créer une variété importante de métabolites en faible concentration, qui ont pu ne pas être détectés.

Dans les conditions de culture très sélectives des incubations avec seulement du phénanthrène, seulement trois espèces majeures ont été présentes au bout de 5 jours, appartenant au genre *Herbaspirillum*, et aux espèces *Pseudomonas putida* et *Achromobacter xylosoxidans*. La présence de phénanthrène comme seule source de carbone, et sa dégradation au cours du temps, indiquent que ces bactéries sont capables d'utiliser le phénanthrène comme source de carbone. Toutefois, elles montrent des comportements différents en présence d'exsudats (-PHE+exsudats et +PHE+exsudats). Ainsi l'*Herbaspirillum* ne semble pas utiliser les exsudats seuls,

et n'est pas dominante en présence d'exsudats et de phénanthrène. En revanche, elle l'est en présence de phénanthrène seul. Bien que le genre *Herbaspirillum* ait été décrit comme préférentiellement endophyte (Olivares *et al.*, 1996), une espèce de *Herbaspirillum* capable de dégrader le phénanthrène a été isolée d'humus amendé en phénanthrène (Vacca *et al.*, 2005). Cette espèce *Herbaspirillum* sp. *chnp* 3-5 a été capable d'utiliser le phénanthrène comme source de carbone et d'énergie. Elle a présenté un taux de recouvrement de 99% avec le fragment d'ADNr 16S de notre étude. Une autre espèce, *Herbaspirillum seropedicae*, a été isolée à partir d'un sol contaminé en hydrocarbures et a été capable de minéraliser du naphthalène déposé sur de l'agar Noble (Wilson *et al.*, 2003). La bactérie du genre *Achromobacter* n'utilise pas non plus les exsudats ou n'est pas dominante dans ce cas, ni en présence de phénanthrène et exsudats, et elle est moins dominante que *Herbaspirillum* en présence de phénanthrène. L'espèce *Achromobacter xylosoxidans* a été antérieurement isolée à partir de sols contaminés en HAP (Daane *et al.*, 2001; La Rosa *et al.*, 2006; Vinas *et al.*, 2005). Cette espèce n'a pas été observée en présence d'exsudats racinaires (+PHE+exsudats). La troisième bactérie, *Pseudomonas putida*, utilise aussi bien les exsudats seuls, que le phénanthrène et le mélange des deux. De nombreuses études ont isolé *Pseudomonas putida* de sols contaminés (Juhász et Naidu, 2000; Leglize *et al.*, 2008) et ont constaté que cette espèce possédait des gènes codant des HAP-dioxygénases (Denome *et al.*, 1993; Rhee *et al.*, 2004). Cette espèce a été aussi observée en présence d'exsudats racinaires (+PHE+exsudats et -PHE+exsudats) et a été observée dans la rhizosphère des plusieurs plantes (Kuiper *et al.*, 2004). Cette espèce a toutefois semblé disparaître au profit de *Herbaspirillum* lorsque la majorité du phénanthrène a été épuisée. Ce résultat suggère que l'espèce d'*Herbaspirillum* mise en évidence serait capable d'utiliser les métabolites formés lors de la dégradation du phénanthrène.

La proportion de bactéries dégradantes dans la population totale (HAP-diox / ARNr 16S) a augmenté à plus de 50 % après 2 jours d'incubation en présence de phénanthrène comme seule source de carbone pour revenir à moins de 1 % après 5 jours lorsque le phénanthrène a été consommé. Cette proportion de moins de 1 % peut être rencontrée dans les terres contaminées de la friche industrielle de Neuves-Maisons (Cébron *et al.*, 2008) et peut correspondre à la situation où les HAP sont peu disponibles pour les bactéries. *Pseudomonas putida* et *Herbaspirillum* sp. ont été les deux espèces dominantes au début de l'expérience et *Pseudomonas putida* n'a plus été identifiée après 5 jours. Ce résultat pouvait suggérer que les amorces du gène HAP-diox GN amplifieraient les gènes codant une HAP-dioxygénase de *Pseudomonas putida*, mais pas nécessairement ceux d'*Herbaspirillum*. Les amorces des gènes HAP-diox GN ont effectivement été créées pour quantifier le gène *nahAC* présent chez *Pseudomonas putida* (Cébron *et al.*, 2008). À l'inverse, il existe peu d'études portant sur des espèces d'*Herbaspirillum* dégradant les HAP et les gènes impliqués dans la dégradation des HAP ne sont pas déterminés. Cependant, après avoir demandé la souche d'*Herbaspirillum* sp. *chnp* 3-5 aux auteurs et l'avoir testée, il s'est avéré qu'elle possédait le gène de HAP-diox GN (A.Cébron, communication personnelle). Ainsi ces

résultats suggèrent que ces deux bactéries possèdent ce gène, mais peut-être avec des nombres de copies ou de plasmides différents. L'analyse par TTGE des communautés fonctionnelles (possédant le gène HAP-diox GN) ou l'utilisation d'un HAP marqué permettrait de préciser davantage quelles sont les bactéries impliquées dans sa biodégradation.

En présence d'exsudats seuls (-PHE+exsudats) l'augmentation au cours de l'incubation du nombre de copies de gène ARNr 16S et de gènes codant des HAP-dioxygénases indique que les bactéries de l'inoculum ont utilisé les exsudats pour leur croissance, y compris celles possédant le gène de HAP-dioxygénase. Ce résultat soutient l'hypothèse que le rôle des plantes dans la biodégradation des HAP est lié à la stimulation des communautés bactériennes dégradantes (Anderson *et al.*, 1993; Siciliano et Germida, 1998). Dans un sol contaminé en pyrène après 18 semaines de culture, la présence de plante (*Lolium multiflorum* L.) a aussi augmenté la quantité de gènes codant une HAP-dioxygénase (Khan *et al.*, 2009). Après deux ans de culture *in situ* dans une terre historiquement contaminée en HAP, la présence de plantes (*Medicago sativa*) a augmenté la proportion de gènes codant des HAP-dioxygénases par rapport au sol nu (Cébron *et al.*, 2009). D'autres études ont montré que des extraits de mûrier (*Morus alba* L.), lesquels sont riches en composés phénoliques, pouvaient accroître la quantité de gènes de dégradation de composés aromatiques notamment les gènes codant une phénol-hydroxylase (*dmpN*) et une toluène dioxygénase (*todC1*) en absence de contaminants dans le sol (Da Silva *et al.*, 2006). L'analyse de la composition des exsudats, exceptée celle en carbone total, et de certains composés comme les acides carboxyliques, acides organiques, n'a pas été pu être réalisée en fin d'incubation. Il n'est donc pas possible d'identifier dans les exsudats les composés qui ont été utilisés par ces bactéries pour leur croissance hormis pour l'oxalate et le succinate qui ont diminué significativement au cours de l'incubation.

Dans cette expérience, la présence d'exsudats racinaires a augmenté la quantité de gènes codant pour une HAP-dioxygénase et le pourcentage de ces gènes de dégradation a été significativement plus élevé en présence d'exsudats racinaires (-PHE+exsudats et +PHE+exsudats) qu'en présence de phénanthrène seul (+PHE-exsudats). Par ailleurs, la présence d'exsudats a ralenti la dégradation du phénanthrène. Ainsi, malgré la présence des gènes codant la HAP-dioxygénase, la synthèse des enzymes semble avoir été réprimée. Il faut souligner que la quantité de carbone ajoutée par les exsudats racinaires ($1800 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) a été beaucoup plus importante que celle apportée par le polluant ($188 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), et a contribué à limiter la dégradation de celui-ci. La régulation globale du cycle du carbone par les bactéries est un phénomène qui implique plusieurs moyens de contrôle pour induire ou réprimer la synthèse de gènes codant les enzymes de dégradation (Dal *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que le contrôle global de la régulation du carbone influence la dégradation des HAP (Kamath *et al.*, 2004; Rentz *et al.*, 2004). L'acide succinique a été proportionnellement l'acide organique le plus important en concentration dans les exsudats racinaires. Or, le succinate a réprimé

l'induction des gènes codant pour une HAP-dioxygénase (Kamath *et al.*, 2004). Les exsudats ont été facilement assimilés par les bactéries, ce que montre la quantité importante de CO₂ produit pendant les deux premiers jours d'incubation.

Les exsudats racinaires ont augmenté la diversité bactérienne dans les microcosmes par rapport aux microcosmes avec phénanthrène seul. Cependant, bien que 20 % du phénanthrène ait été dégradé à 5 jours (40 µg. g⁻¹) en présence de phénanthrène et exsudats, la structure des communautés bactériennes n'est pas différente de celle du témoin ne contenant que des exsudats racinaires (-PHE+exsudats), et aucune espèce bactérienne n'a semblé avoir été stimulée par la présence simultanée des deux sources de carbone peut-être en raison de l'apport de phénanthrène qui ne représentait que 10 % du carbone apporté par les exsudats. Néanmoins, les bactéries capables d'utiliser le carbone des exsudats racinaires pourraient aussi dégrader le phénanthrène et inversement. *Pseudomonas putida*, qui a semblé être impliquée dans la dégradation du phénanthrène de la modalité sans exsudats (+PHE-exsudats), est présente dans la rhizosphère de diverses espèces de plantes (Kuiper *et al.*, 2004). D'autres part, les bactéries du genre *Paenibacillus* ont été antérieurement citées pour leur capacité à dégrader des HAP légers (Daane *et al.*, 2002; Daane *et al.*, 2001) et ont été retrouvées *in situ* dans la terre contaminée des parcelles plantées d'où provient l'inoculum (Cébron *et al.*, 2009). De même, *Stenotrophomonas maltophilia*, antérieurement isolée à partir de sol contaminé en pétrole et en HAP (Mueller *et al.*, 1997; Vacca *et al.*, 2005; Liste et Prutz, 2006; Leglize *et al.*, 2008) est présente dans la rhizosphère de nombreuses plantes (Debette et Blondeau, 1980; Hartmann *et al.*, 2009) et un enrichissement en exsudats racinaires artificiels a stimulé la présence de cette bactérie dans un sol pollué par des métaux (Kozdroj et van Elsas, 2000). *Enterobacter sp.* possède 100% d'homologie avec une souche isolée à partir d'un sol de raffinerie dont l'inoculum a été sélectionné par l'ajout de HAP dont le phénanthrène (Molina *et al.*, 2009), mais cette espèce n'a pas été décrite comme rhizosphérique. D'autres *Enterobacter* ont été identifiées comme capables de dégrader les HAP (Toledo *et al.*, 2006), et même ont été parfois décrites comme rhizosphériques et capables de dégrader les HAP (Sheng *et al.*, 2008).

La majorité des genres bactériens identifiés appartenait à des bactéries à Gram négatif, qui sont prédominantes dans les sols (Rhee *et al.*, 2004; Vinas *et al.*, 2005). Dans le sol de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons, dont est issu l'inoculum, Cébron *et al.* (2008) avaient déjà montré que les gènes HAP-diox GN prédominaient par rapport aux gènes HAP-diox GP d'un facteur 10 à 100.

6.4. Conclusion

Dans cette expérience en microcosmes avec un inoculum bactérien adapté à la dégradation des HAP, la cinétique de dégradation du phénanthrène a été très rapide et l'ensemble du phénanthrène a été dégradé en quelques jours. Cette expérience montre que l'ajout d'exsudats racinaires a augmenté la quantité de gènes codant pour une HAP-dioxygénase. Cependant les exsudats racinaires ont ralenti la dégradation du phénanthrène peut-être par régulation globale du cycle du carbone. L'analyse de la structure des communautés bactériennes par TTGE a montré un nombre de bandes, qui reflète une diversité bactérienne, un peu plus élevé en présence d'exsudats racinaires, qu'en présence de phénanthrène seul. Les bactéries majoritaires identifiées sont différentes en présence de phénanthrène et en présence d'exsudats, mais en présence d'exsudats et de phénanthrène, elles sont identiques à celles identifiées en présence d'exsudats seuls. Seule une espèce *Pseudomonas putida* a été retrouvée dans tous les traitements et utiliserait aussi bien les exsudats que le phénanthrène comme source de carbone. Les dispositifs en microcosmes avec ajout d'exsudats racinaires ont ainsi semblé bien adaptés pour le suivi des bactéries impliquées dans la dégradation du phénanthrène. Toutefois, pour relier la dégradation du polluant à une espèce de bactérie, et préciser réellement quelles sont les bactéries impliquées dans sa biodégradation, il serait intéressant d'utiliser un HAP marqué.

7. Effet des exsudats racinaires sur la biodisponibilité des HAP dans trois sols historiquement contaminés

La biodégradation des HAP dans le sol est majoritairement d'origine bactérienne (Cerniglia, 1992). Pour les dégrader, les bactéries doivent nécessairement absorber les HAP à partir de la solution du sol (Wodzinski et Bertolini, 1972; Wodzinski et Coyle, 1974; Wick *et al.*, 2002). Or, la fraction des HAP pouvant être dégradée par les bactéries, appelée fraction biodisponible, ne représente qu'une partie des HAP totaux d'un sol (Hatzinger et Alexander; Harms et Bosma, 1997). L'effet des exsudats racinaires sur la dissipation des HAP dans le sol est principalement lié à la stimulation d'une microflore tellurique capable de dégrader les polluants (Yoshitomi et Shann, 2001; Günther *et al.*, 1996; Binet *et al.*, 2000; Joner et Leyval, 2003; Xu *et al.*, 2006; Chiapusio *et al.*, 2007). De plus, les bactéries peuvent aussi libérer dans le milieu des surfactants pouvant augmenter la solubilité apparente des HAP (Déziel *et al.*, 1996; Toledo *et al.*, 2006). Cependant, il a été montré que les exsudats racinaires peuvent avoir un effet physico-chimique sur la labilité des HAP dans le sol. En effet, certains travaux ont montré que malgré un temps de demi-vie court des exsudats, des plantes produisant des composés phénoliques modifiaient l'hydrophobicité générale du sol soumis à l'influence des racines et ainsi modifiaient l'adsorption des HAP dans le sol (Hedge et Fletcher, 1996; Liste et Prutz, 2006; Cofield *et al.*, 2007). De plus, Yang *et al.* (2001) ont montré que le citrate libéré par les exsudats racinaires modifiait la structure du sol, au niveau du complexe minéral-(cation)-humus, ce qui pouvait remobiliser la matière organique et les colloïdes sur lesquels des HAP étaient adsorbés. Néanmoins, l'ajout d'acides organiques présents dans les exsudats, comme les acides malique et malonique, a augmenté l'adsorption du phénanthrène artificiellement contaminé dans la matrice d'un sol (Ouvrard *et al.*, 2006). Plus globalement, la mobilité et la disponibilité des HAP, estimées par des méthodes physico-chimiques, peuvent augmenter ou au contraire diminuer en présence de plante (Liste et Alexander, 2000; Parrish *et al.*, 2005). L'objectif de cette expérience a été d'étudier l'effet des exsudats racinaires sur la biodisponibilité des HAP de terres historiquement contaminées, présentant des niveaux de contamination différents. La biodisponibilité des HAP a été estimée par une extraction à la cyclodextrine (Reid *et al.*, 2000b; Allan *et al.*, 2006; Swindell et Reid, 2006), comme dans le chapitre 5.

7.1. Description de l'expérience

Cette expérience a été réalisée en flacons avec trois terres contaminées provenant des cokeries de Neuves-Maisons et Homécourt et d'un site industriel du Nord de la France dénommé « Elf » (§3.1.1.2). Les microcosmes contenaient 10 g de terre, avec ou sans ajout d'exsudats racinaires (100 mg) issus d'une culture de ray-grass (*Lolium perenne* L.) (§3.2.5). Les terres ont été placées à 80 % de la capacité de rétention en eau (eau distillée) et les microcosmes ont été fermés hermétiquement puis incubés dans une chambre d'incubation pendant 8 jours et à 24°C. À la fin de l'expérience, les HAP ont été extraits par une solution de cyclodextrine à partir du sol frais (sans séchage, ni broyage). Les HAP ont été extraits à partir de 1,25 g de terre par la solution de cyclodextrine (50 mM; 25 mL), avant d'être transférés dans le dichlorométhane par une extraction liquide/liquide puis concentrés sous vide (§3.3.4.2.2.). Le reste des terres a été séché par lyophilisation puis broyé. Les HAP ont ensuite été extraits sous pression au dichlorométhane (§3.3.4.1.1). Les HAP ont été analysés par HPLC couplée à un détecteur UV (16 HAP) (§3.3.4.3.3). Le prélèvement à T₀ a été réalisé sur des terres réincubées avec de l'eau à 80% de la capacité de rétention pendant 24 heures à 4°C, et l'extraction à la cyclodextrine a été réalisée sur la terre réincubée. Les modalités ont été réalisées avec 5 répétitions.

Une expérience complémentaire a été réalisée pour distinguer l'effet physico-chimique des exsudats de l'effet induit par la microflore notamment la biodégradation ou la production de surfactants bactériens. Ainsi, l'expérience a été conduite sur un temps très court pour étudier l'effet des exsudats racinaires sur la quantité de HAP extraits. Pour cela, une solution contenant des exsudats racinaires ou une solution minérale a été ajoutée à la terre de Elf, suivie d'une extraction à la cyclodextrine. Les concentrations en HAP ont été analysées dans les solutions ajoutées et dans la solution d'extraction à la cyclodextrine. L'expérience a été réalisée dans des tubes de centrifugation avec 5 g de terre Elf (initialement broyée puis réincubée à 80 % de la capacité de rétention en eau) auxquels ont été ajoutés 10 mL de solution d'exsudats racinaires (50 mg d'exsudats lyophilisés et 10 mL d'eau distillée) ou de solution minérale. La concentration de sels minéraux utilisée pour cette dernière solution a été déterminée à partir de l'analyse d'un échantillon de poudre d'exsudats à l'ICP-OES (§3.3.1.1) et la composition des sels a été déduite d'après le milieu de culture hydroponique du ray-grass (§3.2.5.3). La concentration des sels minéraux utilisés était la suivante : Ca(NO₃)₂·4H₂O : 352,5 mg/L; Fe-EDTA : 35,4 mg/L; MnCl₂·4H₂O : 0,72 mg/L; MgSO₄·7H₂O : 730,8 mg/L; Na₂MoO₄·4H₂O : 620 mg/L; KNO₃ : 686,69 mg/L; KH₂PO₄ : 918,67 mg/L. Les tubes ont été scellés puis agités de manière orbitale pendant 4 heures à 100 rotations par minute. Enfin, les tubes ont été centrifugés à 14000 g pendant 20 min. Les HAP contenus dans la solution ont été extraits au dichlorométhane puis analysés par HPLC avec un détecteur UV. Une extraction à la cyclodextrine (50 mM; 25 mL) a été réalisée sur le culot de terre (5 g) lequel était saturé en eau. Les HAP contenus dans la

solution de cyclodextrine ont été transférés dans le dichlorométhane par extraction liquide/liquide, puis les extraits ont été concentrés avant d'être analysés comme ci-dessus. Quatre répétitions été réalisées.

7.2. Résultats

7.2.1. Compositions des exsudats racinaires

Les concentrations en carbone total et en carbone inorganique ont été respectivement de 122 mg.g⁻¹ et 29 mg.g⁻¹ d'exsudats racinaires. Le lot d'exsudats racinaires utilisé dans cette expérience (lot 2) était notamment composé d'acides organiques et d'éléments minéraux (Tableau 25). Le succinate, bien que coélué avec le malate, était le composé organique majoritaire suivi du citrate et de l'acétate.

Tableau 25 : Concentrations des acides organiques et des éléments minéraux dans la poudre d'exsudats racinaires lyophilisés à T₀ (mg.g⁻¹ d'exsudats racinaires). <LQ : inférieur à la limite de quantification, N.Q. : non quantifié car co-élution avec le succinate.

	Exsudats (Lot 2) mg.g ⁻¹		Exsudats (Lot 2) mg.g ⁻¹
Gluconate	< L.Q.	Ca	11,96
Lactate	9,40	Fe	0,35
Acétate	5,20	K	105,66
Propionate	< L.Q.	Mg	16,05
Formate	1,80	Mn	0,05
Butyrate	< L.Q.	Na	15,76
Pyruvate	< L.Q.	Si	0,37
Succinate	25,50	P	0,5
Malate	N.Q.	Carbone total	121,7
Oxalate	1,40	Carbone inorganique	29,07
Citrate	10,40	Azote total	15,0

Note: Dans l'expérience complémentaire (50 mg de poudre d'exsudats utilisés avec 10 mL d'eau), le citrate (10,40 mg/g d'exsudats) a représenté une concentration finale de 0,23 mM.

7.2.2. Dissipation des HAP dans les trois sols en présence et en absence d'exsudats racinaires

Les trois terres choisies ont des niveaux de contamination significativement différents, la terre issue du site contaminé dit Elf étant significativement plus polluée en HAP que la terre de Homécourt et celle de Neuves Maisons. Les profils de ces trois terres étaient relativement similaires dans la mesure où elles sont constituées majoritairement de composés aromatiques de 4 cycles (plus de 40 % des HAP totaux). Le naphthalène était peu abondant (moins de 2 %) et les HAP à 3 cycles aromatiques représentaient entre 20 et 30 % des HAP totaux. Toutefois, la terre de Neuves-Maisons présentait des teneurs en HAP à 5 cycles et plus supérieures aux deux autres terres (autour de 36 %). Le rapport fluoranthène / (fluoranthène + pyrène) supérieur à 0,6 et le rapport indéno(1,2,3-cd)pyrène / (indéno(1,2,3-cd)pyrène + benzo(ghi)perylène) supérieur à 0,5 ont confirmé l'origine pétrogénique des HAP (Colombo *et al.*, 1989; Mandalakis *et al.*, 2005). L'analyse par ANOVA de l'ensemble des trois terres a montré que les concentrations en HAP n'ont pas été significativement modifiées par l'ajout d'exsudats racinaires. Toutefois, on peut noter que la simple mise en incubation pendant 8 jours des terres de Neuves-Maisons et de Homécourt, sans apport d'exsudats, a augmenté significativement la concentration de certains HAP comme l'acénaphthylène, le fluorène, le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène (données présentées en Annexe 5).

La concentration des 16 HAP extraits dans la terre de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons était de $777 \pm 36 \mu\text{g.g}^{-1}$ au début de l'expérience (T_0). Après 8 jours d'incubation, la somme des HAP était en présence d'exsudats racinaires de $828 \pm 26 \mu\text{g.g}^{-1}$ et en absence d'exsudats de $888 \pm 30 \mu\text{g.g}^{-1}$. Les trois modalités n'ont pas présenté de différences significatives dans la concentration des 16 HAP, ni dans la somme des HAP de deux, trois et cinq ou plus de cycles. Cependant, la somme des HAP extraits de quatre cycles (fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène) a augmenté significativement au cours des 8 jours d'incubation, en présence comme en absence d'exsudats (Figure 30a).

La concentration des 16 HAP extraits par ASE dans la terre de l'ancienne cokerie d'Homécourt était de $2820 \pm 136 \mu\text{g.g}^{-1}$ au début de l'expérience. Après 8 jours d'incubation, la somme des 16 HAP était de 3190 ± 62 et $3300 \pm 118 \mu\text{g.g}^{-1}$ en présence et en absence d'exsudats. La concentration des 16 HAP et celle des HAP de deux, trois et quatre cycles étaient significativement plus importantes après 8 jours d'incubation en présence et en absence d'exsudats racinaires par rapport à T_0 mais sans faire apparaître de différence entre la présence ou non d'exsudats racinaires (Figure 30b).

La concentration des 16 HAP extraits dans la terre Elf était de $19680 \pm 1000 \mu\text{g.g}^{-1}$ au début de l'expérience. Après 8 jours d'incubation, la somme des HAP était de $22500 \pm 1700 \mu\text{g.g}^{-1}$ et $22900 \pm 1350 \mu\text{g.g}^{-1}$ en présence et en absence d'exsudats. Les trois modalités n'ont pas présenté de différence significative dans la concentration des 16 HAP, ni dans celles des HAP de deux, trois, quatre et cinq ou plus de cycles (Figure 30c).

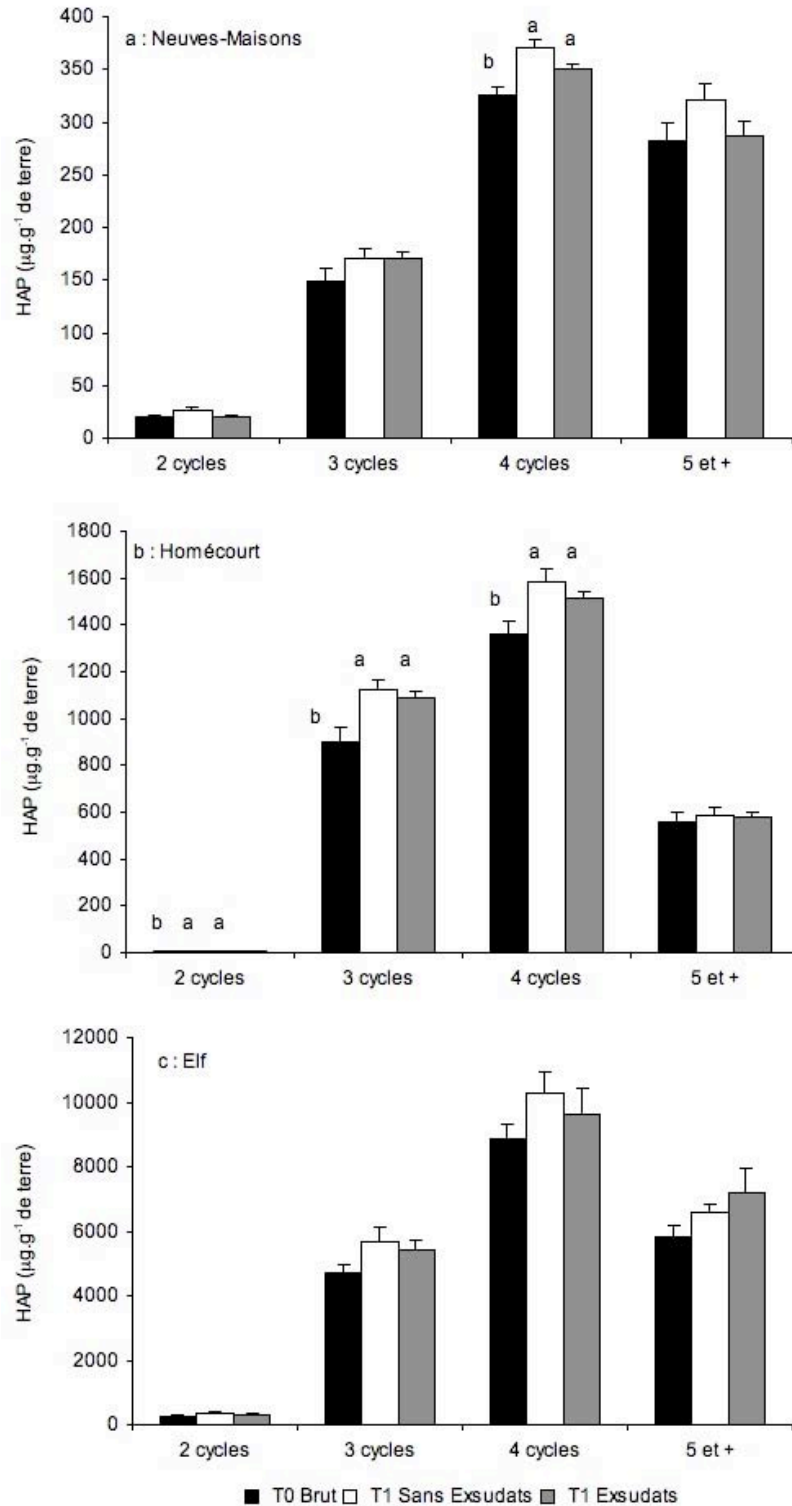


Figure 30 : Concentrations en HAP ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) extractibles à l'ASE au dichlorométhane dans les terres contaminées des anciens sites industriels de (a) Neuves-Maisons, (b) Homécourt et (c) Elf au début de l'expérience (T_0) et après 8 jours d'incubation avec et sans exsudats racinaires. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0.05$) entre les traitements.

7.2.3. Disponibilité de HAP extraits à la cyclodextrine dans les trois sols

La concentration des 16 HAP extraits à la cyclodextrine dans la terre de Neuves-Maisons était en moyenne de $7 \mu\text{g.g}^{-1}$, soit environ 1 % de la concentration des HAP extraits à l'ASE. Globalement, les HAP à 3 cycles ont été significativement plus extraits après l'ajout d'exsudats racinaires (Figure 31a). L'analyse détaillée des 16 HAP montre que la cyclodextrine a extrait significativement plus d'acénaphthène, de fluoranthène et de pyrène (Annexe 6 et Annexe 7) dans la modalité avec exsudats racinaires après 8 jours d'incubation qu'en absence d'exsudats.

Dans la terre d'Homécourt, la concentration des 16 HAP extraits à la cyclodextrine était plus importante que dans la terre de Neuves-Maisons. Elle a été en moyenne de $26 \pm 1,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ au début de l'expérience, soit moins de 1 % de la concentration des HAP extraits à l'ASE. L'incubation pendant 8 jours et l'apport d'exsudats n'ont pas significativement modifié les concentrations de HAP extraits à la cyclodextrine, hormis celle des HAP de 4 cycles, qui a diminué significativement après 8 jours d'incubation, mais qui après ces 8 jours était plus importante en présence qu'en absence d'exsudats (Figure 31b). L'analyse détaillée des 16 HAP montre que cet effet est surtout lié à une augmentation significative de la concentration du pyrène en présence d'exsudats (Annexes 6 et 7).

Dans la terre Elf, la concentration des 16 HAP extraits à la cyclodextrine dans la terre Elf a été estimée à $112 \pm 9 \mu\text{g.g}^{-1}$ sol au début de l'expérience, soit environ 0,5 % de la concentration des HAP totaux. Après 8 jours d'incubation, ces concentrations atteignaient 106 ± 15 et $90 \pm 12 \mu\text{g.g}^{-1}$ en présence et en absence d'exsudats racinaires. Les trois modalités de traitements n'ont pas présenté de différence significative dans les concentrations des 16 HAP, ni dans celles des HAP de deux, trois et cinq ou plus de cycles. Cependant, la concentration des HAP de quatre cycles et celle des HAP individuels comme le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène étaient significativement plus faibles après 8 jours qu'à T_0 (Annexe 6 et Annexe 7). Aucune différence significative n'est apparue entre les modalités avec et sans exsudats bien qu'une tendance pour les HAP à 4 cycles à être davantage extraits en présence d'exsudats mérite d'être soulignée (Figure 31c).

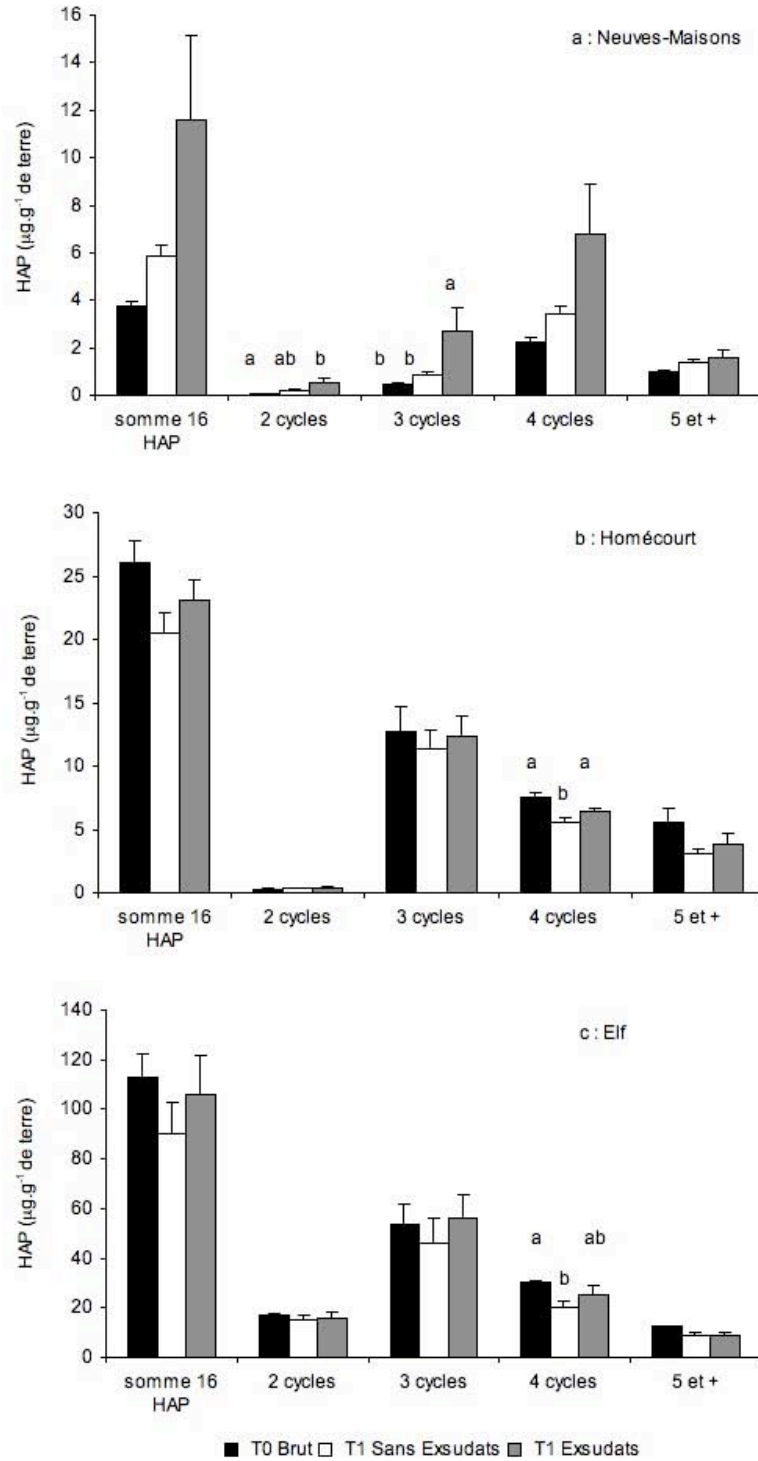


Figure 31: Concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles à la cyclodextrine dans les terres contaminées des anciens sites industriels de (a) Neuves-Maisons, (b) Homécourt et (c) Elf au début de l'expérience (T_0) et après 8 jours d'incubation (T_1) avec et sans exsudats racinaires. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0.05$) entre les traitements.

7.2.4. Extraction des HAP par une solution contenant des exsudats racinaires

En présence d'exsudats racinaires, la concentration des 16 HAP extraits par la solution a représenté moins de 0,1 % de la quantité totale de HAP extraits par ASE (concentration moyenne des 16 HAP dans la terre Elf, 20 mg.g⁻¹). Les HAP à 4 cycles ont été significativement plus extraits dans la solution en présence d'exsudats racinaires (Tableau 26). La solution contenant les exsudats racinaires naturels a extrait significativement plus de phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène et benzo(a)anthracène que la solution aqueuse ne contenant que des sels minéraux (Annexe 8 et Annexe 9).

La solution de cyclodextrine utilisée de manière séquentielle sur la terre après l'extraction par la solution minérale ou les exsudats, a extrait significativement plus de HAP (somme des 16 HAP et somme des HAP de 4 cycles) en présence d'exsudats racinaires (Tableau 26). La somme des HAP extraits a été de 254 ± 1 µg.g⁻¹ de terre soit plus de 1 % des HAP extraits au dichlorométhane. Cependant, cette différence en présence d'exsudats n'apparaît significative que pour l'acénaphthylène (Annexe 8 et Annexe 9)

Tableau 26 : Concentrations en HAP de la terre Elf (µg.g⁻¹ de terre) dans la solution du sol après 4 heures d'incubation et dans les extraits à la cyclodextrine avec et sans exsudats racinaires (moyenne et erreur standard sur 4 répétitions). Les lettres représentent des différences significatives (P < 0,05).

Concentration en HAP dans :	la solution du sol après 4 heures d'incubation		les extraits à la cyclodextrine	
	Solution minérale	Solution avec exsudats	Solution minérale	Solution avec exsudats
Somme 16 HAP	9,1 ± 0,2	11,1 ± 0,4	231,6 ± 8,4 A	254,2 ± 0,7 B
Somme 2 cycles	2,2 ± 0,2	2,6 ± 0,1	31,8 ± 2,3	35,0 ± 1,5
Somme 3 cycles	3,8 ± 0,2	4,9 ± 0,4	138,5 ± 4,0	146,2 ± 3,8
Somme 4 cycles	1,0 ± 0,0 a	1,5 ± 0,1 b	51,8 ± 2,7 A	55,6 ± 1,1 B
Somme 5 et plus	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,1	9,4 ± 0,4	17,4 ± 5,8

7.3. Discussion

Les quantités totales de HAP extraites au dichlorométhane ont montré de nettes différences entre les trois terres, la terre Elf présentant une contamination largement supérieure aux deux terres de cokeries. Mais les trois terres contaminées ont présenté les mêmes contributions relatives de HAP extraits au dichlorométhane. Les concentrations de HAP extraites par le dichlorométhane ne reflètent pas la fraction de HAP disponible pour les organismes vivants (Alexander, 2000; Reid *et al.*, 2000a) et aucun effet des exsudats racinaires sur ces concentrations n'a été observé sur les trois terres étudiées.

Bien que le dichlorométhane soit un des solvants les plus utilisés pour extraire les HAP, les résultats obtenus suggèrent que cette technique n'a pas extrait la totalité des HAP présents. En effet, à plusieurs reprises les concentrations en HAP extraits étaient plus importantes après 8 jours d'incubation. Ce phénomène, déjà observé dans le chapitre 5, ne semble pas lié à l'hétérogénéité des terres, puisque les terres étaient homogénéisées avant l'expérience, broyées avant extraction sous pression à l'ASE, et qu'une prise d'essai plus importante (4 g) a été analysée. Quelques études ont observé des résultats similaires où les concentrations en HAP étaient plus importantes au cours de l'expérience que les concentrations initiales, mais seulement sur les HAP de 4, 5 et 6 cycles aromatiques (Joner *et al.*, 2002; Liste et Alexander, 2000; Liste et Prutz, 2006). La température a pu jouer un rôle important sur la libération des HAP dans la solution du sol (Kim et Osako, 2003). L'incubation à 24°C pendant 8 jours a favorisé l'activité microbienne et a pu ainsi modifier les conditions physico-chimiques à l'intérieur des microcosmes et finalement affecter la désorption des HAP (Joner *et al.*, 2002).

Le rapport des concentrations de HAP extraits à la cyclodextrine et au dichlorométhane (autour de 1 %) indique que la majorité des HAP de ces terres historiquement polluées est non disponible à la dégradation. Stokes *et al.* (2005) ont montré que les HAP d'origine historique dans les sols sont fortement adsorbés dans la matrice du sol et sont moins extraits par la cyclodextrine que les HAP fraîchement ajoutés. L'effet de vieillissement des HAP dans le sol qui diminue leur disponibilité a été fréquemment observé (Hattinger et Alexander, 1995; Pignotello et Xing, 1996; Cornelissen *et al.*, 2005). La quantité de HAP extraits à la cyclodextrine a varié selon la terre utilisée montrant ainsi que la concentration de cyclodextrine (50 mM) n'a pas été le facteur limitant pour l'extraction des HAP pour les terres de Neuves-Maisons et d'Homécourt. Alors que l'extraction au dichlorométhane a extrait majoritairement des HAP composés de plus de quatre cycles aromatiques (40 %), la cyclodextrine a extrait majoritairement des composés à trois et quatre cycles aromatiques. Cependant lorsque la quantité de HAP extraits à la cyclodextrine a été rapportée à la quantité extraite par le dichlorométhane, la cyclodextrine a préférentiellement extrait des HAP de 2 cycles (5 % pour la moyenne des 3 terres) et des HAP à 3 cycles (1 %) (Tableau 27). La cyclodextrine a semblé extraire préférentiellement les HAP de faible poids moléculaire notamment pour les terres de Homécourt et de Elf. La cyclodextrine forme un

complexe 1:1 avec des HAP de petites tailles comme le naphthalène, le phénanthrène et l'anthracène et des inclusions 1:2 avec des HAP de taille plus importante (Wang et Brusseau, 1995). Le prélèvement des HAP par la cyclodextrine diminue lorsque la masse moléculaire des HAP augmente (Reid *et al.*, 2000b) et la biodisponibilité des HAP est, elle aussi, dépendante du poids moléculaire des HAP et diminue lorsque le poids moléculaire augmente (Juhasz et Naidu, 2000; Kanaly et Harayama, 2000).

Au cours de ses travaux de thèse, Barnier (2009) a estimé la disponibilité des HAP par la résine Tenax pour trois terres historiquement contaminées en HAP. Cette fraction extractible des HAP par la résine Tenax a représenté pour les terres de Neuves-Maisons et de Homécourt respectivement 1,3 % et 4,2 % de la teneur en HAP totaux. Cependant les spectres des HAP extraits par la résine Tenax ont été proches des spectres des HAP totaux pour les trois terres contaminées (Barnier, 2009). Les extractions par la résine Tenax n'ont pas discriminé les HAP en fonction de leur nombre de cycles aromatiques. L'extraction avec du butanol comme solvant d'extraction modérée surestimait aussi la fraction de HAP disponible du sol de Neuves-Maisons, puisque près de 40 % de la quantité de HAP totaux étaient extraits (Barnier, 2009), ce qui est cohérent avec les essais préliminaires réalisés au cours de cette thèse (cf. chapitre M&M). La quantité de HAP extractibles au butanol à partir de sols contaminés était aussi surestimée par rapport à la quantité de HAP minéralisée par l'activité bactérienne dans des travaux antérieurs (Liste et Alexander, 2002; Thiele-Bruhn et Brummer, 2004).

L'extraction ménagée à la cyclodextrine a permis de mettre en évidence un effet des exsudats racinaires sur la concentration extractible des HAP et a confirmé les observations réalisées dans le chapitre 5. L'ajout d'exsudats racinaires a globalement augmenté la quantité de HAP extraits par la cyclodextrine notamment pour les trois terres contaminées après 8 jours et a augmenté la quantité de HAP dans les extraits aqueux et dans les extraits à la cyclodextrine pour la terre Elf. Dans la seconde expérience, dont le temps d'incubation a été court (4 heures), un rôle actif des microorganismes vis-à-vis de la disponibilité des HAP peut être négligé. Des espèces bactériennes, comme *Pseudoxanthomonas spp.*, ont en effet été identifiées comme pouvant produire des surfactants (rhamnolipides) qui améliorent la solubilité apparente des HAP (Chang *et al.*, 2005; Nayak *et al.* 2009). Cette expérience a montré une augmentation significative de la concentration en HAP extractibles à la cyclodextrine en présence d'exsudats, suggérant que l'effet des exsudats soit lié au moins en partie aux exsudats eux-mêmes, et pas uniquement à l'activité microbienne stimulée par ceux-ci.

Tableau 27 : Comparaison des répartitions relative des HAP extraits à la cyclodextrine par rapport aux HAP extraits au dichlorométhane dans les modalités sans et avec exsudats après 8 jours d'incubation ([HAP]_{cyclodextrine} / [HAP]_{DcM} en %).

	2 cycles	3 cycles	4 cycles	5 et +
NM sans exsudats	0,8 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,0
NM avec exsudats	2,8 ± 1,1	1,6 ± 0,6	2,0 ± 0,6	0,6 ± 0,1
Hom sans exsudats	6,3 ± 0,8	1,1 ± 0,2	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1
Hom avec exsudats	7,8 ± 1,5	1,2 ± 0,2	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,1
Elf sans exsudats	4,0 ± 0,7	0,8 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Elf avec exsudats	5,5 ± 1,3	1,1 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0

Les exsudats racinaires comportent un mélange complexe de composés, et il est difficile d'identifier ou de préciser ceux qui sont directement impliqués dans ce résultat. Cependant, parmi les composés présents dans les exsudats racinaires, les acides organiques pourraient, entre autres, jouer un rôle dans la disponibilité des HAP. Ainsi, le citrate (0,01 mM) a augmenté la désorption du phénanthrène dans un sol par déstructuration des agrégats (Yang *et al.*, 2001). Les ions minéraux (Fe³⁺, Ca²⁺...) permettent l'association des composés humiques et des minéraux argileux pour former des agrégats. Ces complexes organo-minéraux peuvent renfermer des HAP (Bonin et Simpson, 2007; Chefetz *et al.*, 2000; Gunasekara et Xing, 2003; Wang et Xing, 2005). Les acides tricarboxyliques (ex: citrate) peuvent chélater les cations métalliques et interagir avec les complexes humiques (Jones et Brassington 1998; Nardi *et al.*, 2000; Chaudhry *et al.*, 2005). Les substances humiques peuvent ainsi être davantage dissoutes dans la phase aqueuse ce qui peut augmenter la solubilité apparente des HAP dans la solution du sol et augmenter la biodisponibilité des HAP (Hwang et Cutright, 2004; Fava *et al.*, 2004). D'autres études ont montré que les acides organiques présents dans les exsudats pouvaient faciliter la désorption de polluants aromatiques chlorés dont le p,p'-DDT sur le même principe de chélation de cations structurant la matière organique (White *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2006).

La méthode de production des exsudats racinaires en culture hydroponique avec concentration des exsudats par lyophilisation a aussi concentré les éléments minéraux (Ca, Mg, K...), ce qui a pu contribuer à modifier la disponibilité des HAP. La comparaison de l'extraction avec la solution minérale et la solution contenant des exsudats (Tableau 26) suggère toutefois que l'augmentation de la fraction la plus facilement mobilisable des HAP n'était pas liée uniquement aux sels minéraux contenus dans les exsudats racinaires.

7.4. Conclusion

L'ajout d'exsudats racinaires à trois terres historiquement contaminées n'a pas eu d'effet sur la quantité de HAP totaux extraits au dichlorométhane par ASE. L'utilisation de la cyclodextrine comme moyen d'extraction non exhaustif des HAP a permis de mettre en évidence l'effet des exsudats racinaires sur les HAP de ces sols de friches industrielles. Ainsi, dans cette expérience, l'ajout d'exsudats racinaires a augmenté la quantité de HAP extraits par la cyclodextrine pour deux des trois terres historiquement contaminées. La fraction de HAP extraits par la cyclodextrine a représenté près de 1 % de la quantité de HAP totaux et a été en accord avec la faible dégradation des HAP dans ces terres historiquement contaminées. Ces résultats ont confirmé ceux présentés dans l'expérience en dispositifs à compartiments, où la présence du tapis racinaires augmentait la quantité de HAP extraits à la cyclodextrine. Ces sont les HAP les plus légers (2 à 4 cycles) qui ont été davantage extraits en présence d'une solution d'exsudats racinaires. L'expérience complémentaire de courte durée (4 heures) a montré que la capacité des exsudats à augmenter l'extractibilité des HAP dans les terres historiquement contaminées était au moins en partie liée aux exsudats eux-mêmes et pas uniquement aux microorganismes stimulés par la présence des exsudats.

8. Etude des communautés bactériennes impliquées dans la dégradation du phénanthrène par l'utilisation de ^{13}C et effet des exsudats racinaires sur ces communautés

Dans les expériences précédentes, les communautés bactériennes dégradantes et leur activité dans la rhizosphère ou en présence d'exsudats ont été appréhendées indirectement par le suivi de la dissipation des HAP, par la quantification des gènes codant des HAP-dioxygénases et par la comparaison des empreintes moléculaires par électrophorèse TTGE. Cependant ces techniques n'ont pas permis de discriminer avec certitude les communautés fonctionnelles directement impliquées dans la dégradation des HAP notamment du phénanthrène. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec le Dr. A. Cébron et visait à déterminer les communautés bactériennes directement impliquées dans la biodégradation du phénanthrène et à étudier l'effet des exsudats racinaires sur la diversité et l'activité de ces bactéries.

La technique SIP (Stable Isotope Probing; §3.4.2) a été utilisée pour appréhender les microorganismes directement impliqués dans la dégradation de phénanthrène. Cette technique consiste à marquer isotopiquement l'ADN des microorganismes possédant les voies métaboliques de dégradation d'un substrat marqué au ^{13}C -carbone (Neufeld *et al.*, 2007). Une expérience d'incubation avec du ^{13}C -phénanthrène (dont chaque carbone a été marqué au ^{13}C) a été réalisée avec la terre de Neuves-Maisons et sa microflore autochtone. Seuls les microorganismes possédant les enzymes spécifiques de dégradation du phénanthrène ont pu incorporer dans leur ADN du carbone ^{13}C . À la fin des périodes d'incubation (4, 8 et 12 jours), l'ADN de l'ensemble de la microflore du sol a été extrait. L'ADN des microorganismes dégradant le ^{13}C -phénanthrène a été enrichi en isotope lourd ^{13}C et cet ^{13}C -ADN (ADN lourd) a été séparé du ^{12}C -ADN (ADN léger) par ultracentrifugation. Par la suite, les techniques de biologie moléculaire ont permis l'identification des microorganismes dégradant le phénanthrène.

8.1. Description de l'expérience

8.1.1. Microcosme avec de la terre contaminée

L'expérience a été menée dans des microcosmes (250 mL) contenant la terre de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons (10 g) (§3.1.1.2.1) et du phénanthrène ^{13}C marqué sur tous les carbones (Sigma-Aldrich) ajouté à raison de $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Le phénanthrène (2 mg) a été dissout dans 300 μl d'hexane, ajoutés à 2 g de terre. Après volatilisation du solvant sous une hotte d'extraction, 8 g de terre ont été ajoutés et mélangés pour obtenir 10 g de terre par microcosme. Deux modalités ont été réalisées, avec et sans exsudats racinaires. Les exsudats racinaires (§3.2.5; chapitre 6 Lot 1) ont été ajoutés au début de l'expérience (100 mg par flacon). Dans chaque microcosme a été placé un tube à essai ouvert contenant de la soude (NaOH, 1M; 15 mL). Les microcosmes ont été fermés hermétiquement et incubés pendant 4, 8 et 12 jours à l'obscurité et à 24°C dans une chambre d'incubation, l'échantillonnage a été destructif. Parallèlement, des microcosmes contenant du ^{12}C -phénanthrène ont été réalisés avec et sans exsudats racinaires pour suivre la libération du CO_2 . Ces microcosmes ne contenaient pas de piège à CO_2 et ont été fermés hermétiquement et incubés pendant 4, 8 et 12 jours dans les mêmes conditions que les précédents. Les microcosmes enrichis en ^{12}C -PHE et ^{13}C -PHE ont été respectivement réalisés avec une et trois répétitions. Au moment de la mise en route de l'expérience, deux échantillons de terre ayant reçu du ^{13}C -PHE et du ^{13}C -PHE avec des exsudats ont été prélevés pour analyser la concentration initiale en PHE.

8.1.2. Analyses

Le carbone organique minéralisé en CO_2 présent dans l'atmosphère du flacon a été mesuré après 4, 8 et 12 jours pour tous les échantillons (§3.3.2). Les HAP dans la terre ont été extraits sous pression au dichlorométhane (§3.3.4.1.2) puis quantifiés par GC-MS, une partie des échantillons ont été silylés pour détecter des métabolites du ^{13}C -phénanthrène (§3.3.4.3.2). L'azote total (§3.3.1.3.1) et le carbone organique total (§3.3.1.3.2) ont été analysés. Les delta ^{13}C pour mille du sol, du CO_2 piégé par la solution de NaOH, de la matière organique extraite au dichlorométhane ont été mesurés (§3.4.2). L'ADN a été extrait du sol (§3.4.1) puis séparé par ultracentrifugation sur gradient de césium par Aurélie Cébron (3.4.2). Le gradient d'ADN a été fractionné en treize fractions. Le nombre de copies de gènes codant pour la petite sous-unité du ribosome (ARNr 16S) a été utilisé pour estimer la quantité totale de bactéries par gramme de sol (§3.4.3) dans chacune des treize fractions. Les gènes de dégradation codant pour une HAP-dioxygénase de bactéries à Gram négatif et à Gram positif (HAP-diox GN et GP) ont été quantifiés (§3.4.3) dans les fractions contenant de l'ADN "lourd" (^{13}C) et "léger" (^{12}C). Des gels d'électrophorèse TTGE ont été réalisés à partir des fractions d'ADN "lourd" et "léger" pour

évaluer la structure des communautés bactériennes et un séquençage des bandes majoritaires a été réalisé (§3.4.4 et 3.4.5).

8.2. Résultats

8.2.1. Devenir du ^{13}C -phénanthrène dans la terre contaminée

L'ajout d'exsudats racinaires dans les microcosmes n'a pas modifié les proportions de carbone organique (7,5 %) et d'azote (0,7 %) dans les microcosmes. Le rapport C/N n'a pas montré de différence significative entre les traitements avec et sans exsudats et pendant l'incubation des microcosmes (C/N = 17).

La minéralisation du carbone, suivie dans les microcosmes enrichis en ^{13}C -phénanthrène, a été supérieure en présence d'exsudats où près de $300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de carbone a été libéré en CO_2 . En absence d'exsudats, $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de carbone organique a été minéralisé en CO_2 (Figure 32).

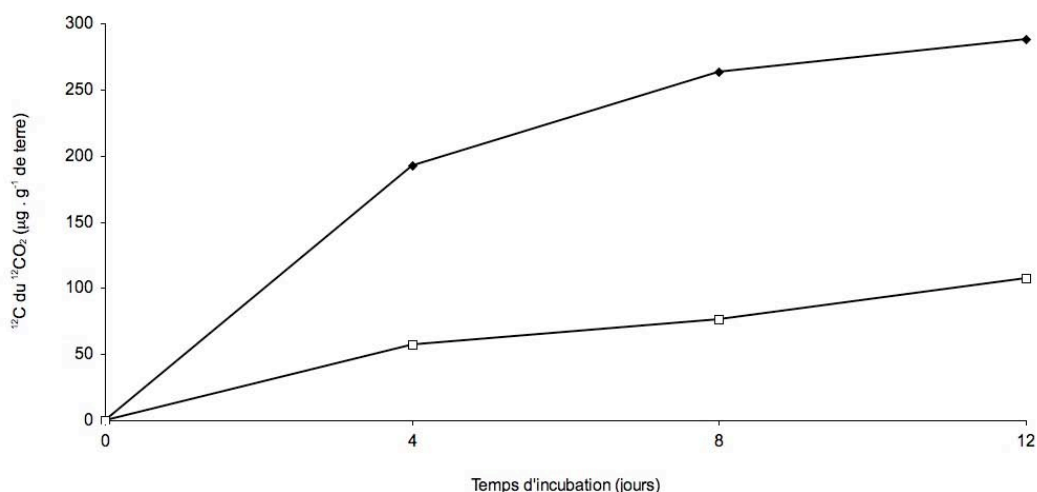


Figure 32 : Suivi de la minéralisation de la terre contaminée de Neuves-Maisons par mesure du $^{12}\text{CO}_2$ exprimée en μg de C libéré en CO_2 par gramme de terre après 4 à 12 jours d'incubation avec (■) et sans exsudats (□).

Lors de l'incubation, le ^{13}C dans les échantillons de terre comprenait le ^{13}C -phénanthrène restant dans la terre mais aussi ses éventuels produits de dégradation et le ^{13}C incorporé dans les bactéries. La mesure du delta- ^{13}C pour mille dans les échantillons de terre n'a pas montré de différence significative entre les traitements avec et sans exsudats racinaires. Cependant, le delta- ^{13}C pour mille du carbone de la terre de Neuves-Maisons a diminué significativement au cours de l'incubation (Figure 33), ce qui a été confirmé par l'analyse de la matière organique extraite au dichlorométhane (Figure 34). Cependant l'analyse du delta- ^{13}C pour mille du CO_2 , piégé sous forme de carbonate de baryum, a révélé de forts écart-types et aucune différence au cours du temps n'a pu être identifiée (donnée non présentée).

Le suivi de la concentration du ^{13}C -phénanthrène par GC-MS a montré après 4 jours d'incubation une dégradation supérieure du polluant en absence d'exsudats, mais aucune différence n'a été relevée entre les deux modalités après 8 et 12 jours d'incubation (Figure 35). Après 12 jours d'incubation, 58 % du phénanthrène ^{13}C -phénanthrène fraîchement ajouté a été dissipé. Les HAP historiques dont le ^{12}C -phénanthrène historique de la terre de Neuves-Maisons n'ont pas évolué au cours de l'incubation et aucune différence significative n'a été observée entre les traitements (Annexe 10).

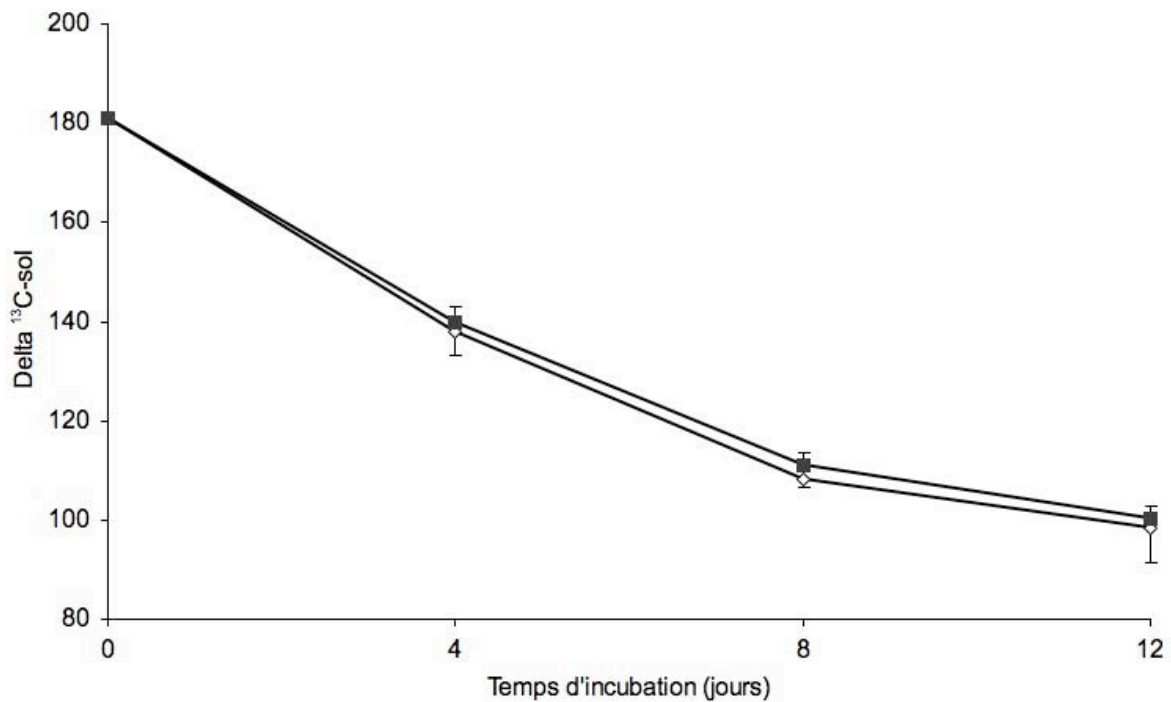


Figure 33 : Delta ^{13}C pour mille du carbone de la terre contaminée de Neuves-Maisons suite à l'ajout du ^{13}C -phénanthrène après 4 à 12 jours d'incubation avec (■) et sans exsudats (□).

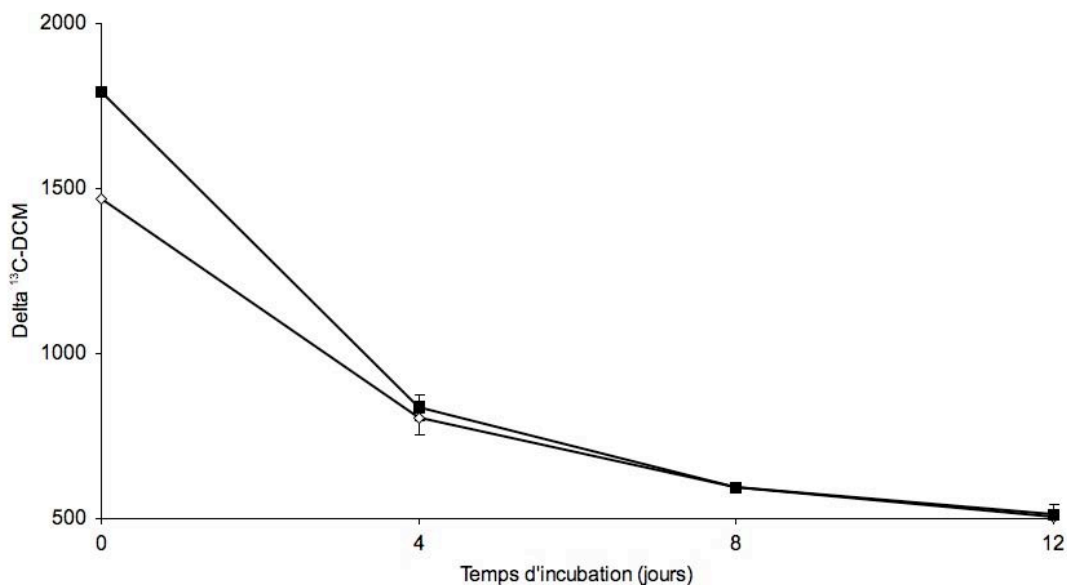


Figure 34 : Delta ¹³C pour mille dans la matière organique extraite de la terre de Neuves-Maisons par le dichlorométhane après 4 à 12 jours d'incubation avec (■) et sans exsudats (□).

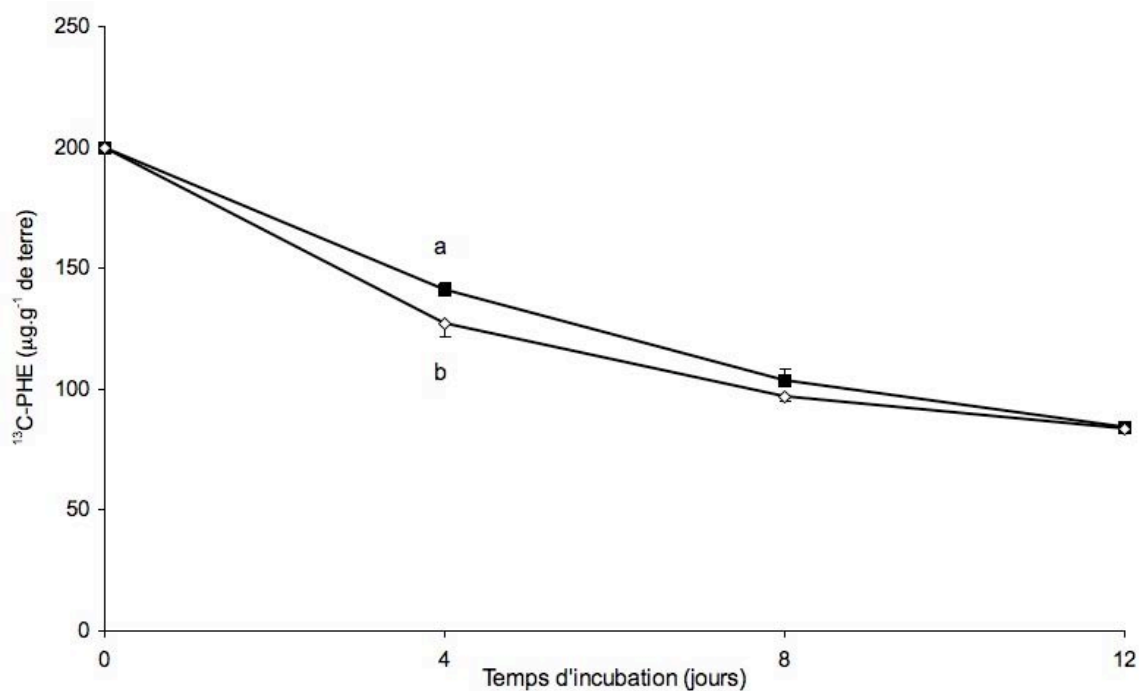


Figure 35 : Concentration en ¹³C-phénanthrène (µg.g⁻¹) mesuré en GC-MS dans la terre contaminée de Neuves-Maisons après 4 à 12 jours d'incubation avec (■) et sans exsudats (□). Deux lettres différentes indiquent une différence significative (P<0.05) entre les traitements.

8.2.2. Quantification des gènes ARNr 16S et de HAP-dioxygénase

L'ADN extrait à partir des microcosmes enrichis en ^{12}C -PHE et ^{13}C -PHE, avec et sans exsudats racinaires et après 4, 8 et 12 jours d'incubation, a été séparé par un gradient de densité de chlorure de césium. Le gène codant l'ARNr 16S a été quantifié par PCR en temps réel à partir des treize fractions du gradient. La comparaison des données obtenues avec le ^{12}C -PHE et le ^{13}C -PHE montre une incorporation du ^{13}C dans l'ADN des microcosmes enrichis dans les fractions 5 à 7 du gradient ($1,732$ à $1,727$ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figure 36).

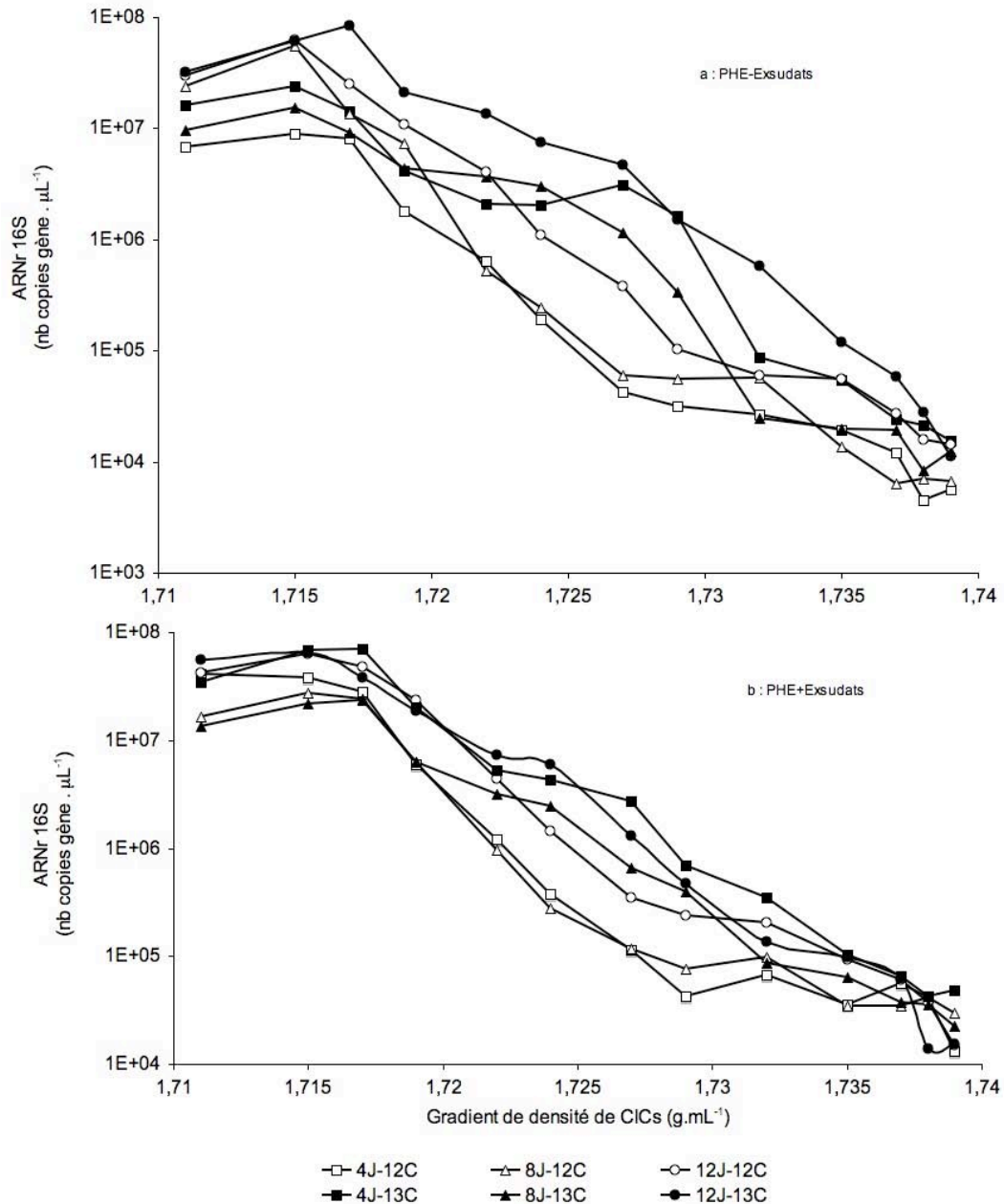


Figure 36 : Nombre de copies du gène codant la petite sous-unité de l'ARN ribosomal 16S par microlitre en fonction du gradient de densité de CICs avec ^{13}C -phénanthrène (\blacksquare) et ^{12}C -phénanthrène (\square), dans les microcosmes dans les modalités +PHE-Exsudats (a) et +PHE+Exsudats (b).

C'est après 4 jours d'incubation que la différence entre les microcosmes ^{13}C -PHE et ceux avec ^{12}C -PHE en termes de nombre de copies de gène ARNr 16S était la plus importante (Figure 36). Le nombre de copies du gène ARNr 16S dans les fractions 6 et 7 était alors 100 et 20 fois plus important en présence de ^{13}C -PHE et de ^{13}C -PHE+Exsudats par rapport aux microcosmes avec ^{12}C -PHE.

Les pourcentages du nombre de copies des gènes codant une HAP-dioxygénase appartenant aux bactéries à Gram négatif (GN) et à Gram positif (GP) par rapport au gène ARNr 16S ont été déterminés pour les fractions légères (fractions 9 et 10) et lourdes (fractions 6 et 7) de l'ADN des microcosmes enrichis en ^{12}C -PHE et ^{13}C -PHE en présence et en absence d'exsudats racinaires. L'ajout d'exsudats racinaires a augmenté significativement la proportion de bactéries possédant un gène codant une HAP-dioxygénase GN, chez les bactéries non impliquées dans la dégradation du marqueur isotopique (Figure 37a) et chez les bactéries spécifiquement impliquées dans la dégradation du ^{13}C -phénanthrène (Figure 37b). Ainsi l'ajout d'exsudats racinaires a augmenté de manière significative la proportion de bactéries possédant un gène HAP-dioxygénase GN. Cette proportion a été deux fois plus importante chez les bactéries directement impliquées dans la dégradation du phénanthrène que chez les bactéries non impliquées, respectivement 36 % et 15 % à 4 jours.

Les bactéries possédant le gène codant une HAP-dioxygénase GP ont représenté moins de 1 % de la population totale dans la fraction légère (Figure 38a). L'ajout de phénanthrène frais et d'exsudats racinaires n'a pas eu d'effet significatif sur les bactéries directement impliquées dans la dégradation du ^{13}C -phénanthrène et possédant un gène codant une HAP-dioxygénase GP (Figure 38b).

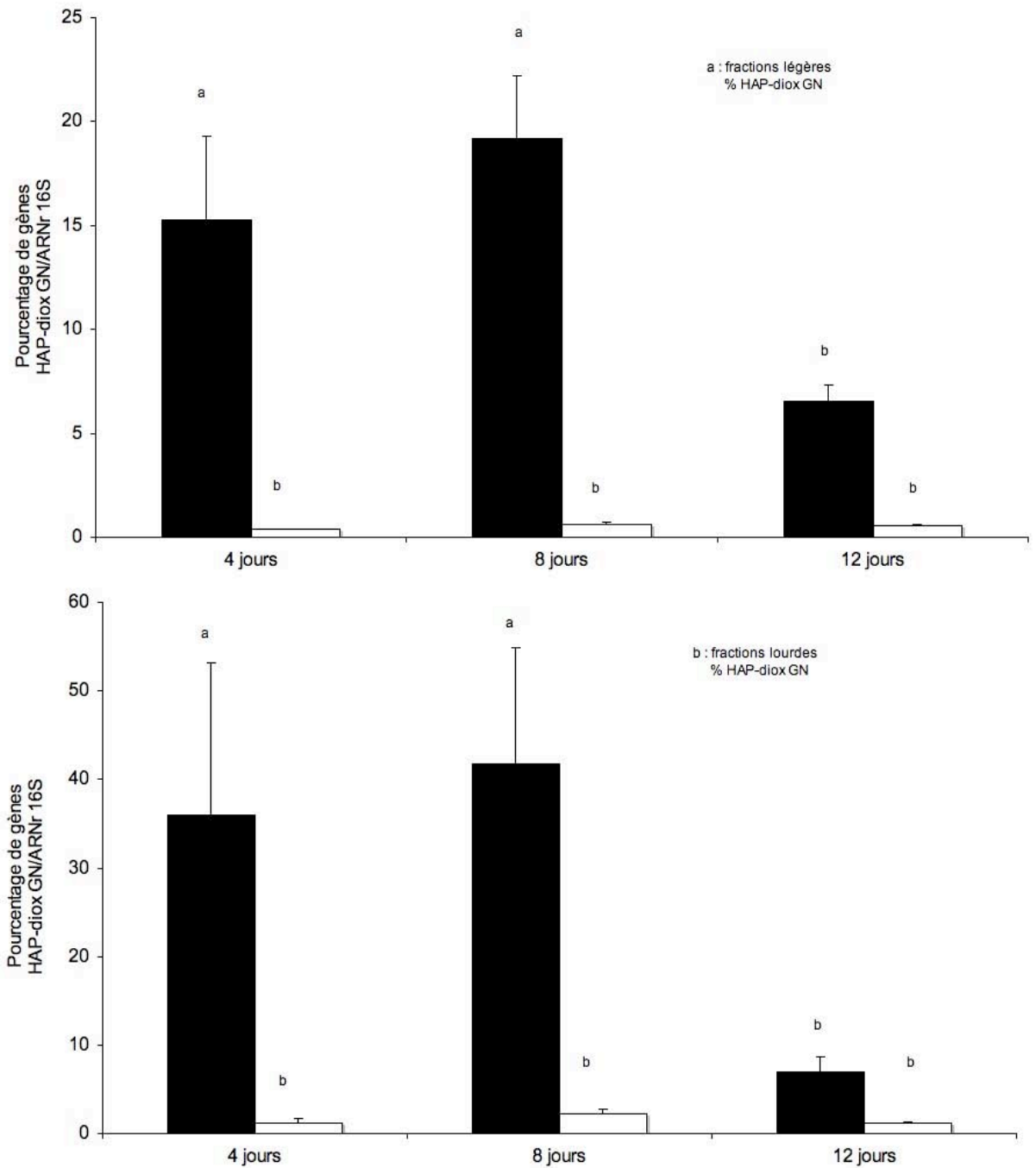


Figure 37 : Pourcentage du nombre de copies de gène codant une HAP-dioxygénase (GN) par rapport au gène ARNr16S dans les microcosmes avec phénanthrène et avec (+PHE+exsudats) et sans exsudats racinaires (+PHE-exsudats) en fonction du temps dans les microcosmes avec la terre de Neuves-Maisons enrichie en ^{13}C -phénanthrène. Le pourcentage HAP-diox GN/ARNr16S a été calculé dans les fractions légères (9-10) et les fraction lourdes (6-7) de l'ADN. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$) entre les traitements.

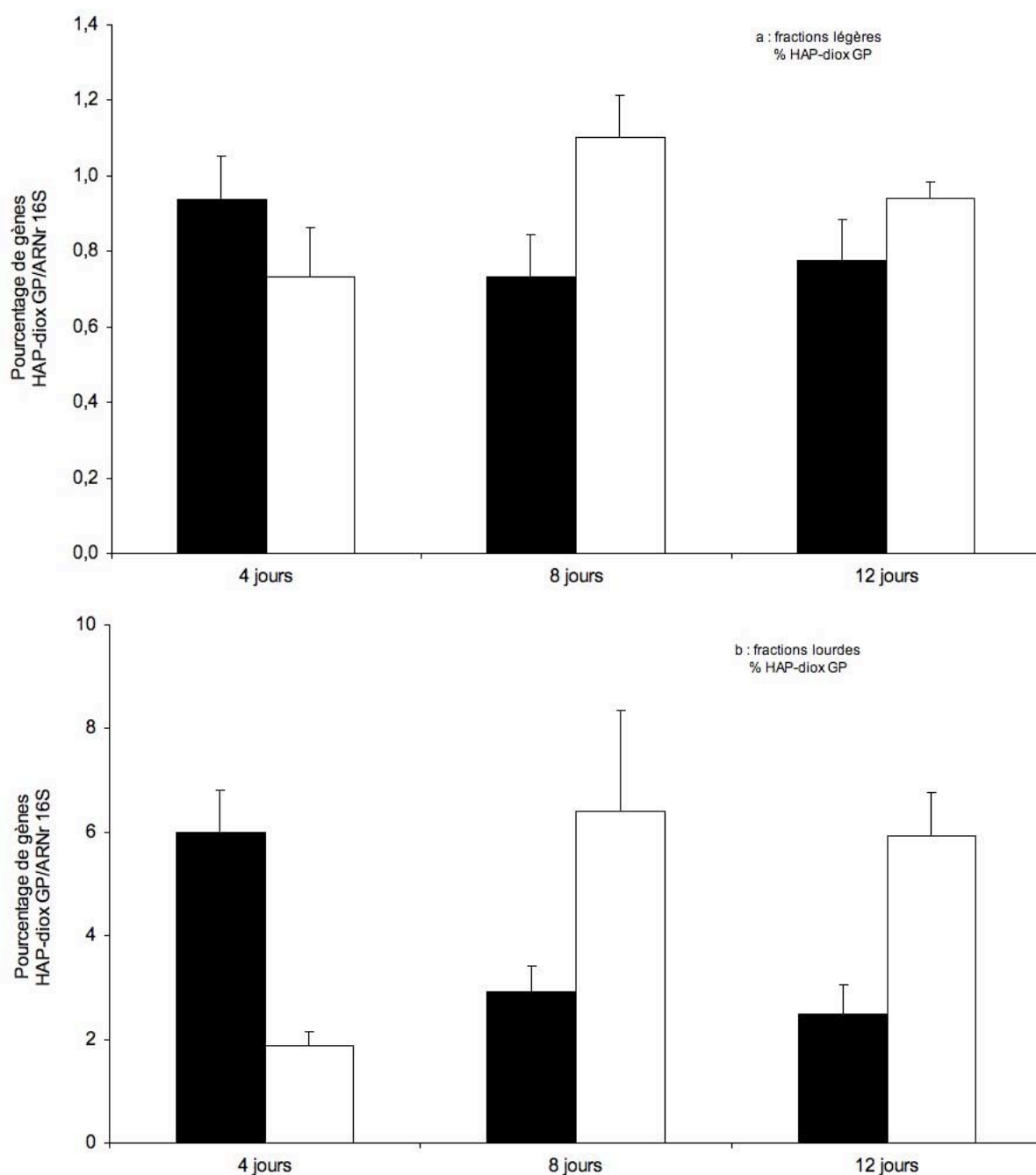


Figure 38 : Pourcentage du nombre de copies de gène codant une HAP-dioxygénase (GP) par rapport au gène ARNr16S dans les microcosmes avec phénanthrène et avec (■) (+PHE+exsudats) et sans exsudats racinaires (□) (+PHE-exsudats) en fonction du temps dans les microcosmes avec la terre de Neuves-Maisons enrichie en ^{13}C -phénanthrène. Le pourcentage HAP-diox GP/ARNr16S a été calculé dans les fractions légères (9-10) et les fraction lourdes (6-7) de l'ADN.

8.2.3. Structure des communautés impliquées dans la dégradation du ¹³C-phénanthrène

La structure des communautés bactériennes a été étudiée par A. Cébron par électrophorèse TTGE. Les profils TTGE ont montré de grandes différences entre les fractions d'ADN légères ou lourdes. Les fractions légères d'ADN ont été considérées comme représentatives de la population globale du sol, laquelle a pu être activée par l'ajout d'exsudats racinaires. Les fractions lourdes d'ADN, enrichies par le ¹³C-ADN, contenaient l'ADN des populations ayant assimilé le carbone dérivé du ¹³C-phénanthrène. Les trois répétitions d'une même condition d'expérience, avec et sans exsudats racinaires, ont montré des empreintes moléculaires relativement similaires durant les trois temps d'incubation (Figure 39). Cependant entre les fractions lourdes et légères, des bandes spécifiques sont apparues et certaines intensités relatives de bandes ont changé au cours de l'incubation.

L'ajout d'exsudats racinaires a modifié les profils TTGE des fractions lourdes et légères (Figure 39). Sans exsudats racinaires, deux bandes principales dans les fractions légères de l'ADN ont été identifiées, correspondant aux espèces *Steroidobacter*, une γ -Proteobactérie (bande A) et *Pseudonocardia*, une Actinobactérie (bande B). En présence d'exsudats racinaires, trois autres bandes ont dominé les fractions légères et ont été affiliées à *Achromobacter xylosoxidans* (bande C), *Thiobacillus denitrificans* (bande E) et une γ -Proteobactérie, *Pseudomonas* spp. (bande F). Parallèlement, 5 et 6 autres bandes ont été identifiées dans les fractions lourdes des microcosmes ¹³C-PHE et ¹³C-PHE+Exsudats, respectivement.

Lorsque le phénanthrène a été la seule source de carbone fraîchement ajoutée, les bactéries responsables de la dégradation du ¹³C-PHE, présentes dans les fractions lourdes de l'ADN, correspondent aux espèces *Pseudoxanthomonas* sp. (bande 2), à *Steroidobacter* sp. (bande 5 similaire à la bande B présente dans la fraction légère de l'ADN), à *Pusillimonas* sp. appartenant aux β -Proteobactérie (bande 3) et à *Microbacterium schleiferi* affiliée aux Actinobactéries (bande 4) (Figure 40). Il est à noter l'apparition après 12 jours d'incubation d'une espèce bactérienne correspondant à *Pseudomonas stutzeri* affiliée aux γ -Proteobactéries (bande 1).

Dans les microcosmes avec ajout d'exsudats ¹³C-PHE+Exsudats, deux bandes ont été spécifiquement retrouvées dans les fractions lourdes de l'ADN et ont été identifiées comme appartenant à *Pseudomonas stutzeri* (bande 6 similaire à la bande 1) et à *Arthrobacter* sp. (bande 9) (Figure 39). Trois autres bandes ont été retrouvées dans les fractions lourdes et légères de l'ADN. Ces bandes ont été identifiées comme appartenant à *Bacillus* sp. une Firmicutes (bande 7), à *Pseudoxanthomonas* (bande 8) et à *Paenibacillus* sp. (bande 10) (Figure 40).

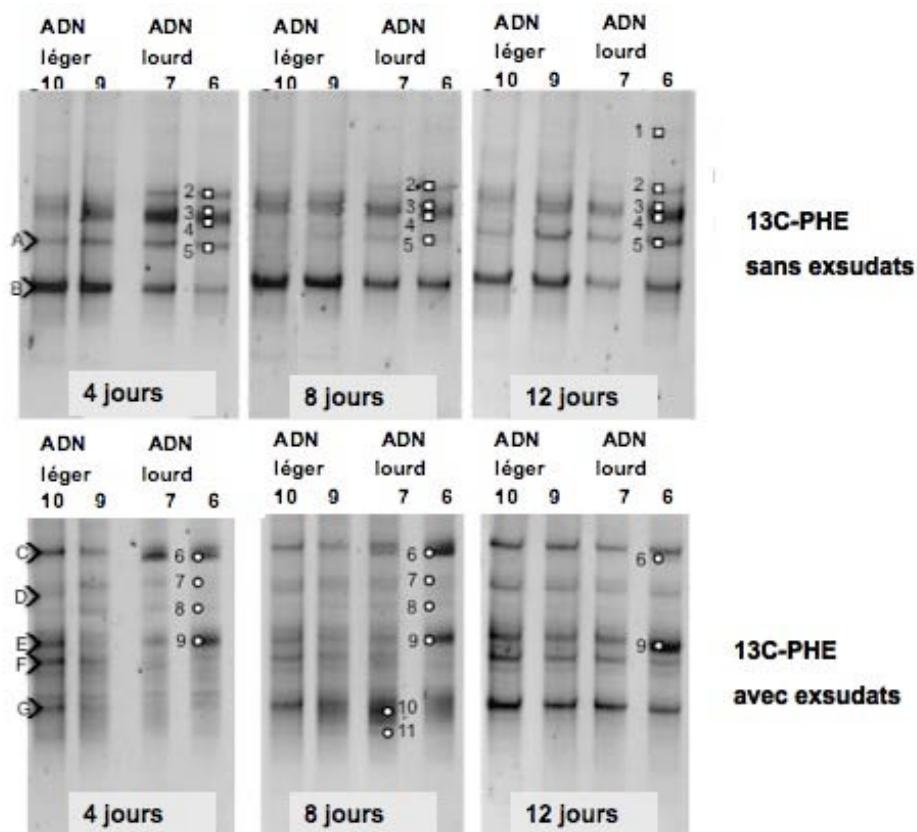


Figure 39 : Analyse par gel électrophorèse TTGE de la structure des communautés bactériennes dans les microcosmes enrichis en ^{13}C -phénanthrène avec et sans exsudats racinaires après 4, 8 et 12 jours d'incubation. Les fractions 10-9 et 7-6 correspondent à l'ADN léger et lourd. Les bandes numérotés de 1 à 12 correspondent aux séquences des bactéries ayant incorporé le ^{13}C et les bandes nommées de A à G correspondent aux bactéries majoritaires du sol dans les microcosmes +PHE-Exsudats et +PHE+Exsudats.

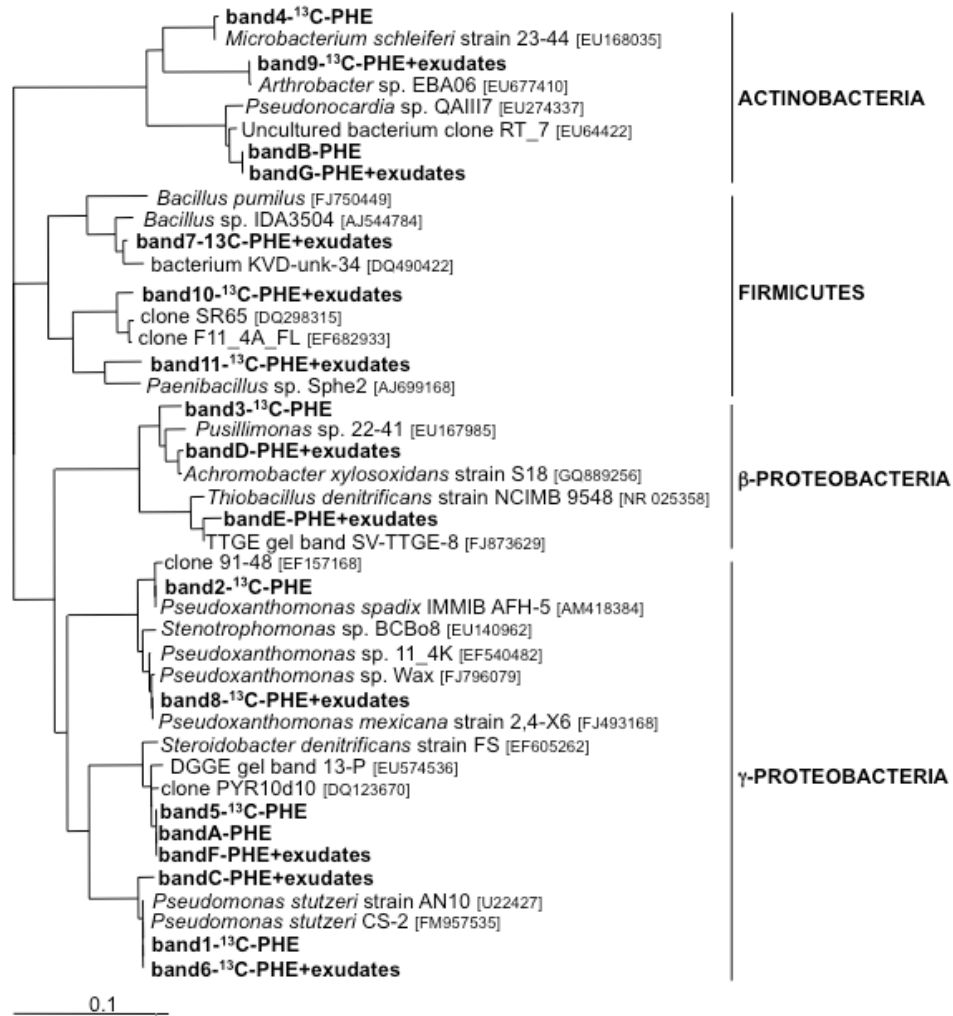


Figure 40 : Arbre phylogénétique basé sur les alignements des séquences de l'ADNr 16S pour les bactéries présentes dans les échantillons de terre de Neuves-Maisons avec du ¹³C-PHE et avec ¹³C-PHE+exsudats. L'analyse par neighbor joining montre la position des séquences correspondant aux bandes de TTGE analysées vis-à-vis de différentes espèces de bactéries référencées dans GENEBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'arbre a été ancré avec la séquence d'ADNr 16S de l'espèce *Pseudomonas putida* (NC009512). L'échelle représente 10% de variation de séquence et les valeurs de bootstrap de l'analyse (n=100) sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures à 70%. Les numéros d'accèsion des bactéries de références sont donnés entre parenthèse.

8.3. Discussion

Cette étude a permis d'identifier les communautés bactériennes impliquées dans la dégradation du phénanthrène et de déterminer l'effet d'un ajout d'exsudats racinaires sur celles-ci dans un sol historiquement contaminé en HAP. La comparaison des fractions légères de l'ADN avec et sans exsudats a permis d'identifier spécifiquement les bactéries activées par les exsudats racinaires.

Les exsudats racinaires ont été rapidement métabolisés par la microflore du sol. La technique SIP permet d'identifier les consommateurs primaires du ^{13}C -PHE et la succession de populations au cours du temps (Mahmood *et al.*, 2005; Haichar *et al.*, 2008). Dans cette expérience, peu de variations ont été observées lors des trois prélèvements successifs dans la structure des communautés estimée par gel électrophorèse TTGE. Le marquage de l'ADN par le ^{13}C a été le plus important après 4 jours d'incubation, ce qui est cohérent avec des travaux précédents portant sur le ^{13}C -PHE (Singleton *et al.*, 2005). Par ailleurs, la proportion de bactéries possédant des gènes codant une HAP-dioxygénase et la diversité des bactéries responsables de la dégradation du ^{13}C -phénanthrène a été dépendante de l'ajout d'exsudats racinaires.

8.3.1. Identification des bactéries stimulées par la présence d'exsudats racinaires

Dans cette étude, l'utilisation d'exsudats racinaires a permis d'obtenir une information sur les utilisateurs primaires de cette source de carbone et d'énergie. La microflore du sol a rapidement consommé le substrat carboné facilement accessible et minéralisable que constituent les exsudats racinaires. Les diverses sources de carbone fournies par les exsudats racinaires ont modifié significativement la structure de la communauté bactérienne ce qui a été antérieurement montré (Steer et Harris 2000, Kowalchuk *et al.*, 2002, Haichar *et al.*, 2008).

La comparaison de la structure des communautés bactériennes dans les fractions légères de l'ADN avec et sans exsudats racinaires a permis de distinguer trois espèces bactériennes spécifiquement activées par cette source de carbone. Ces espèces *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter sp.* et *Thiobacillus denitrificans* décrites comme ubiquistes, ont été trouvées fréquemment dans la rhizosphère des plantes. Cet environnement riche en carbone est généralement dominé par les bactéries à Gram négatif (Rhee *et al.*, 2004; Vinas *et al.*, 2005). *Thiobacillus denitrificans* est impliquée dans les activités de dénitrification et est donc liée au cycle biochimique de l'azote (Knowles, 1982; Roberston et Kuenen, 2006). Les espèces *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter xylosoxidans* (*Achromobacter xylosoxidans*) ont par ailleurs été retrouvées dans les expériences précédentes dans la modalité plantée des dispositifs à compartiments avec du sable (chapitre 4) et en présence de

phénanthrène et d'exsudats racinaires dans les microsomes avec du sable (chapitre 6). Les séquences nucléotidiques de *Achromobacter xylosoxidans* ont été identiques dans les trois expériences. De même, la bactérie *Paenibacillus sp.* a été identifiée dans les microcosmes avec du sable en présence d'exsudats racinaires (+PHE+exsudats).

8.3.2. Influence des exsudats sur le taux de dégradation du phénanthrène

La dégradation du ^{13}C -phénanthrène a été plus faible en présence d'exsudats racinaires après 4 jours d'incubation, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus précédemment dans les microcosmes avec du sable (chapitre 6). Toutefois, celle-ci n'a pas présenté de différence significative lors des prélèvements suivants entre les traitements avec et sans exsudats. Le suivi de la minéralisation de la matière organique en CO_2 a montré que les exsudats ont été minéralisés rapidement. Après 12 jours d'incubation, 58 % du ^{13}C -phénanthrène a été dégradé. En revanche, la concentration des HAP historiques n'a pas été affectée par les conditions d'incubation, ce qui est cohérent avec les résultats précédemment obtenus (chapitre 7).

Les taux de dégradation du phénanthrène n'ont pas présenté de différence significative après 8 et 12 jours bien que les populations de bactériennes dégradantes aient été différentes avec et sans exsudats. Des résultats similaires ont été antérieurement montrés par Vinas *et al.* (2005) dans une expérience en microcosmes avec du sol avec et sans nutriments pendant 200 jours d'incubations. Le taux de minéralisation du phénanthrène peut-être conditionné par le taux de dissolution des cristaux de phénanthrène (Juhasz *et Naidu*, 2000) et non par le potentiel de minéralisation des bactéries dégradant les HAP (Harms *et Bosma*, 1997; Wick *et al.*, 2002). La cinétique de dégradation du ^{13}C -phénanthrène fraîchement ajouté a présenté, dans les deux traitements, une première phase de dégradation rapide puis une seconde phase plus lente. Ce comportement peut-être lié au phénomène de vieillissement des HAP dans le sol (Hatzinger *et Alexander*, 1995) lequel implique une diminution de la biodisponibilité du HAP (Alexander, 2000). En effet, la terre de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons contient une forte quantité de matière organique anthropique telle que le "black carbon" (Barnier, 2009). Ce dernier a pu facilement séquestrer les HAP (Luthy *et al.*, 1997; Accardi-Dey *et Gschwend*, 2002; Ran *et al.*, 2007).

Une accumulation de métabolites de HAP toxiques (Sikkema *et al.*, 1995; Maliszewka-Kordybach *et al.*, 2007), pourrait aussi expliquer la diminution au cours du temps du taux de minéralisation du phénanthrène, mais l'analyse en GC-MS des extraits au dichlorométhane sylvilé n'a pas permis d'identifier de métabolites. L'analyse des extraits au dichlorométhane en GC-MS-IRMS pourrait permettre d'abaisser les limites de quantification et aussi discriminer les métabolites du ^{13}C -phénanthrène.

8.3.3. Bactéries impliquées dans la dégradation du phénanthrène avec et sans exsudats

Lorsque le phénanthrène a été la seule source de carbone fraîchement ajoutée, les principales espèces activées ont été *Pseudoxanthomonas spadix*, *Steroidobacter sp.*, et *Microbacterium spp.* et dans une plus faible proportion *Pusillimonas spp.* L'espèce *Pseudoxanthomonas spp.* a été trouvée dans un sol contaminé par des produits pétroliers et était capable de dégrader des molécules aromatiques (BTEX) (Young *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008). *Microbacterium sp.* a été plusieurs fois citée pour sa capacité à dégrader les HAP (Kastner *et al.*, 1994; Bodour *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; La Rosa *et al.*, 2006). Par ailleurs, cette espèce non cultivée a été préalablement identifiée dans l'expérience en dispositif à compartiments avec du sable (chapitre 4). *Pseudoxanthomonas spp.* et *Microbacterium sp.* présentent une forte hydrophobicité de surface (Sheng, 2009) et sont capables de produire des biosurfactants comme les rhamnolipides (Chang *et al.*, 2005; Nayak *et al.* 2009), ce qui pourrait favoriser leur biodégradation des HAP. Une espèce non identifiée nommée PYR10d10 a été trouvée dans une expérience de SIP avec du pyrène (Singleton *et al.*, 2006). Cette espèce PYR10d10 a déjà été identifiée dans une expérience *in situ* sur la terre de Neuves-Maisons (Cébron *et al.*, 2009), mais n'a pas été retrouvée ici.

Il a été précédemment montré que les exsudats racinaires influencent l'activité et la densité des bactéries dégradant les HAP (Miya *et Fireston*, 2001; Joner *et Leyval*, 2003; Siciliano *et al.*, 2003; Kamath *et al.*, 2004). Dans cette expérience, nous montrons que lorsque les exsudats racinaires ont été ajoutés à la terre de Neuves-Maisons enrichie en phénanthrène, la population bactérienne capable de dégrader ¹³C-phénanthrène a été différente. Les espèces activées ont été affiliées à *Arthrobacter spp.* et *Pseudomonas stutzeri* et dans une moindre mesure *Pseudoxanthomonas mexicana*, *Bacillus* et *Paenibacillus spp.* L'espèce *Arthrobacter* a été citée pour sa capacité à dégrader de nombreux composés organiques notamment le phénanthrène (Daane *et al.*, 2001; Johnsen *et al.*, 2007). De plus cette espèce a déjà été retrouvée dans la rhizosphère de plantes (Chaudhry *et al.*, 2005; Cébron *et al.*, 2009). *Pseudomonas stutzeri* est une espèce ubiquiste (Lalucat *et al.*, 2006) qui est capable de dégrader de nombreux composés aromatiques dont le naphthalène (Aitken *et al.*, 1998; Daane *et al.*, 2001) et le phénanthrène (Stringfellow *et Aitken*, 1995). Par ailleurs sa croissance à partir d'exsudats racinaires a été observée (Ortega-Calvo *et al.*, 2003; Lalucat *et al.*, 2006) et elle a été impliquée dans la dégradation anaérobie du naphthalène liée à la réduction du nitrate (Rockne *et al.*, 2000). Ainsi les espèces bactériennes comme *Arthrobacter* et *Pseudomonas* sont capables de croître à partir de diverses sources de carbones. Ces deux espèces ont déjà été retrouvées au cours d'expérience de dégradation du pyrène en présence d'exsudats racinaires (Kozdrój *et Van Elsas*, 2000) et dans le cas d'une expérience sur la dégradation du phénanthrène dans un sol lors d'expérience de SIP (Johnsen *et al.*, 2002). Des espèces de *Bacillus* ont été antérieurement citées

pour leur capacité à dégrader des HAP dont le phénanthrène (Aitken *et al.*, 1998; La Rosa *et al.*, 2006) et certaines espèces ont été identifiées comme produisant des surfactants (Yakimov *et al.*, 1995). De même, une espèce de *Paenibacillus* isolée de la rhizosphère de *Spartina alterniflora* a été montrée pour utiliser le phénanthrène comme seule sources de carbone (Daane *et al.*, 2002). Plusieurs des espèces retrouvées dans la modalité +PHE+exsudats dans cette expérience en microcosmes avec du sol ont été aussi identifiées de l'expérience en microcosmes avec du sable en présence de phénanthrène et d'exsudats.

Dans cette expérience, comme dans l'expérience en microcosme avec du sable (chapitre 6), l'ajout d'exsudats racinaires a ralenti la biodégradation du phénanthrène. La quantité d'exsudats ajoutés a été la même (100 mg pour 10 g de sable/sol) et la quantité de carbone minéralisée a été du même ordre de grandeur dans les deux expériences avec des exsudats racinaires. Toutefois, dans cette expérience avec du sol, ce ralentissement entre les traitements avec et sans exsudats a été observé seulement après 4 jours d'incubation mais plus à 8 et 12 jours. La matière organique du sol et/ou des exsudats racinaires a ralenti de moitié la dégradation du phénanthrène par rapport au cas où le polluant a été la seule source de carbone de la sable (chapitre 6). La matière organique du sol et/ou des exsudats racinaires ont pu participer à la séquestration du phénanthrène et aussi en limiter la biodégradation.

8.4. Conclusion

Le taux de dégradation du phénanthrène a été le plus important avant 4 jours d'incubation, pour être plus faible de 4 à 8 jours. La séquestration du phénanthrène à la matrice sol a donc semblé un rôle important dans la biodisponibilité du polluant. Malgré une différence dans la dégradation du phénanthrène après 4 jours d'incubation en microcosmes avec et sans exsudats racinaires, près de 58 % du ^{13}C -phenanthrène a été dégradé après 12 jours dans les deux traitements. Dans cette expérience, l'ajout d'exsudats racinaires a profondément modifié la structure de la population bactérienne. Cependant deux communautés bactériennes différentes ont permis un taux de dégradation du phénanthrène identique en fin d'expérience en présence et en absence d'exsudats, alors que la proportion de bactéries dégradantes était dix fois plus importante en présence d'exsudats racinaires. La dégradation du phénanthrène en absence d'exsudats racinaires a semblé lié a un nombre restreint de bactéries car la proportion de bactéries possédant un gène codant une HAP-dioxygénase était faible. La technique SIP a permis d'observer spécifiquement les espèces capables de dégrader le phénanthrène, mais elle a aussi souligné la complexité des interactions dans la rhizosphère.

9. Discussion générale et perspectives de recherche

La pollution des sols par les HAP reste une problématique contemporaine dans laquelle les traitements biologiques reposent principalement sur la dégradation bactérienne des polluants. La présence de plante dans le système bactéries-sol-HAP peut conduire à accroître (Binet *et al.*, 2000; Chiapusio *et al.*, 2007; Günther *et al.*, 1996; Joner & Leyval, 2003; Parrish *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006) ou à réduire la biodégradation des HAP ce qui traduit la complexité des mécanismes rhizosphériques. Ce travail expérimental en laboratoire visait à préciser les interactions entre les plantes et les bactéries capables de dégrader les HAP. Un paramètre important limitant la biodégradation des HAP *in situ* est leur faible disponibilité, c'est pourquoi le rôle des exsudats racinaires sur la biodisponibilité des HAP a été investigué. Dans cette étude, la complexité du système plante-bactéries-sol-HAP a été restreinte au niveau de la plante. Des dispositifs à compartiments et des microcosmes ont été réalisés pour contrôler l'apport des exsudats racinaires par la plante. Dans un premier temps, l'utilisation de sable et d'un inoculum bactérien issu d'une ancienne friche industrielle a permis de réduire l'apport de matière organique et de ne considérer que l'apport des exsudats racinaires comme source de carbone. Par la suite, un sol historiquement contaminé en HAP a été utilisé avec sa microflore endogène. Des travaux antérieurs (Norini, 2008) ayant montré que les HAP de ce sol étaient peu ou pas biodégradables, du phénanthrène a été artificiellement ajouté pour pallier à cette faible disponibilité des HAP et stimuler les bactéries dégradantes.

9.1. Effets des exsudats racinaires sur les espèces bactériennes dégradant le phénanthrène

Le sable a été utilisé comme substrat pour simplifier les interactions sol/phénanthrène et pour limiter l'apport de matière organique aux exsudats et au phénanthrène. Dans un premier temps, l'étude des espèces impliquées dans la dégradation des HAP a été réalisée de manière indirecte. L'ajout de phénanthrène comme unique source de carbone a sélectionné, à partir de l'inoculum bactérien issu de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons, les bactéries capables de dégrader le polluant. Les espèces bactériennes identifiées dans ces conditions sélectives ont été considérées comme dégradantes. Ainsi les expériences avec du sable en dispositifs à compartiments et en microcosmes, ont permis d'identifier *Herbaspirillum* sp. comme capable de dégrader le phénanthrène. Cette espèce a semblé être à l'origine des quantités importantes de gènes codant des HAP-dioxygénases dans l'expérience en microcosmes avec le sable, puisque la présence des gènes codant une HAP-dioxygénase a été vérifiée sur une souche de *Herbaspirillum* sp. *chnp* 3-5 gracieusement fournie par D.J. Vacca. Cependant, l'espèce *Herbaspirillum* sp. n'a pas été retrouvée, ou n'était pas dominante, dans l'expérience avec le ¹³C-phénanthrène.

L'espèce *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans*) a été retrouvée dans les expériences de la modalité plantée des dispositifs à compartiments avec du sable (chapitre 4), dans les microsomes avec du sable en présence de phénanthrène sans exsudats racinaires (chapitre 6) et dans l'expérience avec la terre de Neuves-maisons en absence d'exsudats racinaires (chapitre 8). Bien qu'*Achromobacter xylosoxidans* ait été identifiée comme capable de dégrader le phénanthrène (Daane *et al.*, 2001; La Rosa *et al.*, 2006; Vinas *et al.*, 2005), cette espèce n'a été retrouvée dans la fraction lourde du gradient de chlorure de césium (chapitre 8) et donc n'a pas été directement impliquée dans la dégradation du phénanthrène dans la terre de Neuves-Maisons. Ainsi la présence de *Achromobacter xylosoxidans* dans ces différents milieux de culture montre bien le caractère ubiquiste et opportuniste de cette espèce (Duggan *et al.*, 1996; Jha et Kumar, 2009). Dans l'expérience en microcosmes avec du sable, l'ajout d'exsudats racinaires et de phénanthrène ont modifié la communauté bactérienne présente dans le sable et les espèces *Herbaspirillum* sp. et *Achromobacter xylosoxidans* n'ont pas été retrouvées en présence d'exsudats.

Des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* ont semblé aussi bien utiliser les exsudats seuls, que le phénanthrène et le mélange des deux. Des bactéries de ce genre ont été retrouvées dans les expériences en dispositifs à compartiments et les microsomes avec du sable (chapitre 4 et 6) et dans l'expérience avec la terre de Neuves-maisons en absence d'exsudats racinaires (chapitre 8). Dans l'expérience avec le ^{13}C -phénanthrène, *Pseudomonas stutzeri* était impliquée dans la dégradation du phénanthrène. De nombreuses études ont isolé des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* dans des sols contaminés (Juhasz & Naidu, 2000; Leglize *et al.*, 2008) et ont constaté que cette espèce possédait des gènes codant des HAP-dioxygénases (Denome *et al.*, 1993; Rhee *et al.*, 2004).

L'expérience avec le ^{13}C -phénanthrène a permis de mettre en évidence les espèces ayant directement dégradé le polluant et incorporé l'isotope ^{13}C dans leur ADN. Lorsque le ^{13}C -phénanthrène a été la seule source de carbone fraîchement ajoutée dans la terre de Neuves-Maisons, les espèces activées et présentes dans la fraction lourde ont été *Pseudoxanthomonas spadix*, *Steroidobacter* sp., *Microbacterium* spp. et *Pusillimonas* spp. La majorité de ces genres ou espèces ont été précédemment citées pour leur capacité à dégrader des HAP ou des composés aromatiques, (*Pseudoxanthomonas* spp. : Young *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008 ; *Microbacterium* sp. : Kastner *et al.*, 1994; Bodour *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; La Rosa *et al.*, 2006). Lorsque le ^{13}C -phénanthrène a été ajouté avec les exsudats racinaires, ce sont différents genres et espèces qui étaient dominants et ont incorporé dans leur ADN le ^{13}C du phénanthrène : *Arthrobacter* spp., *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudoxanthomonas mexicana*, *Bacillus* et *Paenibacillus* spp. Ces espèces bactériennes ont été antérieurement montrées pour être capable de dégrader des composés aromatiques tels que les HAP (Aitken *et al.*, 1998; Kozdrój & Van Elsas, 2000; Daane *et al.*, 2001; Chaudhry *et al.*, 2005; La Rosa *et al.*, 2006; Johnsen *et al.*, 2007). L'originalité de ce travail mené à partir de la terre de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons a été de

constater que l'ajout d'exsudats racinaires a modifié les communautés bactériennes dégradantes sans influencer le taux final de dégradation du ¹³C-phenanthrène.

9.2. Effets des exsudats racinaires sur les bactéries possédant les gènes codant une HAP-dioxygénase

L'inoculum bactérien utilisé pour ces travaux était issu de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons. Dans la terre historiquement contaminée en HAP, la proportion de bactéries possédant des gènes codant pour des HAP-dioxygénases dans la population totale (HAP-diox / ARNr 16S) a été estimée à environ 1 % (Cébron *et al.*, 2008). Les conditions sélectives, liées à l'utilisation du phénanthrène comme seule source de carbone dans le sable, ont conduit la proportion de bactéries dégradantes à augmenter à plus de 50 % après 2 jours d'incubation en microcosmes. Cette proportion de bactérie dégradante est revenue à moins de 1 % après 5 jours lorsque le phénanthrène a été consommé. Lorsque les exsudats ont été présents comme seule source de carbone, l'augmentation rapide du nombre de copies des gènes codant l'ARNr 16S et codant des HAP-dioxygénases a indiqué que les bactéries de l'inoculum ont utilisé les exsudats pour leur croissance, y compris celles possédant des gènes codant des HAP dioxygénases (HAP-diox GN et GP). Ce résultat soutient l'hypothèse que le rôle des plantes dans la biodégradation des HAP est lié à la stimulation des communautés bactériennes dégradantes (Anderson *et al.*, 1993; Siciliano et Germida, 1998). De même, bien que la majeure partie du phénanthrène ait été probablement dégradée dans les premiers jours d'incubation, les résultats en dispositifs à compartiments avec du sable ont montré que la proximité du tapis racinaire a maintenu davantage de bactéries dégradantes (R/S > 1). De plus, les plantes les plus âgées (séries 7/3 sem et 13/3 sem) ont favorisé le maintien d'une proportion de bactéries dégradantes dans la population totale plus importante. La présence de plantes a été précédemment montrée pour stimuler les bactéries capables de dégrader les HAP (Joner & Leyval, 2003; Parrish *et al.*, 2005; Corgié *et al.*, 2006 a; Chiapusio *et al.*, 2007). De même, le rapport R/S a augmenté lorsque les plantes étaient âgées de 13 semaines avec un temps d'incubation de trois semaines dans les dispositifs à compartiments avec du sable.

Ainsi l'ensemble de ces travaux montre que la présence du ray-grass a favorisé les bactéries possédant des gènes codant une HAP-dioxygénase, et que cette proportion de bactéries dégradantes augmentait lorsque l'âge de la plante augmentait. Les exsudats racinaires du ray-grass peuvent contenir des composés aromatiques (Hodge *et al.*, 1998) et les plantes les plus âgées produisent plus de composés phénoliques que les plantes plus jeunes (Fletcher & Hegde, 1995). Les composés phénoliques, comme le salicylate, peuvent stimuler l'induction de HAP-dioxygénases (Kamath *et al.*, 2004; Ogunseitan *et al.*, 1991). Cependant, aucun acide organique

aromatique (dont l'acide salicylique) n'a été détecté par l'analyse HPLC dans les exsudats racinaires de ray-grass produit en hydroponie.

La présence de plante a favorisé l'établissement de bactéries à Gram négatif dans le sol (Holdind, 1960; Rovira, 1969) et les bactéries dégradantes à Gram négatif (gène HAP-diox GN) ont été dominantes dans les expériences. L'origine de l'inoculum bactérien semble aussi expliquer la prédominance des bactéries à Gram négatif puisque les sols historiquement contaminés en HAP sont dominés par des bactéries à Gram négatif (Rhee et al., 2004; Vinas et al., 2005). D'autre part, un enrichissement en phénanthrène a été montré pour stimuler l'établissement de bactéries à Gram négatif (Mueller et al., 1997). La quantité de gènes codant pour des enzymes de dégradation des HAP dans des sols contaminés est plus importante en présence de plantes (Cébron *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2009). Cependant, les résultats obtenus, notamment dans l'expérience en microcosmes avec les exsudats racinaires, ont montré qu'il n'y avait pas de relation directe entre la quantité de bactéries possédant des gènes codant des HAP-dioxygénase et le taux de dégradation du phénanthrène.

9.3. Devenir des HAP dans les terres de friches industrielles

9.3.1. Effets des exsudats racinaires sur la dissipation des HAP

Dans les deux expériences où le phénanthrène a été la seule source de carbone pour l'inoculum bactérien, la dissipation du polluant a été totale (chapitre 4 et 6). Dans l'expérience en dispositifs à compartiments avec le sable, la présence de la plante a ralenti la dissipation du phénanthrène dans les sections plantées 3-6 mm et 6-9 mm par rapport aux dispositifs non plantés (chapitre 4). De même, dans l'expérience en microcosmes avec le sable, la présence d'exsudats racinaires a ralenti de moitié la dissipation du phénanthrène par rapport au traitement sans exsudats (chapitre 6). Dans l'expérience en microcosmes avec la terre de Neuves-Maisons, l'ajout d'exsudats racinaires a commencé par ralentir la dissipation du ¹³C-phénanthrène à 4 jours pour finalement présenter le même taux de dissipation après 12 jours d'incubation (chapitre 8). Ainsi la présence d'exsudats racinaires a diminué la dissipation du phénanthrène ajouté dans le sable ou le sol. Certains auteurs ont montré que l'apport de nutriments inorganiques ou organiques n'avait pas d'influence ou diminuait la minéralisation du phénanthrène par les bactéries (Carmichael et Pfaender, 1997; Johnson et Scow, 1999; Joner *et al.*, 2002). De même, des composés simples contenus dans les exsudats racinaires, comme le glucose, réduisaient la dégradation des HAP par des bactéries dégradantes (Rentz *et al.*, 2004). Ces composés peuvent être utilisés par les bactéries comme source de carbone et d'énergie mais leurs présences répriment l'activité des enzymes impliquées dans la dégradation des HAP (Kamath *et al.*, 2004; Rentz *et al.*, 2004). De plus, les exsudats

racinaires ont pu être préférentiellement utilisés par des bactéries pourtant capables de dégrader le phénanthrène comme *Bacillus sp.*, à *Pseudoxanthomonas* et à *Paenibacillus sp.*, lesquelles ont été retrouvées dans les fractions lourdes et légères de l'expérience SIP (chapitre 8).

9.3.2. Effets des exsudats racinaires sur la biodisponibilité des HAP

L'ajout d'exsudats racinaires n'a pas augmenté la dissipation des HAP totaux dans les sols, pourtant l'extraction non-exhaustive de la fraction labile des HAP a permis de mettre en évidence que la présence de plantes augmentait significativement la quantité de HAP extraits à la cyclodextrine entre T_0 et 3 semaines pour les composés à 2 et 3 cycles et la somme des HAP (chapitre 5). Ce phénomène a aussi été mis en évidence dans les sols historiquement contaminés (chapitre 7). Les exsudats racinaires comportent un mélange complexe de composés, dont les acides organiques, qui peuvent participer à la déstructuration des agrégats par chélation des ions minéraux impliqués dans les associations organo-minérales (Yang *et al.*, 2001). Les complexes organo-minéraux peuvent renfermer des HAP (Bonin & Simpson, 2007; Chefetz *et al.*, 2000; Gunasekara & Xing, 2003; Wang & Xing, 2005) et la déstructuration de ces complexes peut permettre de rendre accessible à la phase aqueuse des HAP pour finalement en augmenter la biodisponibilité (Hwang et Cutright, 2004; Fava *et al.*, 2004). D'autre part, les plantes dont le ray-grass peuvent libérer des acides gras comme l'acide linoléique (Elgersma *et al.*, 2003; Schlichting et Leinweber, 2009). Cet acide gras peut stimuler la dégradation du pyrène notamment en augmentant sa disponibilité pour les bactéries (Yi et Crowley, 2007).

Il n'a pas été possible de savoir si les exsudats racinaires libèrent les HAP en fonction de leurs encombrements moléculaires dans la mesure où la cyclodextrine discrimine elle-même les HAP en fonction de leur encombrement spatial. Les 2 et 3 cycles aromatiques forment des complexes cyclodextrine:HAP de type 1:1 et les HAP de 4 cycles forment des complexes 2:1 (Cescutti *et al.*, 1996; Wang & Brusseau, 1995). Ainsi le pourcentage de HAP extraits à la cyclodextrine par rapport aux HAP totaux était sensiblement plus élevé pour les HAP de 2 cycles (moyenne des 3 terres 5 %) que ceux à 3 cycles (1 %) ou 4 cycles (0,6%). Dans les expériences où la dissipation des HAP a été importante (chapitre 5), le pourcentage de HAP (ou du phénanthrène ajouté) extractibles à la cyclodextrine au début de l'expérience (Brut T_0) atteignait 40 %. À l'inverse, lorsque la dissipation des HAP a été faible, avec les trois terres historiquement contaminées (chapitre 7), le pourcentage de HAP extractibles à la cyclodextrine au début de l'expérience (Brut T_0) représentait autour de 1 % des HAP totaux (somme de 16 HAP). Ainsi nous observons une relation entre la fraction de HAP extractible à la cyclodextrine et la fraction biotransformée par les bactéries, comme certains auteurs l'ont montré antérieurement pour des sols artificiellement contaminés en HAP (Allan *et al.*, 2006; Doick *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2000). Stokes *et al.* (2005) ont montré que les HAP d'origine historique dans les sols sont fortement adsorbés dans la matrice du sol et sont moins extraits par la cyclodextrine que les HAP fraîchement ajoutés.

9.3.3. Effet de l'ajout de phénanthrène frais sur la dissipation des HAP natifs

L'ajout de phénanthrène à la terre de Neuves-Maisons n'a pas eu d'effet sur la dissipation des HAP historiques présents. Pourtant la dégradation par co-métabolisme bactérien a été parfois décrite chez les bactéries pour les HAP de quatre cycles et plus suite à l'ajout de co-substrat comme le phénanthrène (Boldrin *et al.*, 1993; Juhasz *et al.*, 1997; Aitken *et al.*, 1998). En plus de favoriser le co-métabolisme bactérien, l'ajout de phénanthrène dans une matrice contenant initialement des HAP peut conduire à une compétition des composés organiques pour les sites d'adsorption de la matrice et ainsi augmenter la désorption globale des HAP natifs (Cornelissen & Gustafsson, 2006; Cornelissen & Gustafsson, 2004; Doick *et al.*, 2006). Mais la terre de Neuves-Maisons présente une forte proportion de "black carbon" (Barnier, 2009), lequel adsorbe les HAP de façon non-compétitive (Luthy *et al.*, 1997; Accardi-Dey & Gschwend, 2002; Ran *et al.*, 2007).

9.4. Limites de l'étude

9.4.1. Les dispositifs à compartiments et la durée des expériences

Par rapport aux expériences de Corgié (2003), les conditions de culture des plantes utilisées ici ont conduit à une biomasse plus élevée. Ce détail a eu pour conséquence que les compartiments latéraux des dispositifs plantés ont été sensiblement plus secs et le taux d'humidité inférieur à 30 % de la capacité de rétention en eau en fin d'expérience alors que les compartiments latéraux des dispositifs non plantés étaient saturés en eaux. Le taux d'humidité peut avoir une influence sur la dégradation des HAP dans les sols (Bengtsson et Zerhouni, 2003). Une mesure compensatoire pourrait être de ne pas mettre de réservoir de solution nutritive pour les modalités non plantées pour qu'elle reste à 80% de la capacité de rétention en eau. La prise en compte du gradient racinaire a pu être perturbée dans la mesure où dans ce système partiellement clos, le taux d'humidité a diminué lorsque la distance à la racine augmentait. Ce point peut être une des limites de ce dispositif à compartiment où il est nécessaire de trouver un juste milieu entre la diffusion des exsudats à partir du tapis de racines et le prélèvement par évapotranspiration de l'eau des compartiments latéraux. Diminuer le temps d'expérience pourrait permettre d'éviter la dessiccation des compartiments latéraux adossés au tapis racinaire.

Les durées des premières expériences, en dispositifs à compartiments, ont été établies à partir de travaux effectués avec du sable par Corgié (2003) où la concentration de phénanthrène a diminué de $500 \mu\text{g.g}^{-1}$ à $80 \mu\text{g.g}^{-1}$ en cinq semaines. En fonction de ces résultats, nous avons défini pour notre étude des temps de prélèvement de 3 et 6 semaines. Or, nos premiers résultats ont montré que la majorité du phénanthrène a été dissipé dans le sable et dans le sol avant 3 semaines d'incubation et les expériences suivantes en microcosmes ont montré que la dissipation du phénanthrène se déroulait dans les 4-5 premiers jours. Or, dans les dispositifs à compartiments, il est nécessaire de laisser suffisamment de temps de contact entre les compartiments latéraux et le tapis racinaire pour permettre aux exsudats racinaires de diffuser à travers le substrat.

9.4.2. L'ajout d'exsudats racinaires

Les exsudats racinaires sont constitués d'un mélange complexe de composés, et peuvent varier quantitativement et qualitativement en fonction d'un grand nombre de paramètres : espèce végétale, âge de la plante, conditions (intensité lumineuse, ...) et durée de culture, milieu de culture ou type de sol, présence de microorganisme (Alberda, 1956; Meharg et Killham, 1990 et 1995; Neumann et Romheld, 2000). Ainsi, les expériences réalisées dans ce travail avec un apport unique d'exsudats obtenus dans des conditions particulières ne peuvent certainement pas refléter l'effet général des exsudats.

Dans les expériences réalisées dans ce travail avec les exsudats racinaires de ray-gras, la culture en hydroponie a été réalisée en absence de HAP. Ceci a permis d'éviter la diminution de la biomasse foliaire et racinaire observée chez les plantes et induite par l'ajout de polluant dans le sol (Binet *et al.*, 2000; Muratova *et al.*, 2009), mais ne reflète pas l'exsudation de la plante en présence de polluant. Cependant, Mingji *et al.* (2009) ont montré que les proportions d'acides organiques libérés dans les exsudats racinaires (oxalique, lactique, malique et acétique) n'étaient pas modifiées par l'augmentation de la quantité de phénanthrène en solution (1 à 8 mg/L). De même, la qualité des exsudats racinaires (acides organiques et sucres) par unité de surface n'était pas modifiée chez le sorgho (*Sorghum bicolor*, L.) après l'ajout de 10 et 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de phénanthrène dans le sol (Muratova *et al.*, 2009).

La libération des exsudats au niveau de la racine suit un cycle circadien dans le temps (Kuzyakov et Cheng, 2001; Kuzyakov *et al.*, 2001, Kuzyakov *et al.*, 2003) et un seul ajout d'exsudats ne peut pas refléter la cinétique de libération dans le sol. Bien que surestimé par rapport à la quantité d'exsudats racinaires libérée quotidiennement par une plante (Hodge *et al.*, 1998; Domanski *et al.*, 2001; Kuzyakov *et al.*, 2001; Nguyen, 2003), le pulse d'exsudats a permis de mettre en évidence l'impact des plantes sur les bactéries dégradant les HAP et sur la désorption des HAP. Néanmoins, les concentrations de carbone organique ajoutées sont proches de celles utilisées dans d'autres travaux. Ainsi les concentrations en jeu dans la seconde expérience du chapitre 7 (18 mg de carbone organique totale dans 5 g de sol, avec des concentrations en citrate de 0,23 mM, lactate 0,5 mM, acétate 0,1 mM et succinate ,1 mM) étaient de l'ordre de celles utilisées dans les expériences de Yang *et al.*, (2001), ou Ouvrard *et al.*, (2006).

9.4.3. Quantification et analyses

9.4.3.1. Quantification des HAP

La méthode de quantification des HAP par HPLC et détection en UV a été délicate pour les échantillons environnementaux. En effet, les terres historiquement contaminées de Neuves-Maisons, Homécourt et Elf présentent une multitude de composés aromatiques, lesquels ont des temps de rétention à travers la colonne HPLC C18 relativement proches. Une attention importante a donc été nécessaire au moment de l'intégration des différents pics dans la mesure ou des HAP co-élués. Ainsi, pour les échantillons environnementaux, l'utilisation d'une GC-MS semble plus appropriée pour quantifier les HAP.

9.4.3.2. Quantification des bactéries dégradantes

Le calcul de la proportion de bactéries dégradantes à partir du rapport du nombre de copies des gènes HAP-dioxygénase et ARNr16S suppose que chaque bactérie dispose d'une copie unique de ces gènes, or le

chromosome bactérien peut contenir plusieurs copies d'un même gène (Klappenbach *et al.*, 2001). Les amorces 968-F et 1401-R sont considérées comme capables de se fixer sur les gènes codant la petite sous-unité du ribosome (ARNr 16S) de l'ensemble des bactéries (Felske *et al.*, 1998). Les amorces HAP-diox GN et GP sont capables de se fixer sur les gènes codant des HAP-dioxygénases de nombreuses espèces bactériennes, mais ne sont pas exhaustives, par exemple *Paenibacillus* sp. une firmicute ne peut pas être quantifiée en PCR en temps réel (Cébron *et al.*, 2008).

9.5. Perspectives

9.5.1. Les ARN messagers et enzymes HAP-dioxygénases

Le suivi des gènes de la HAP-dioxygénase permet d'appréhender le potentiel génétique de la communauté bactérienne pour dégrader les HAP. Cependant, l'ensemble de l'ADN n'est pas synthétisé et bien que la bactérie possède des gènes codant une HAP-dioxygénase, l'enzyme peut ne pas être synthétisée (Kamath *et al.*, 2004; Rentz *et al.*, 2004). Nos expériences ont montré que la quantité de gènes HAP-diox GN n'était pas toujours en relation avec le taux de dégradation du phénanthrène. Ainsi à la place de suivre la quantité de gènes, il serait intéressant de suivre les ARN messagers permettant la synthèse des HAP-dioxygénases ou directement les enzymes HAP-dioxygénases. Cependant, l'extraction du sol et la conservation des ARN messagers restent relativement difficile (Mendum *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2007), et les essais avec la terre de Neuves-Maisons n'ont pas permis d'extraire des quantités suffisantes pour étudier l'expression des gènes (A.Cébron, communication personnelle). De plus, les protéines HAP-dioxygénases restent difficiles à séparer et la plupart des études portent sur des souches bactériennes pures (Krivobok *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007).

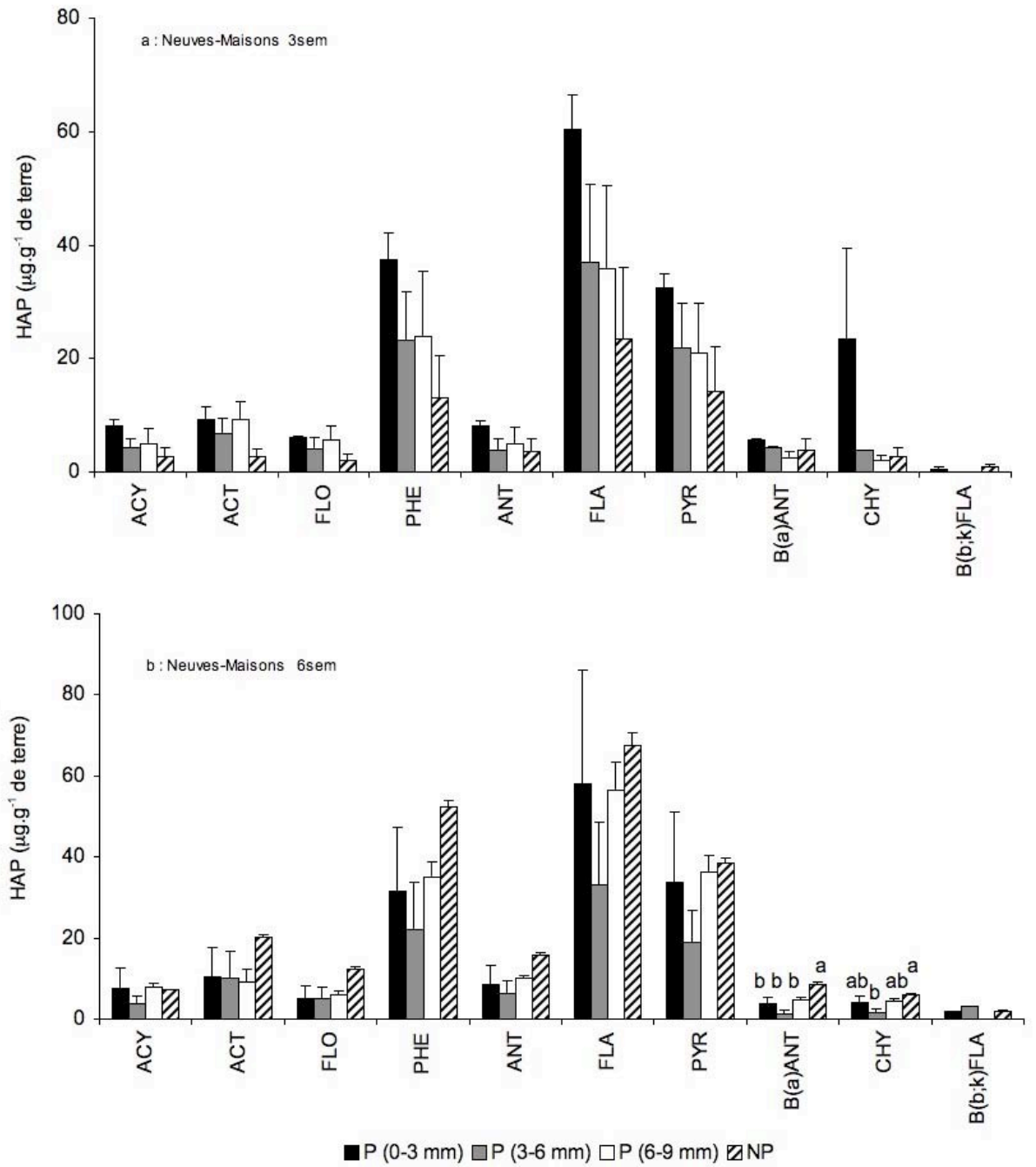
9.5.2. Utilisation de ¹⁴C-phénanthrène

L'utilisation de ¹⁴C-phénanthrène pourrait permettre de réaliser des bilans de carbone exhaustifs et de mieux identifier les métabolites de dégradation (Johnsen *et al.*, 2002; Kamath *et al.*, 2005; Vacca *et al.*, 2005). En effet, cet isotope émet un rayonnement bêta, lequel peut être enregistré par un compteur à scintillation. À l'inverse les ¹²C-HAP et ¹³C-HAP n'émettent pas de rayonnement bêta et rien ne distingue ces deux isotopes hormis des masses atomiques légèrement différentes. Pour des échantillons environnementaux présentant de nombreux HAP, l'identification des ¹³C-métabolites en GC-MS est difficile. Ainsi, l'utilisation de ¹⁴C-phénanthrène émettant un rayonnement bêta pourrait permettre d'identifier précisément les métabolites du phénanthrène.

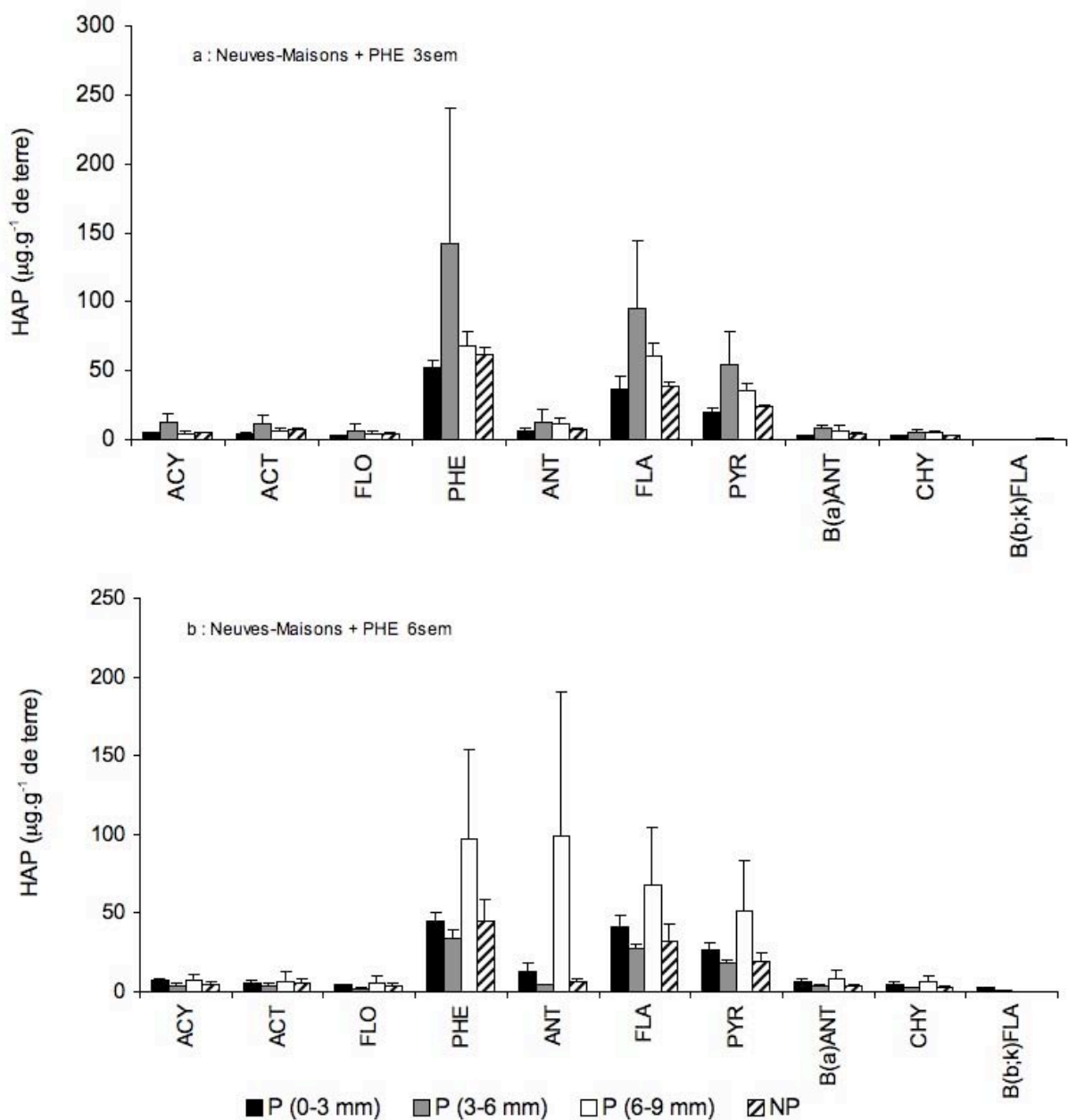
10. Conclusion générale

Les résultats obtenus montrent que le ray-grass et en particulier ses exsudats ont un effet complexe sur la dissipation des HAP dans les sols et sur les communautés bactériennes dégradantes. Les exsudats racinaires ont modifié en profondeur la structure des communautés dégradant les HAP, et augmenté le pourcentage de bactéries possédant des gènes codant une HAP-dioxygénase. La proportion des bactéries dégradantes a ainsi été estimée à plus de 10 % de la population totale en présence d'exsudats racinaires alors qu'elle était de 1 % dans la terre d'origine et dans les traitements sans exsudats. L'expérience SIP a montré que les bactéries directement impliquées dans la dégradation du ^{13}C -phénanthrène étaient différentes en présence ou non d'exsudats. Plusieurs espèces ayant directement dégradé le ^{13}C -phénanthrène ont été capables d'utiliser les exsudats racinaires. Cependant, la dissipation du phénanthrène ajouté dans le sable ou le sol a été plus faible en présence d'exsudats racinaires et les concentrations totales des HAP historiques n'ont pas été modifiées au cours du temps. Néanmoins, les exsudats racinaires ont augmenté la quantité de HAP extractibles à la cyclodextrine dans les sols historiquement contaminés. Cette fraction labile a représenté autour de 1 % de la quantité des HAP totaux extraits sous pression par des solvants organiques. Or il est admis que la fraction de HAP extractibles à la cyclodextrine peut être dégradée par les bactéries, lesquelles bactéries ont été capables de dégrader en quelques jours la totalité du phénanthrène lorsque celui-ci a été disponible dans le sable. Ainsi la dissipation des HAP en présence de plantes dépend de l'activité des communautés microbiennes dégradantes, mais aussi de l'accessibilité des HAP pour ces microorganismes. Une meilleure connaissance des facteurs influençant la biodisponibilité des HAP dans les sols et les systèmes sol-plantes reste un enjeu majeur pour améliorer et contrôler la bioremédiation des HAP.

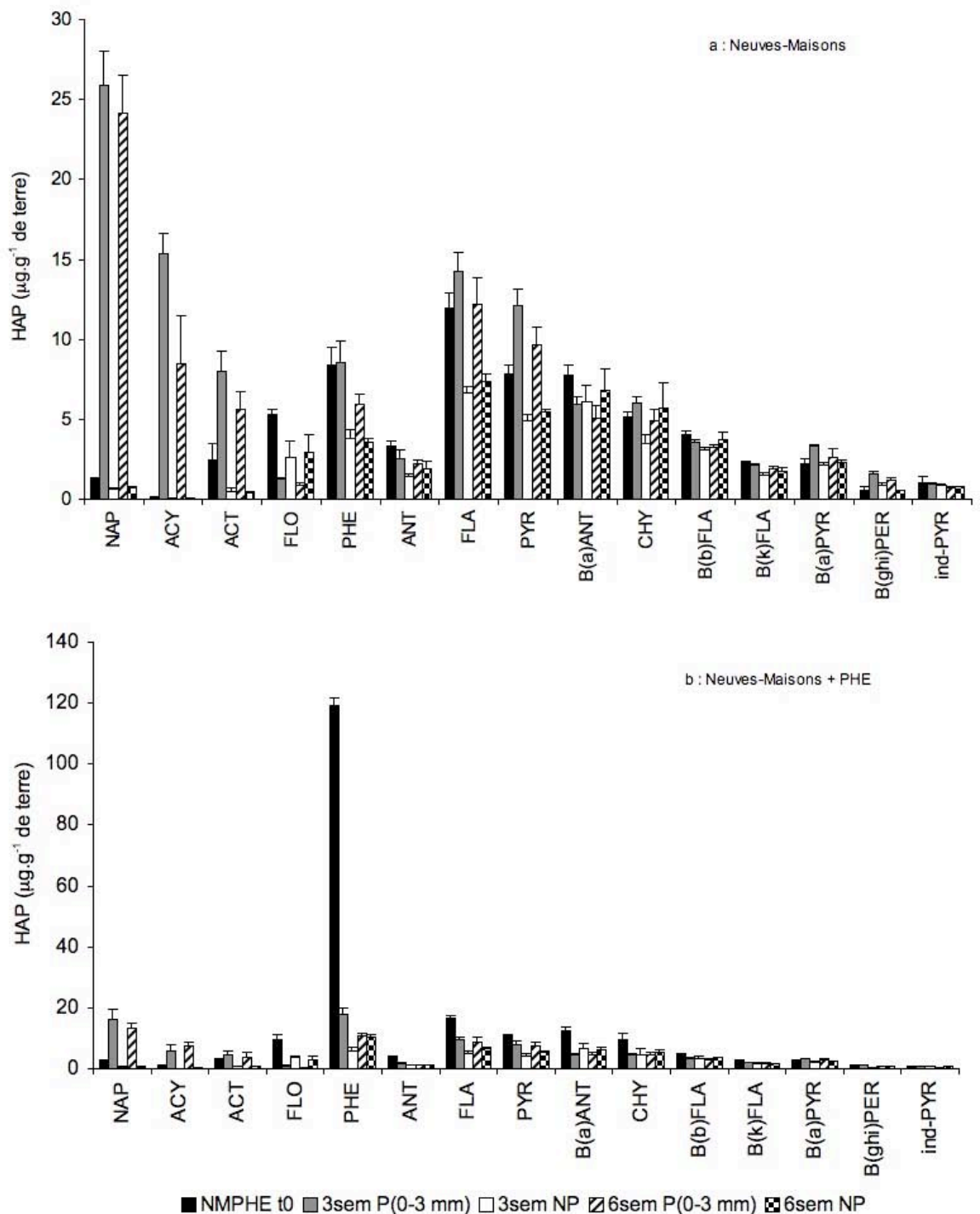
11. Annexes



Annexe 1 : Concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles sous pression à l'hexane (ASE) dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons après 3 semaines (a) et 6 semaines (b) d'incubation dans les sections rhizosphériques (0-3, 3-6 et 6-9 mm) et non plantées (NP).



Annexe 2 : Concentrations en HAP ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) extractibles sous pression à l'hexane (ASE) dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons avec ajout de phénanthrène ($500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) après 3 semaines (a) et 6 semaines (b) d'incubation dans les sections rhizosphériques (0-3, 3-6 et 6-9 mm) et non plantées (NP).

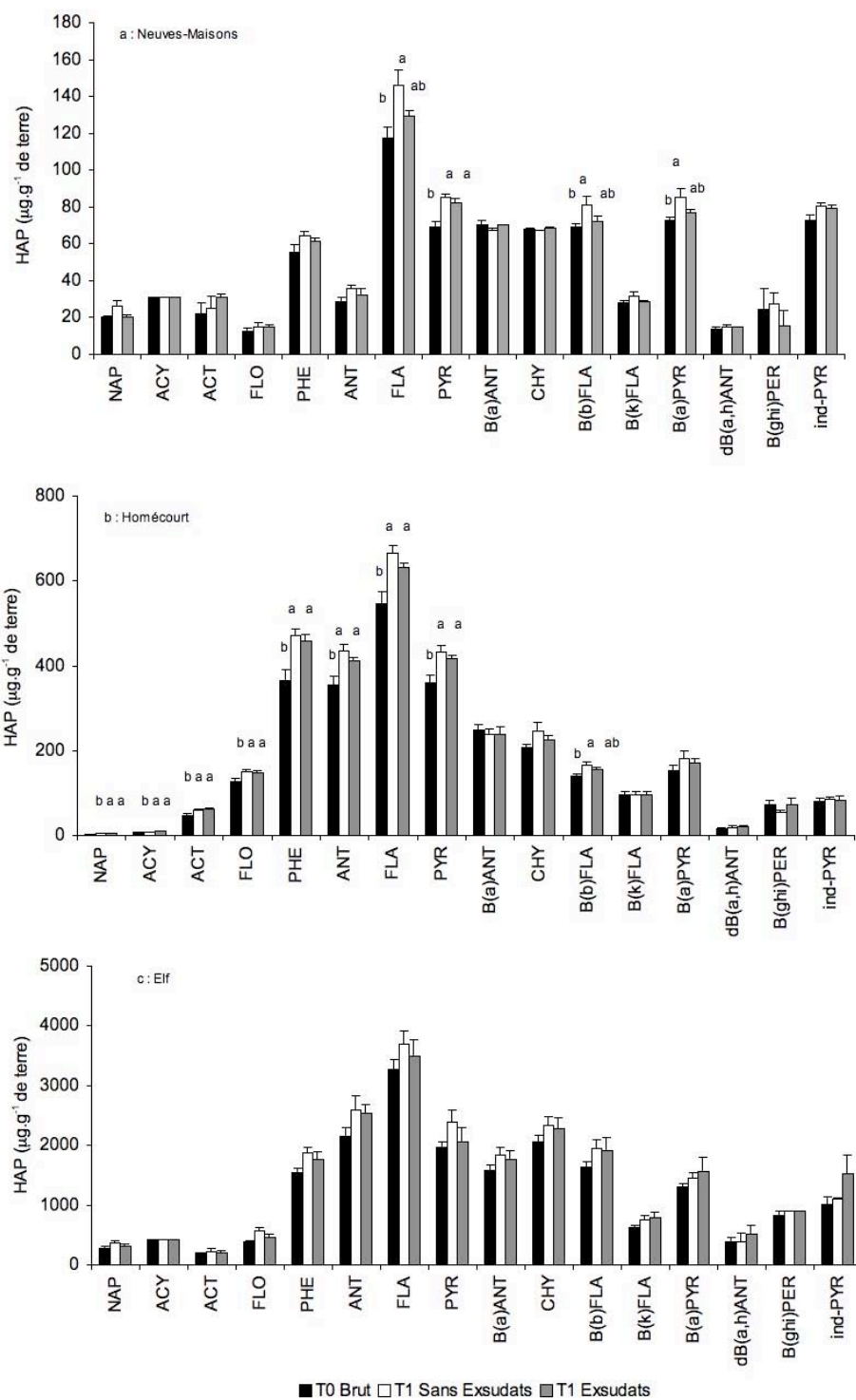


Annexe 3: Concentrations en HAP ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) extractibles à la cyclodextrine dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons sans (a) et avec (b) ajout de phénanthrène ($500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) après 3 et 6 semaines d'incubation dans les sections rhizosphériques (0-3 mm) et non plantées (NP). En lien avec l'annexe 4 plantées (NP).

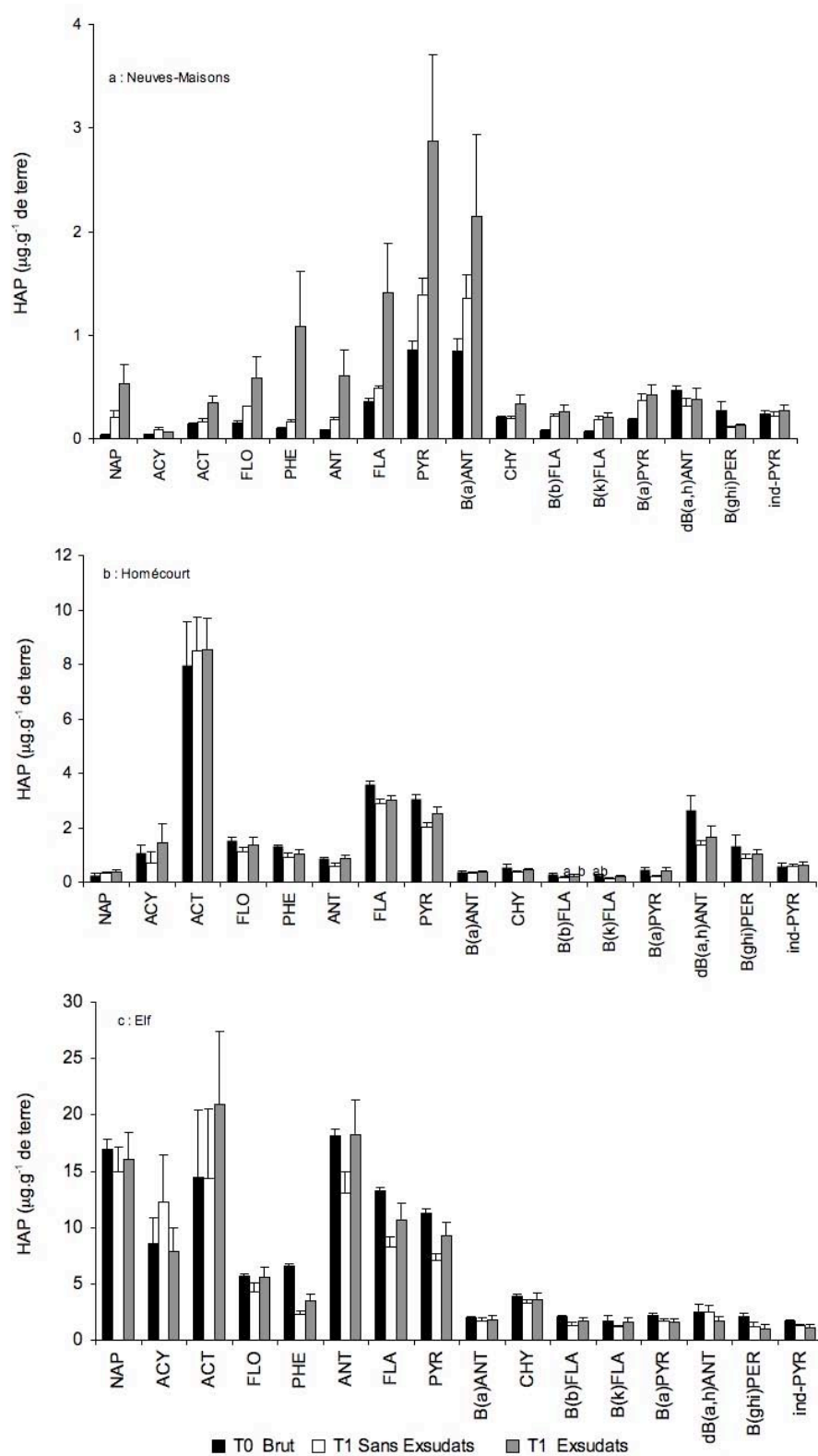
Annexe 4 : Test de Newman-Keuls sur les concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles à la cyclodextrine dans les compartiments latéraux contenant la terre de Neuves-Maisons avec et sans phénanthrène ($500 \mu\text{g.g}^{-1}$) après 3 et 6 semaines d'incubation dans les sections rhizosphériques (0-3 mm) et non plantées (NP). Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$) entre les traitements.

Sans PHE	T ₀ Brut	NM 3sem (0-3)	NM 3sem NP	NM 6sem (0-3)	NM 6sem NP
NAP	a	b	b	a	a
ACY	a	c	b	a	a
ACT	a	b	b	a	a
FLO	b	a	a	a	a
PHE	b	b	ab	a	a
ANT	b	ab	ab	ab	a
FLA	b	b	b	a	a
PYR	b	c	b	a	a
B(a)ANT	a	a	a	a	a
CHY	a	a	a	a	a
B(b)FLA	a	a	a	a	a
B(k)FLA	b	ab	ab	a	ab
B(a)PYR	a	a	a	a	a
B(ghi)PER	a	b	ab	a	a
ind-PYR	a	a	a	a	a

Avec PHE	MN+PHE	NMPHE 3sem (0-3)	NMPHE 3sem NP	NMPHE 6sem (0-3)	NMPHE 6sem NP
NAP	a	b	b	a	a
ACY	a	b	b	a	a
ACT	a	a	a	a	a
FLO	b	a	a	a	a
PHE	c	b	a	a	a
ANT	b	a	a	a	a
FLA	c	b	b	a	ab
PYR	c	b	b	a	ab
B(a)ANT	b	a	a	a	a
CHY	a	a	a	a	a
B(b)FLA	b	a	a	a	a
B(k)FLA	a	a	a	a	a
B(a)PYR	ab	b	b	a	a
B(ghi)PER	ab	b	ab	a	ab
ind-PYR	ab	ab	a	ab	b



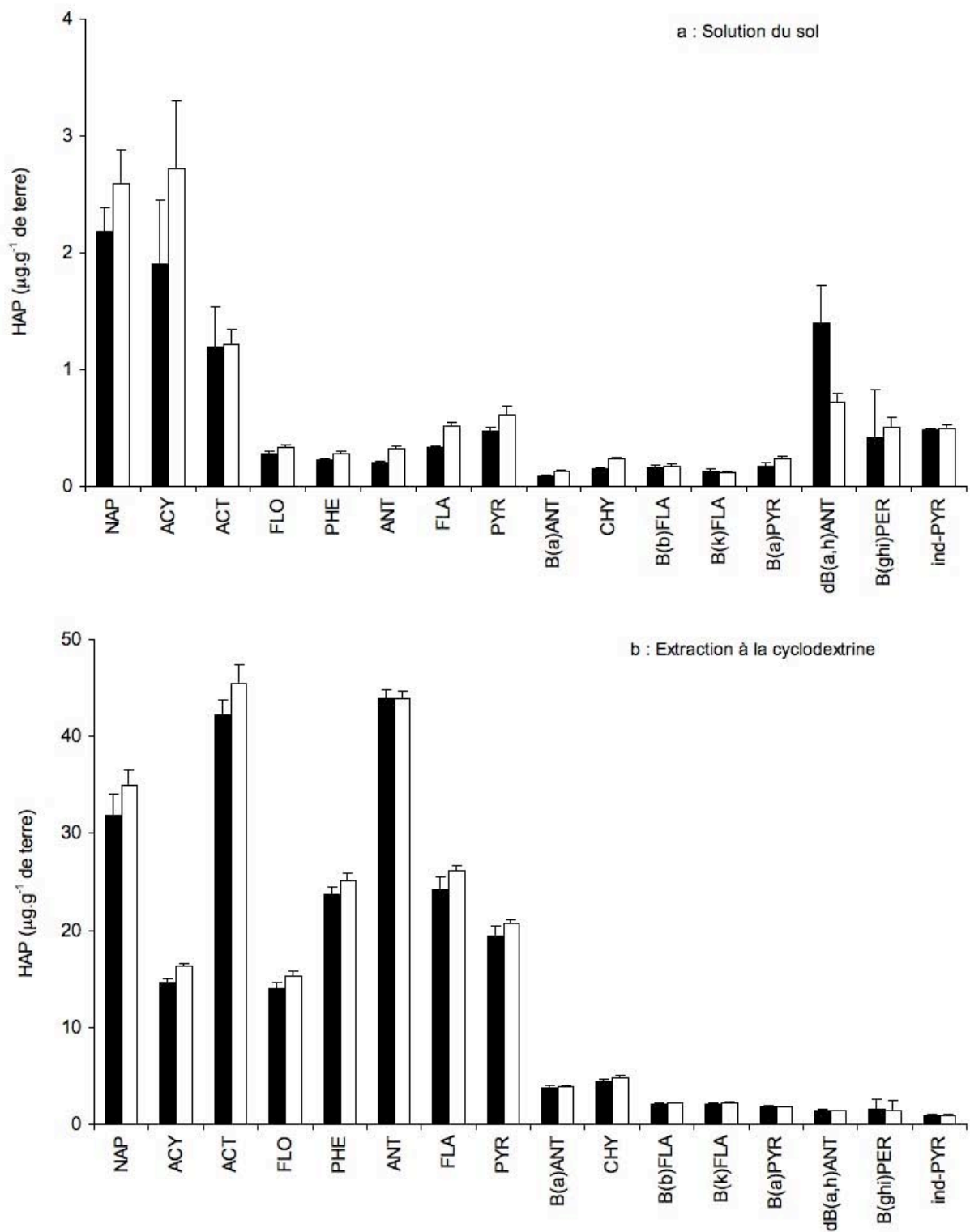
Annexe 5 : Concentrations en HAP ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) extractibles sous pression au dichlorométhane (ASE) dans les terres contaminées des anciens sites industriels de (a) Neuves-Maisons, (b) Homécourt et (c) Elf au début de l'expérience (T₀) et après 8 jours d'incubation avec et sans exsudats racinaires. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$) entre les traitements.



Annexe 6 : Concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles à la cyclodextrine dans les terres contaminées des anciens sites industriels de (a) Neuves Maisons, (b) Homécourt et (c) Elf au début de l'expérience (T₀) et après 8 jours d'incubation avec et sans exsudats racinaires. En liens avec l'annexe 7.

	NM			HOM			Elf		
	Brut T ₀	T1 Sans Exsudats	T1 avec Exsudats	Brut T ₀	T1 Sans Exsudats	T1 avec Exsudats	Brut T ₀	T1 Sans Exsudats	T1 avec Exsudats
NAP	b	ab	a	a	a	a	a	a	a
ACY	a	a	a	a	a	a	a	a	a
ACT	b	b	a	a	a	a	a	a	a
FLO	a	a	a	a	a	a	a	a	a
PHE	a	a	a	a	a	a	a	b	b
ANT	a	a	a	a	a	a	a	a	a
FLA	b	b	a	a	a	a	a	b	ab
PYR	b	ab	a	a	b	a	a	b	ab
B(a)ANT	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CHY	a	a	a	a	a	a	a	a	a
B(b)FLA	b	a	a	b	a	a	b	a	a
B(k)FLA	b	a	a	a	b	ab	a	b	ab
B(a)PYR	a	a	a	a	a	a	a	a	a
dB(a,h)ANT	a	a	a	a	a	a	a	a	a
B(ghi)PER	a	a	a	a	a	a	a	a	a
ind-PYR	a	a	a	a	a	a	a	a	a

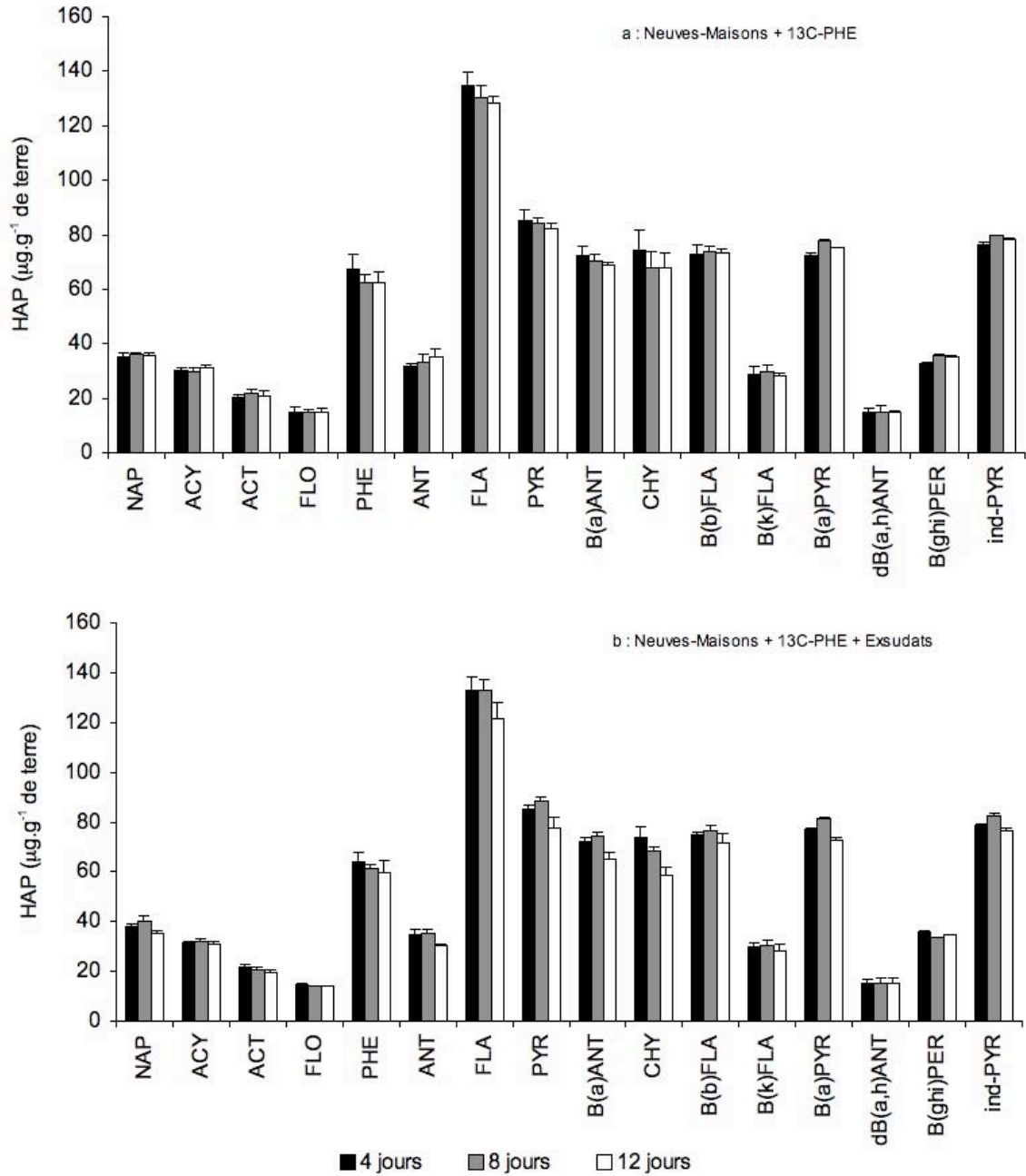
Annexe 7 : Test de Newman-Keuls sur les concentrations en HAP ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) extractibles à la cyclodextrine dans les microcosmes contenant les terres de Neuves-Maisons (NM), Homécourt (Hom) et Elf avec et sans exsudats racianires après 8 jours d'incubation. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$) entre les traitements. En lien avec l'annexe 6.



Annexe 8 : Concentrations en HAP de la terre de Elf ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de terre) dans la solution du sol (a) et dans les extraits à la cyclodextrine (b) après 4 heures d'incubation avec une solution minérale (■) et avec des exsudats racinaires (□).

	Solution du sol après 4 heures d'incubation		HAP extraits à la cyclodextrine	
	Solution minérale	Solution avec exsudats	Solution minérale	Solution avec exsudats
NAP	a	a	a	a
ACY	a	a	b	a
ACT	a	a	a	a
FLO	a	a	a	a
PHE	b	a	a	a
ANT	b	a	a	a
FLA	b	a	a	a
PYR	a	a	a	a
B(a)ANT	b	a	a	a
CHY	b	a	a	a
B(b)FLA	a	a	a	a
B(k)FLA	a	a	a	a
B(a)PYR	a	a	a	a
dB(a,h)ANT	a	a	a	a
B(ghi)PER	a	a	a	a
ind-PYR	a	a	a	a

Annexe 9 : Test de Newman-Keuls sur les concentrations en HAP de la terre Elf ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) dans la solution du sol après 4 heures d'incubation et dans les extraits à la cyclodextrine. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$) entre les traitements. En lien avec l'annexe 8.



Annexe 10 : Concentrations en HAP ($\mu\text{g.g}^{-1}$) extractibles sous pression au dichlorométhane (ASE) dans la terre de Neuves-Maisons, après 4, 8 et 12 jours d'incubation dans les microcosmes sans (a) et avec (b) exsudats racinaires et du ^{13}C -phénanthrène.

12. Références bibliographiques

- Accardi-Dey, A. Gschwend, P. M. (2002). Assessing the combined roles of natural organic matter and black carbon as sorbents in sediments. *Environ Sci Technol*, 36, 21-29.
- Ahn, Y., Sanseverino, J. Sayler, G. S. (1999). Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils. *Biodegradation*, 10, 149-157.
- Aitken, M. D., Stringfellow, W. T., Nagel, R. D., Kazunga, C. Chen, S.-H. (1998). Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.*, 44, 743-752.
- Alberda, T. (1956). The effects of cutting, light intensity and night temperature on growth and soluble carbonate content of *Lolium perenne* L. *Plant Soil*, 8, 199-230.
- Alexander, M. (2000). Aging, bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ Sci Technol*, 34, 4259-4265.
- Alkorta, I. Garbisu, C. (2001). Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology*, 79, 273-276.
- Allan, I. J., Semple, K. T., Hare, R. Reid, B. (2006). Prediction of mono- and polyaromatic hydrocarbon degradation in spiked soils using cyclodextrin extraction. *Environ. Pollut.*, 144, 562-571.
- Allard, A.-S., Remberger, M. Neilson, A. H. (2000). The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 46, 43-49.
- Anderson, T. A., Guthrie, E. A. Walton, B. T. (1993). Bioremediation in the rhizosphere : Plant roots and associated microbes clean contaminated soil. *Environ Sci Technol*, 27, 2630-2636.
- Andreoni, V. Gianfreda, L. (2007). Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Appl. Microbiol. Biot.*, 76, 287-308.
- Bakker, M. I., Casado, B., Koerselman, J. W., Tolls, J. Kollöffel, C. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and plant samples from the vicinity of an oil refinery. *The Science of the Total Environment*, 263, 91-100.
- Barnier, C. (2009). Disponibilité des HAP dans les sols de friches industrielles et influence des conditions rhizosphériques. Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques, Institut National Polytechnique de Lorraine, 212 p.
- Barnslez, E. A. (1976). Role and regulation of the ortho and meta pathways of catechol metabolism in Pseudomonads metabolizing naphthalene and salicylate. *J. Bacteriol.*, 125, 404-408.
- Baudoin, E., Benizri, E. Guckert, A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 35, 1183-1192.

- Beltran, F. J., Overjero, G. Rivas, J. (1996). Oxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in water. 3. UV radiation combined with hydrogen peroxide. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 35, 883-890.
- Bengtsson, G. Zerhouni, P. (2003). Effects of carbon substrat enrichments and DOC concentration on biodegradation of PAHs in soil. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 608-617.
- Besombes, J. L., Maître, A., Patissier, O., Marchand, N., Chevron, N., Stoklov, M. Masclet, P. (2001). Particulate PAHs observed in the surrounding of a municipal incinerator. *Atmospheric Environment*, 35, 6093-6104.
- Binet, P., Portal, J. M. Leyval, C. (2000). Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 2011-2017.
- Binet, P., Portal, J. M. Leyval, C. (2000). Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere. *Plant Soil*, 227, 207-213.
- Bodour, A., Wang, J.-M., Brusseau, M. L. Maier, R. M. (2003). Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. *Environ Microbiol*, 5, 888-895.
- Bohme, D. (1992). PAH and fullerene ions and ion/molecule reactions in interstellar and circumstellar chemistry. *Chemical Reviews*, 92, 1487-1508.
- Bolan, N. S. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil*, 134, 189-207.
- Boldrin, B., Tiehm, A. Fritzsche, C. (1993). Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol*, 59, 1927-1930.
- Bonin, J. L. Simpson, M. J. (2007). Variation in phenanthrene sorption coefficients with soil organic matter fractionation : the result of structure or conformation? *Environ Sci Technol*, 41, 153-159.
- Boonchan, S., Britz, M. Stanley, G. (2000). Degradation and mineralization of high-moleculaire-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl Environ Microbiol*, 66, 1007-1019.
- Bosch, R., Garcia-Valdès, E. Moore, E. R. B. (1999). Genetic characterization and evolution implication of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*, 236, 149-157.
- Boyd, D. R. Sheldrake, G. N. (1998). The dioxygenase-catalysed formation of vicinal cis-diols. *Nat. Prod. Rep.*, 15, 309-324.
- Brandt, B. W., van Leeuwen, I. M. M. Kooijman, S. A. L. M. (2003). A general model for multiple substrate biodegradation. Application to co-metabolism of structurally non-analogous compounds. *Water Res.*, 37, 4843-4854.
- Bremer, E. Kessel, C. V. (1990). Extractability of microbial ¹⁴C and ¹⁵N following addition of variable rates of labelled glucose and (NH₄)₂SO₄ to soil. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 707-713.

- Bremer, E. Kuikman, P. (1994). Microbial utilization of $^{14}\text{C}(\text{U})$ glucose in soil is affected by the amount and timing of glucose additions. *Soil Biol. Biochem.*, 26, 511-517.
- Brinch, U. C., Ekelund, F. Jacobsen, C. S. (2002). Method for spiking soil samples with organic compounds. *Appl Environ Microbiol*, 68, 1808-1816.
- Bucheli, T. D., Blum, F., Desaulles, A. Gustafsson, Ö. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons, black carbon, and molecular markers in soils of Switzerland. *Chemosphere*, 56, 1061-1076.
- Bugg, T., Foght, J. M., Pickard, M. A. Gray, M. R. (2000). Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. *Appl Environ Microbiol*, 66, 5387-5392.
- Cahnmann, H. J. (1955). Detection and quantitative determination of benzo(a)pyrene in American shale oil. *Analytical Chemistry*, 27, 1235-1240.
- Cébron, A., Beguiristain, T., Faure, P., Norini, M. P., Masfaraud, J.-F. Leyval, C. (2009). Influence of vegetation on the *in situ* bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil. *Appl Environ Microbiol*, 75, 6322-6330.
- Cébron, A., Norini, M. P., Beguiristain, T. Leyval, C. (2008). Real-time PCR quantification of PAH ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Meth.*, 73, 148-159.
- Celis, R., De Jonge, H., De Jonge, L. W., Real, M., Hermosin, M. C. Cornejo, J. (2006). The role of mineral and organic components in phenanthrene and dibenzofuran sorption by soil. *Eur. J. Soil Sci.*, 57, 308-319.
- Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 351-368.
- Cerniglia, C. E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : past, present and future application in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 19, 324-333.
- Cescutti, P., Garozzo, D. Rizzo, R. (1996). Study of the inclusion complexes of aromatic molecules with cyclodextrins using ionspray mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 290, 105-115.
- Chang, B. V., Shiung, L. C. Yuan, S. Y. (2002). Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere*, 48, 717-724.
- Chang, J.-S., Chou, C.-L., Lin, G.-H., Sheu, S.-Y. Chen, W.-M. (2005). *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis*, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 137-144.
- Chaudhry, D., Blom-Zandstra, M., Gupta, S. Joner, E. J. (2005). Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 12, 34-48.
- Chefetz, B., Deskmukh, A. P., Hatcher, P. G. Guthrie, E. A. (2000). Pyrene sorption by natural organic matter. *Environ Sci Technol*, 34, 2925-2930.
- Chekol, T. Vough, L. V. (2004). Assessing the potential of using phytoremediation for pyrene-contaminated soils. *Remediation*, Summer, 93-103.

- Chen, Y., Dumont, M. G., Cébron, A. Murrell, J. L. (2007). Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes. *Environ Microbiol*, 9, 2855-2869.
- Chen, Y.-C., Banks, M. K. Schwab, A. P. (2003). Pyrene degradation in the rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*) and Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Environ Sci Technol*, 37, 5778-5782.
- Chen, Z. Adams, M. A. (1999). Simultaneous determination of aliphatic and aromatic acids in plant tissue extracts by ion-exclusion chromatography. *Anal Chim Acta*, 386, 249-256.
- Cheung, P.-Y. Kinkle, B. K. (2001). Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Appl Environ Microbiol*, 67, 2222-2229.
- Chiapusio, G., Pujol, S., Toussaint, M. L., Badot, P. M. Binet, P. (2007). Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils. *Plant and Soil*, 294, 103-112.
- Coates, J. D., Anderson, R. T. Lovley, D. R. (1996). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol*, 62, 1099-1101.
- Coates, J. D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P. Lovley, D. R. (1997). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl Environ Microbiol*, 63, 3589-3593.
- Cofield, N., Banks, M. K. Schwab, A. P. (2007). Evaluation of hydrophobicity in PAH-contaminated soils during phytoremediation. *Environ. Pollut.*, 145, 60-67.
- Colombo, J. C., Cabello, M. Arambarri, A. M. (1996). Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi. *Environ. Pollut.*, 94, 355-362.
- Colombo, J. C., Pelletier, E., Brochu, C., Khalil, M. Catoggio, J. A. (1989). Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study : Rio de La Plata Estuary, Argentina. *Environ Sci Technol*, 23, 888-894.
- Corgié, S. C. (2004). Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques, sélection et dynamique des populations bactériennes dans la rhizosphère en fonction de la distance aux racines. Thèse de doctorat en Sciences de l'univers, Université Henri Poincaré, Nancy 1, 190 p.
- Corgié, S. C., Beguiristain, T. Leyval, C. (2006 a). Differential composition of bacterial communities as influenced by phenanthrene and dibenzo(a-h)anthracene in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Biodegradation*, 17, 511-521.
- Corgié, S. C., Beguiristain, T. Leyval, C. (2006 b). Profiling 16S bacterial DNA and RNA: Difference between community structure and transcriptional activity in phenanthrene polluted sand in the vicinity of plant roots. *Soil Biol. Biochem.*, 38, 1545-1553.

- Corgié, S. C., Beguiristain, T. Leyval, C. (2004). Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Appl Environ Microbiol*, 70, 3552-3557.
- Corgié, S. C., Fons, F., Beguiristain, T. Leyval, C. (2006 c). Biodegradation of phenanthrene, spatial distribution of bacterial populations and dioxygenase expression in the mycorrhizosphere of *Lolium perenne* inoculated with *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*, 16, 207-212.
- Corgié, S. C., Joner, E. J. Leyval, C. (2003). Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant Soil*, 257, 143-150.
- Cornelissen, G., Elmquist, M., Groth, I. Gustafsson, Ö. (2004). Effect of sorbate planarity on environmental back carbon sorption. *Environ Sci Technol*, 38, 3574-3580.
- Cornelissen, G. Gustafsson, Ö. (2006). Effects of added PAHs and precipitated humic acid coatings on phenanthrene sorption to environmental black carbon. *Environ. Pollut.*, 141, 526-531.
- Cornelissen, G. Gustafsson, Ö. (2004). Sorption of phenanthrene to environmental black carbon in sediment with and without organic matter and native sorbates. *Environ Sci Technol*, 38, 148-155.
- Cornelissen, G., Gustafsson, Ö., Bucheli, T. D., Jonker, M. T. O., Koelmans, A. A. van Noort, P. C. M. (2005). Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils : Mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environ Sci Technol*, 39, 6881-6895.
- Criquet, S., Joner, E. J., Leglize, P. Leyval, C. (2000). Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotechnol. Lett.*, 22, 1733-1737.
- Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T. Rulkens, W. (2002). The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-*B*-cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere*, 46, 1235-1245.
- Czarnes, S., Hallett, P. D., Bengough, A. G. Young, I. M. (2000). Root- and microbial-derived mucilages affect soil structure and water transport. *Eur. J. Soil Sci.*, 51, 435-443.
- Da Silva, M. L. B., Kamath, R. Alvarez, P. J. J. (2006). Effect of simulated rhizodeposition on the relative abundance of polynuclear aromatic hydrocarbon catabolic genes in a contaminated soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25, 386-391.
- Daane, L. L., Harjono, I., Barns, S. M., Launen, L. A., Palleroni, N. J. Haggblom, M. M. (2002). PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 131-139.
- Daane, L. L., Harjono, I., Zylstra, G. J. Haggblom, M. M. (2001). Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl Environ Microbiol*, 67, 2683-2691.

- Dakora, F. D. Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil*, 245, 35-47.
- Dal, S., Steiner, I. Gerischer, U. (2002). Multiple operons connected with catabolism of aromatic compounds in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are under carbon catabolite repression. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 4, 389-404.
- Dandie, C. E., Thomas, S. M., Bentham, R. H. McClure, N. C. (2004). Physiological characterization of *Mycobacterium* sp. strain 1B isolated from a bacterial culture able to degrade high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 246-255.
- Darrah, P. R. (1993). The rhizosphere and plant nutrition : a quantitative approach. *Plant Soil*, 155/156, 1-20.
- Davis, J. I. Evans, W. C. (1964). Oxidative metabolism of naphthalene by soil *Pseudomonas*. *Biochemistry Journal*, 91, 251-261.
- Dazy, M., Jung, V., Féraud, J.-F. Masfaraud, J.-F. (2008). Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil : Role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere*, 74, 57-63.
- Dean-Ross, D., Moody, J. D., Freeman, J. P., Doerge, D. R. Cerniglia, C. E. (2001). Metabolism of anthracene by *Rhodococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 204, 205-211.
- DeAngelis, K. M., Lindow, S. E. Firestone, M. K. (2008). Bacterial quorum sensing and nitrogen cycling in rhizosphere soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 66, 197-207.
- Debette, J. Blondeau, R. (1980). Présence de *Pseudomonas maltophilia* dans la rhizosphère de quelques plantes cultivées. *Can. J. Microbiol.*, 26, 460-463.
- DeMarini, D. M., Landi, S., Tian, D., Hanley, N. M., Li, X., Hu, F., Roop, B. C., Mass, M. J., Keohavong, P., Gao, W., Olivier, M., Hainaut, P. Mumford, J. L. (2001). Lung tumor KRAS and TP53 mutations in nonsmokers reflect exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Cancer Research*, 61, 6679-6681.
- Dennis, J. Zylstra, G. J. (2004). Complete sequence and genetic organisation of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *J. Mol. Biol.*, 341, 753-768.
- Denome, S. A., Stanley, D. C., Olson, E. S. Young, K. D. (1993). Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* Strains : Complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *J. Bacteriol.*, 175, 6890-6901.
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F. Bisailon, J.-G. (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*, 62, 1908-1912.
- Dietz, A. C. Schnoor, J. L. (2001). Advances in phytoremediation. *Environ. Health Persp.*, 109, 163-168.
- Doick, K. L., Clasper, P. J., Urmann, K. Semple, K. T. (2006). Further validation of the HPCD-technique for the evaluation of PAH microbial availability in soil. *Environ. Pollut.*, 144, 345-354.

- Doick, K. L. Semple, K. T. (2003). The effect of soil : water ratios on the mineralisation of phenanthrene : LNAPL mixtures in soil. *FEMS Microbiol. Lett.*, 220, 29-33.
- Domanski, G., Kuzyakov, Y., Siniakina, S. V. Stahr, K. (2001). Carbon flows in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *J. Plant Nutr. SC*, 164, 381-387.
- Dou, J., Liu, X. Ding, A. (2009). Anaerobic degradation of naphthalene by the mixed bacteria under nitrate reducing conditions. *J. Hazard. Mater.*, 165, 325-331.
- Duchaufour, P. (1983). *Pédologie Tome 2 : Constituants et propriétés du sol*. 2e édition ed. MASSON. 491p.
- Duggan, J., Goldstein, S., Chenweth, C., Kauffman, C. Bradley, S. (1996). *Achromobacter xylooxidans* bacteremia: report of four cases and review of the literature. *Clinical infectious diseases*, 23, 569-576.
- Dunn, N. W. Gunsalus, I. C. (1973). Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, 114, 974-979.
- Eaton, R. W. Chapman, P. J. (1992). Bacterial metabolism of naphthalene : construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *J. Bacteriol.*, 174, 7542-8554.
- Eaton, R. W. Chapman, P. J. (1995). Formation of indigo and related compounds from indolecarboxylic acids by aromatic acid-degrading bacteria: chromogenic reactions for cloning genes encoding dioxygenases that act on aromatic acids. *J. Bacteriol.*, 177, 6983-6988.
- Ehlers, G. A. C. Loibner, A. P. (2006). linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology : A review of geosorbent characterisation and (bio)availability prediction. *Environ. Pollut.*, 141, 494-512.
- Elgersma, A., Ellen, G., van der Horst, H., Muuse, B. G., Boer, H. Tamminga, S. (2003). Influence of cultivar and cutting date on the fatty acid composition of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Grass and Forage Science*, 58, 323-331.
- Evans, W. C., Fernley, H. N. Griffiths, E. (1965). Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil Pseudomonads. *Biochemistry Journal*, 95, 819-831.
- Fan, T. W. M., Lane, A. N., Shenker, M., Bartley, J. P., Crowley, D. Higashi, R. M. (2001). Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. *Phytochemistry*, 57, 209-221.
- Fava, F., Berselli, S., Conte, P., Piccolo, A. Marchetti, L. (2004). Effects of humic substances and soya lecithin on the aerobic bioremediation of a soil historically contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 214-223.
- Felske, A., Akkermans, A. D. L. De Vos, W. M. (1998). Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl Environ Microbiol*, 64, 4581-4587.
- Feselstein, J. (1989). PHYLIP : Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics*, 5, 164-166.

- Fine, P. M., Cass, G. R. Simoneit, B. R. T. (2002). Chemical characterization of fine particle emissions from the fireplace combustion of woods grown in the southern United States. *Environ Sci Technol*, 36, 1442-1451.
- Fletcher, J. S. Hegde, R. S. (1995). Release of phenols by perennial plant roots and their potential importance in bioremediation. *Chemosphere*, 31, 3009-3016.
- Forbes, P. J., Black, K. E. Hooker, J. E. (1997). Temperature-induced alteration to root longevity in *Lolium perenne*. *Plant Soil*, 190, 87-90.
- Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. Williams, P. A. (1998). A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *J. Bacteriol.*, 180, 2522-2530.
- Gao, Y. Ling, W. (2006). Comparaison for plant uptake of phenanthrene and pyrene from soil and water. *Biol. Fert. Soils*, 42, 387-394.
- Gao, Y., Xiong, W., Ling, W., Wang, H., Ren, L. Yang, Z. (2008). Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between plant roots and water. *Plant Soil*, 311, 201-209.
- Gao, Y. Zhu, L. (2004). Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*, 55, 1169-1178.
- Gauthier, T. D., Seitz, W. R. Grant, C. L. (1987). Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene Koc values. *Environ Sci Technol*, 21, 243-248.
- Genney, D. R., Alexander, I. J., Killham, K. Meharg, A. A. (2004). Degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) fluorene is retarded in a Scots pine ectomycorrhizosphere. *New Phytol.*, 163, 641-649.
- Gibson, U. E. M., Heid, C. A. Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 6, 995-1001.
- Goyal, A. K. Zylstra, G. J. (1996). Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Appl Environ Microbiol*, 62, 230-236.
- Gramss, G., Voight, K. D. Kirsche, B. (1999). Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material. *Chemosphere*, 38, 1481-1494.
- Gregory, P. J. Hinsinger, P. (1999). New approaches to studying chemical and physical changes in the rhizosphere : an overview. *Plant Soil*, 211, 1-9.
- Griest, W. H. Tomkins, B. A. (1986). Influence of carbonaceous particles on the interaction of coal combustion stack ash with organic matter. *Environ Sci Technol*, 20, 291-295.
- Griffiths, B. S., Ritz, K., Ebbelwhite, N. Dobson, G. (1999). Soil microbial community structure : Effects of substrate loading rates. *Soil Biol. Biochem.*, 31, 145-153.
- Groleau-Renaud, V., Plantureux, S. Guckert, A. (1998). Influence of plant morphology on root exudation of maize subjected to mechanical impedance in hydroponic conditions. *Plant Soil*, 201, 231-239.

- Guerin, T. F. (1999). Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ landtreatment. *J. Hazard. Mater.*, B65, 305-315.
- Guha, S., Peters, C. A. Jaffé, P. R. (1999). Multisubstrate biodegradation kinetics of naphthalene, phenanthrene, and pyrene mixtures. *Biotechnol. Bioeng.*, 65.
- Gunasekara, A. S., Simpson, M. J. Xing, B. (2003). Identification and characterization of sorption domains in soil organic matter using structurally modified humic acids. *Environ Sci Technol*, 37, 852-858.
- Gunasekara, A. S. Xing, B. (2003). Sorption and desorption of naphthalene by soil organic matter : importance of aromatic and aliphatic components. *J. Environ. Qual.*, 32, 240-246.
- Gundel, L. A., Lee, V. C., Mahanama, K. R. R., Stevens, R. K. Daisey, J. M. (1995). Direct determination of the phase distributions of semi-volatile polycyclic aromatic hydrocarbons using annular denuders. *Atmospheric Environment*, 29, 1719-1733.
- Günther, T., Dornberger, U. Fritsche, W. (1996). Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, 33, 203-215.
- Gunther, T., Sack, U., Hofrichter, M. Latz, M. (1998). Oxidation of PAH and PAH-derivatives by fungal and plant oxidoreductases. *J. Basic Microb.*, 38, 113-122.
- Guo, H., Lee, S. C., Ho, K. F., Wang, X. M. Zou, S. C. (2003). Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air of Hong Kong. *Atmospheric Environment*, 37, 5307-5317.
- Guthrie, E. A. Pfaender, F. K. (1998). Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. *Environ Sci Technol*, 32, 501-508.
- Haichar, F. E. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T. Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME Journal*, 2, 1221-1230.
- Haigler, B. E. Gibson, D. T. (1990). Purification and properties of NADH-ferredoxin NAP reductase, a component of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas sp.* strain NCIB 9816. *J. Bacteriol.*, 172, 457-464.
- Hamza, M. A. Aylmore, L. A. G. (1992). Soil solute concentration and water uptake by single lupin and radish plant roots. *Plant Soil*, 187, 187-196.
- Harms, H. Bosma, T. N. P. (1997). Mass transfert limitation of microbial growth and pollutant degradation. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 18, 97-105.
- Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D. Berg, G. (2009). Plant-driven selection microbes. *Plant Soil*, 321, 235-257.
- Hatzinger, P. B. Alexander, M. (1995). Effect of aging chemicals in soil on their biodegradability and extraction. *Environ Sci Technol*, 29, 537-545.
- Hauben, L., Vauterin, L., Moore, E. R., Hoste, B. Swings, J. (1999). Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int J Syst Bacteriol*, 49, 1749-1760.

- Hayes, L. A. Lovley, D. R. (2002). Specific 16S rDNA sequences associated with naphthalene degradation under sulfate-reducing conditions in harbor sediments. *Microbial Ecol.*, 43, 134-145.
- Hegde, R. S. Fletcher, J. S. (1996). Influence of plant growth stage and season on the release of phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere*, 32, 2471-2479.
- Hewitt, E. J. (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. In: Technical communication. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, London., p547.
- Hickman, Z. A. Reid, B. J. (2005). Towards a more appropriate water based extraction for the assessment of organic contaminant availability. *Environ. Pollut.*, 138, 299-306.
- Hinsinger, P., Elsass, F., Jaillard, B. Robert, M. (1993). Root-induced irreversible transformation of a trioctahedral mica in the rhizosphere of rape. *Eur. J. Soil Sci.*, 44, 535-545.
- Hinsinger, P. Gilkes, R. J. (1997). Dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of five species grown in an acid, P-fixing mineral substrate. *Geoderma*, 75, 231-249.
- Hinsinger, P., Gobran, G. R., Gregory, P. J. Wenzel, W. W. (2005). Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.*, 168, 293-303.
- Hinsinger, P., Plassard, C. Jaillard, B. (2006). Rhizosphere : A new frontier for soil biogeochemistry. *J. Geochem. Explor.*, 88, 210-213.
- Ho, Y., Jackson, M., Yang, Y., Mueller, J. G. Pritchard, P. H. (2000). Characterization of fluoranthene and pyrene degrading bacteria isolated from PAH-contaminated soils and sediments. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 24, 100-112.
- Hodge, A., Paterson, E., Grayston, S. J., Campbell, C. D., Ord, B. G. Killham, K. (1998). Characterisation and microbial utilisation of exudate material from the rhizosphere of *Lolium perenne* grown under CO₂ enrichment. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 1033-1043.
- Holding, A. J. (1960). The properties and classification of the predominant Gram-negative bacteria occurring in soil. *J. appl. Bact.*, 23, 515-525.
- Hori, K., Hiramatsu, N., Nannbu, M., Kanie, K., Okochi, M., Honda, H. Watanabe, H. (2009). Drastic change in cell surface hydrophobicity of a new bacterial strain, *Pseudomonas sp.* TIS1-127, induced by growth temperature and its effects on the toluene-conversion rate. *J. Biosci. Bioeng.*, 107, 250-255.
- Horvath, R. S. (1972). Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriological Reviews*, 36, 146-155.
- Hundal, L. S., Thompson, M. L., Laird, D. A. Carmo, A. (2001). Sorption of phenanthrene by reference smectites. *Environ Sci Technol*, 35, 3456-3461.
- Hur, J. Schlautman, M. A. (2004). Effects of mineral surfaces on pyrene partitioning to well-characterized humic substances. *J. Environ. Qual.*, 33, 1733-1742.
- Hwang, S. Cutright, T. J. (2002 b). Biodegradation of aged pyrene and phenanthrene in natural soil. *Chemosphere*, 47, 891-899.

- Hwang, S. Cutright, T. J. (2002 a). The impact of contact time on pyrene sorptive behavior by a sandy-loam soil. *Environ. Pollut.*, 117, 317-378.
- Ishiguro, T., Takatori, Y. Akihama, K. (1997). Microstructure of diesel soot particles probed by electron microscopy : first observation of inner core and outer shell. *Combustion and Flame*, 108, 231-234.
- Jakoncic, J., Jouanneau, Y., Meyer, C. Stojanoff, V. (2007). The crystal structure of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas CHY-1*. *FEBS Journal*, 274, 2470-2481.
- Jerina, D. M., Selander, H., Yagi, H., Wells, M. C., Davey, J. F., Mahadevan, V. Gibson, D. T. (1976). Dihydrodiols from anthracene and phenanthrene. *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 5988-5966.
- Jha, P. Kumar, A. (2009). Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microb Ecol*, 58, 179-188.
- Johnsen, A. R., Winding, A., Karlson, U. Roslev, P. (2002). Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of ¹³C-labeled cell lipids. *Appl Environ Microbiol*, 68, 6106-6113.
- Johnsen, C. R. Scow, K. M. (1999). Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils. *Biodegradation*, 10, 43-50.
- Johnson, A. R., Schmidt, S., Hybholt, T. K., Henriksen, S., Joacobsen, C. S. Andersen, O. (2007). Strong impact on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading community of a PAH-polluted soil but marginal effect on PAH degradation when priming with bioremediated soil dominated by *Mycobacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 73, 1474-1480.
- Johnson, A. R., Wick, L. Y. Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.*, 133, 71-84.
- Joner, E. J., Corgié, S. C., Amellal, N. Leyval, C. (2002). Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 34, 859-864.
- Joner, E. J., Johansen, A., Loibner, A. P., Dela Cruz, M. A., Szolar, O. H. J. Leyval, C. (2001). Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environ Sci Technol*, 35, 2773-2777.
- Joner, E. J. Leyval, C. (2003). Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ Sci Technol*, 37, 2371-2375.
- Jones, D. L. (1998). Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil*, 205, 25-44.
- Jones, D. L. Brassington, D. S. (1998). Sorption of organic acids soils and its implications in the rhizosphere. *Eur. J. Soil Sci.*, 49, 447-455.
- Jones, D. L., Hodge, A. Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.*, 163, 459-480.
- Jonker, M. T. O. (2008). Absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to cellulose. *Chemosphere*, 70, 778-782.

- Jonker, M. T. O., Hawthorne, S. B. Koelmans, A. A. (2005). Extremely slowly desorbing polycyclic aromatic hydrocarbons from soot and soot-like materials: Evidence by supercritical fluid extraction. *Environ Sci Technol*, 39, 7889-7895.
- Jouanneau, Y., Meyer, C., Jakoncic, J., Stojanoff, V. Gaillard, J. (2006). Characterization of a naphthalene dioxygenase endowed with an exceptionally broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochemistry*, 45, 12380-12391.
- Juhasz, A. L., Britz, M. L. Stanley, G. A. (1997). Degradation of fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene and dibenzo(a,h)anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J. Appl. Microbiol.*, 83, 189-198.
- Juhasz, A. L. Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons : a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 45, 57-88.
- Kamath, A., Schnoor, J. L. Alvarez, P. J. J. (2004). Effect of root-derived substrates on the expression of naph-lux genes in *Pseudomonas fluorescences* HK44: Implication for PAH biodegradation in the rhizosphere. *Environ Sci Technol*, 38, 1740-1745.
- Kamath, R., Schnoor, J. L. Alvarez, P. J. J. (2005). A model for the effect of rhizodeposition on the fate of phenanthrene in aged contaminated soil. *Environ Sci Technol*, 39, 9669-9675.
- Kanaly, R. A., Bartha, R., Watanabe, K. Karayama, S. (2000). Rapid mineralization of benzo(a)pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4205-4211.
- Kanaly, R. A. Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.*, 182, 2059-2067.
- Kang, S. Xing, B. (2005). Phenanthrene sorption to sequentially extracted soil humic acids and humins. *Environ Sci Technol*, 39, 134-140.
- Kaplan, C. W., Clement, B. G., Hamrick, A., Pease, R. W., Flint, C., Cano, R. J. Kitts, C. L. (2003). Complex co-substrate addition increases initial petroleum degradation rates during land treatment by altering bacterial community physiology. *Remediation*, 13, 61-78.
- Kasai, Y., Shindo, K., Harayama, S. Misawa, N. (2003). Molecular characterization and substrate preference of a polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from *Cycloclasticus* sp. strain A5. *Appl Environ Microbiol*, 69, 6688-6697.
- Kastner, M., Breuer-Jammali, M. Mahro, B. (1994). Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl. Microbiol. Biot.*, 41, 267-273.
- Katznelson, H. (1946). The rhizosphere effect of mangels on certain groups of soils microorganisms. *Soil Sci.*, 62, 343-354.
- Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R. E., Gibson, D. T., Eklund, H. Ramaswamy, S. (1998). Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure*, 6, 571-586.

- Kazunga, C. Aitken, M. D. (2000). Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 66, 1917-1922.
- Keith, L. H. Telliard, W. A. (1976). Priority pollutants. I. A perspective view. *Environ Sci Technol*, 13, 416-423.
- Kelley, R. L., Gauger, W. K. Srivastava, V. J. (1991). Application of Fenton's reagent as a pretreatment step in biological degradation of polyaromatic hydrocarbons. In *Gas, Oil, Coal and Environmental Biotechnology III* (Akin C. and J. Smith, eds). Institute of Gas Technology, Chicago, IL, 105-120.
- Kelsey, J. W., Kottler, B. D. Alexander, M. (1997). Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ Sci Technol*, 31, 1-4.
- Khan, S., Hesham, A. E.-L., Qing, G., Shuang, L. He, J. (2009). Biodegradation of pyrene and catabolic genes in contaminated soils cultivated with *Lolium multiflorum* L. *J. Soils Sediments*, 9, 482-491.
- Khan, Z. H., Husain, T. Hejazi, R. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.*, 71, 95-122.
- Kielak, A., Pijl, A. S., van Veen, J. A. Kowalchuk, G. A. (2008). Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 63, 372-382.
- Kim, E. J., Oh, J. E. Chang, Y. S. (2003). Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD/Fs and PAHs in soil. *The Science of the Total Environment*, 311, 177-189.
- Kim, J. M., Le, N. T., Chung, B. S., Park, J. H., Bae, J.-W., Madsen, E. L. Jeon, C. O. (2008). Influence of soil components on the biodegradation of benzene, toluene, ethylene, and o-, m-, and p-xylenes by the newly isolated bacterium *Pseudomonas spadix* BD-a59. *Appl Environ Microbiol*, 74, 7313-7320.
- Kim, S.-J., Kweon, O. Cerniglia, C. E. (2009). Proteomic applications to elucidate bacterial aromatic hydrocarbon metabolic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.*, 12, 301-309.
- Kim, S.-J., Kweon, O., Jones, R. C., Freeman, J. P., Edmondson, R. D. Cerniglia, C. E. (2007). Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbbalenii* PYR-1 based on systems biology. *J. Bacteriol.*, 189, 464-472.
- Kim, Y.-J. Osako, M. (2003). Leaching characteristic of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from spiked sandy soil. *Chemosphere*, 51, 387-395.
- Kirso, U. Irha, N. (1998). Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotox. Environ. Safe.*, 41, 83-89.
- Kiyohara, H. Nagao, K. (1978). The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 105, 69-75.
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R. Schmidt, T. M. (2001). rrndb : the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research*, 29, 181-184.
- Kleinow, K. M., James, M. O., Tong, Z. Venugopalan, C. S. (1998). Bioavailability and biotransformation of benzo(a)pyrene in an isolated perfused *in situ* catfish intestinal preparation. *Environ. Health Persp.*, 106, 155-166.

- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46, 43-70.
- Kosheleva, I. A., Balashova, N. V., Izmalkova, T. Y., Filonov, A. E., Sokolov, S. L., Slepenn'hin, A. V. Boronin, A. M. (2000). Degradation of phenanthrene by mutant naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* strains. *Microbiology*, 69, 663-669.
- Kottler, B. D. Alexander, M. (2001). Relationship of properties of polycyclic aromatic hydrocarbons to sequestration in soil. *Environ. Pollut.*, 113, 293-298.
- Kowalchuk, G. A., Buma, D. S., de Boer, W., Klinkhamer, P. G. L. van Veen, J. A. (2002). Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 509-520.
- Kozdroj, J. van Elsas, J. D. (2000). Response of bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 1405-1417.
- Krafczyk, I., Trolldenier, G. Beringer, H. (1984). Soluble root exudates of maize : influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, 16, 315-322.
- Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J. C. Jouanneau, Y. (2003). Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium sp.* Strain 6PY1 : Evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *J. Bacteriol.*, 185, 3828-3841.
- Kroer, N., Barkay, T., Sorensen, S. Weber, D. (1998). Effect of root exudates and bacterial metabolic activity on conjugal gene transfer in the rhizosphere of a marsh plant. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 25, 375-384.
- Kuchenbuch, R. Jungk, A. (1982). A method for determining concentration profiles at the soil-root interface by thin slicing rhizospheric soils. *Plant Soil*, 68, 391-394.
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Bloemberg, G. V. Lugtenberg, B. J. J. (2004). Rhizoremediation : a beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe In.*, 17, 6-15.
- Kurkela, S., Lehvaslaiho, H., Palva, E. Teeri, T. (1988). Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. *Gene*, 73, 355-362.
- Kuzyakov, Y. (2006). Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biol. Biochem.*, 38, 425-448.
- Kuzyakov, Y. Bol, R. (2005). Three sources of CO₂ efflux from soil partitioned by ¹³C natural abundance in an incubation study. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 19, 1417-1423.
- Kuzyakov, Y. Cheng, W. (2001). Photosynthesis controls of rhizosphere respiration and organic matter decomposition. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 1915-1925.
- Kuzyakov, Y., Ehrensberger, H. Stahr, K. (2001). Carbon partitioning and below-ground translocation by *Lolium perenne*. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 61-74.
- Kuzyakov, Y., Leinweber, P., Saprionov, D. Eckhardt, K.-U. (2003). Qualitative assessment of rhizodeposits in non-sterile soil by analytical pyrolysis. *J. Plant Nutr. Sci*, 166, 719-723.

- Kuzyakov, Y. Siniakina, S. V. (2001). A novel method for separating root-derived organic compounds from root respiration in non-sterilized soils. *J. Plant Nutr. SC*, 164, 511-517.
- La Rosa, G., De Carolis, E., Sali, M., Papacchini, M., Riccardi, C., Mansi, A., Paba, E., Alquati, C., Bestetti, G. Muscillo, M. (2006). Genetic diversity of bacterial strains isolated from soils, contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, by 16S rRNA gene sequencing and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Microbiol. Res.*, 161, 150 - 157.
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., Garcia-Valdès, E. Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 510-547.
- Larkin, M. J., Allen, C. C. R., Kulakov, L. A. Lipscomb, D. A. (1999). Purification and characterisation of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. Strain NCIMB12038. *J. Bacteriol.*, 181, 6200-6204.
- Laurie, A. D. Lloyd-Jones, G. (1999). The phn genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *J. Bacteriol.*, 181, 531-540.
- Leglize, P., Saada, A., Berthelin, J. Leyval, C. (2008). Adsorption of phenanthrene on activated carbon increases mineralization rate by specific bacteria. *J. Hazard. Mater.*, 151, 339-347.
- Leppanen, M. T. Kukkonen, J. V. K. (2006). Evaluating the role of desorption in bioavailability of sediment-associated contaminants using oligochaetes, semipermeable membrane devices and Tenax extraction. *Environ. Pollut.*, 140, 150-163.
- Lessner, D. J., Johnson, G. R., Parales, R. E., Spain, J. C. Gibson, D. T. (2002). Molecular characterization and substrate specificity of nitrobenzene dioxygenase from *Comamonas* sp. Strain JS765. *Appl Environ Microbiol*, 68, 634-641.
- Liebeg, E. W. Cutright, T. J. (1999). The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 44, 55-64.
- Ligocki, M. P. Pankow, J. F. (1989). Measurements of the gas/particulate distributions of atmospheric organic compounds. *Environ Sci Technol*, 23, 75-83.
- Lin, C. H., Huang, X., Kolbanovskii, A., Hingerty, B. E., Amin, S., Broyde, S., Geacintov, N. E. Patel, D. J. (2001). Molecular topology of polycyclic aromatic carcinogens determines DNA adduct conformation: a link to tumorigenic activity. *J. Mol. Biol.*, 306, 1059-1080.
- Lindhal, V. Bakken, L. R. (1995). Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 16, 135-142.
- Lipton, D. S., Blanchar, R. W. Blevins, D. G. (1987). Citrate, maltate, and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Soil*, 85, 315-317.
- Liste, H. H. Alexander, M. (2000). Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere*, 40, 11-14.
- Liste, H. H. Alexander, M. (2002). Butanol extraction to predict bioavailability of PHAs in soil. *Chemosphere*, 46, 1011-1017.

- Liste, H. H., Prutz, I. (2006). Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere*, 62, 1411-1420.
- Liu, H., Weisman, D., Ye, Y.-B., Cui, B., Huang, Y.-H., Colon-Carmona, A., Wang, Z.-H. (2009). An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.*, 176.
- Lloyd-Jones, G., Laurie, A. D., Hunter, D. W. F., Fraser, R. (1999). Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 29, 69-79.
- Lohmann, R., MacFarlane, J. K., Gschwend, P. M. (2005). Importance of black carbon to sorption of native PAHs, PCBs and PCDDs in Boston and New York harbor sediments. *Environ Sci Technol*, 39, 141-148.
- Lopez, Z., Vila, J., Grifoll, M. (2005). Metabolism of fluoranthene by mycobacterial strains isolated by their ability to grow in fluoranthene or pyrene. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 32, 455-464.
- Luo, L., Zhang, S., Ma, Y. (2008). Evaluation of impacts of soils fractions on phenanthrene sorption. *Chemosphere*, 72, 891-896.
- Luo, L., Zhang, S., Shan, X.-Q., Zhu, Y.-G. (2006). Oxalate and root exudates enhance the desorption of p,p'-DDT from soils. *Chemosphere*, 63, 1273-1279.
- Luthy, R., Aiken, G. R., Brusseau, M. L., Cunningham, S. D., Gschwend, P. M., Pignatello, J. J., Reinhard, M., Traina, S. J., Weber, W. J., Westall, J. C. (1997). Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environ Sci Technol*, 31, 3341-3347.
- Lynch, J. M., Whipps, J. M. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil*, 129, 1-10.
- Macleod, C. J. A., Semple, K. T. (2003). Sequential extraction of low concentrations of pyrene and formation of non-extractable residues in sterile and non-sterile soils. *Soil Biol. Biochem.*, 35, 1443-1450.
- Macrae, J. D., Hall, K. J. (1998). Comparison of methods used to determine the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment. *Environ Sci Technol*, 32, 3809-3815.
- Mahmood, S., Paton, G. I., Prosser, J. I. (2005). Cultivation-independent *in situ* molecular analysis of bacteria involved in degradation of pentachlorophenol in soil. *Environ Microbiol*, 7, 1349-1360.
- Maliszewka-Kordybach, B., Klimkiewicz-Pawlas, A., Smreczak, B., Janusauskaite, D. (2007). Ecotoxic effect of phenanthrene on nitrifying bacteria in soils of different properties. *J. Environ. Qual.*, 36, 1635-1645.
- Mandalakis, M., Gustafsson, Ö., Alsberg, T., Egebäck, A. L., Reddy, C., Xu, L., Klanova, J., Holoubek, I., Stephanou, E. G. (2005). Contribution of biomass burning to atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons at three European background sites. *Environ Sci Technol*, 39, 2976-2982.
- Marlowe, E. M., Wang, J.-M., Pepper, I. L., Maier, R. M. (2002). Application of a reverse transcription-PCR assay to monitor regulation of the catabolic nahAc gene during phenanthrene degradation. *Biodegradation*, 13, 251-260.

- Marques, S., Aranda-Olmedo, I. Ramos, J. (2006). Controlling bacterial physiology for optimal expression of gene reporter constructs. *Curr. Opin. Biotech.*, 17, 50-56.
- Marschner, P., Grierson, P. F. Rengel, Z. (2005). Microbial community composition and functioning in the rhizosphere of three *Banksia* species in native woodland in Western Australia. *Applied Soil Ecology*, 28, 191-201.
- Marsili, L., Caruso, A., Fossi, M. C., Zanardelli, M., Politi, E. Focardi, S. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in subcutaneous biopsies of Mediterranean cetaceans. *Chemosphere*, 44.
- Meharg, A. A. Killham, K. (1990). Carbon distribution within the plant and rhizosphere in laboratory and field-grown *Lolium perenne* at different stages of development. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 471-477.
- Meharg, A. A. Killham, K. (1995). Loss of exudates from the roots of perennial raygrass inoculated with a range of micro-organisms. *Plant Soil*, 170, 345-349.
- Mendum, T. A., Sockett, R. E. Hirsch, P. R. (1998). The detection of Gram-negative bacterial mRNA from soil by RT-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.*, 164, 369-373.
- Miller, M. M., Wasik, S. P., Huang, G. L., Shiu, W. Y. Mackay, D. (1985). Relationships between Octanol-Water partition coefficient and aqueous solubility. *Environ Sci Technol*, 19, 522-529.
- Mingji, X., Chongling, Y., Jing, Y. Lily, W. (2009). Impact of phenanthrene on organic acids secretion accumulation by perennial ryegrass, *Lolium perenne* L., root. *B. Environ. Contam. Tox.*, 83, 75-80.
- Miya, R. K. Firestone, M. K. (2001). Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *J. Environ. Qual.*, 30, 1911-1918.
- Molina, M., Gonzalez, F., Bautista, L., Sanz, R., Simarro, R., Sanchez, I. Sanz, J. (2009). Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation*, 20, 789-800.
- Monserie, M.-F., Watteau, F., Villemin, G., Ouvrard, S. Morel, J. L. (2009). Technosol genesis: identification of organo-mineral association in a young Technosol derived from coking plant waste materials. *J. Soils Sediments*.
- Moody, J. D., Freeman, J. P., Doerge, D. R. Cerniglia, C. E. (2001). Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol*, 67, 1476-1483.
- Moody, J. D., Freeman, J. P., Fu, P. P. Cerniglia, C. E. (2004). Degradation of benzo(a)pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl Environ Microbiol*, 70, 340-345.
- Morel, J. L., Habib, L., Plantureux, S. Guckert, A. (1991). Influence of maize root mucilage on soil aggregate stability. *Plant Soil*, 136, 111-119.
- Moser, R. Stahl, U. (2001). Insights into the genetic diversity of initial dioxygenases from PAH-degrading bacteria. *Appl. Microbiol. Biot.*, 55, 609-618.
- Mueller, J. G., Devereux, R., Santavy, D. L., Lantz, S. E., Willis, S. G. Pritchard, P. H. (1997). Phylogenetic and physiological comparisons of degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71, 329-343.

- Muratova, A., Golubev, S., Wittenmayer, L., Dmitrieva, T., Bondarenkova, A., Hirche, F., Merbach, W. Turkovskaya, O. (2009 a). Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Environ. Exp. Bot.*, 66, 519-521.
- Muratova, A., Pozdnyakova, N., Golubev, S., Wittenmayer, L., Makarov, O., Merbach, W. Turkovskaya, O. (2009 b). Oxidoreductase activity of sorghum root exudates in a phenanthrene-contaminated environment. *Chemosphere*, 74, 1031-1036.
- Muratova, A. Y., Turkovskaya, O. V., Hubner, T. Kusch, P. (2003). Studies of efficacy of Alfalfa and Reed in the phytoremediation of hydrocarbon-polluted soil. *Applied Biochem Micro+*, 39, 599-605.
- Nanny, M. A. Maza, J. P. (2001). Noncovalent interactions between monoaromatic compounds and dissolved humic acids : A deuterium NMR T1 relaxation study. *Environ Sci Technol*, 35, 379-384.
- Nardi, S., Concheri, G., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R. Parvoli, G. (2000). Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere*, 41, 653-658.
- Nayak, A. S., Vijaykumar, M. H. Karegoudar, T. B. (2009). Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 73-79.
- Neufeld, J. D., Vohra, J., Dumont, M. G., Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M. W. Murrell, J. L. (2007). DNA stable-isotope probing. *Nature protocols*, 2, 860-866.
- Neumann, G. Romheld, V. (1999). Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil*, 211, 121-130.
- Neumann, G. Romheld, V. (2000). The release of root exudates as affected by the plant physiological status; In *The rhizosphere : biochemistry and organic substances at soil-plant interface*, Marcel Dekker New York/Basel 424p.
- Nguyen, C. (2003). Rhizodeposition of organic C by plants : mecanismes and controls. *Agronomie*, 23, 375-396.
- Ni Chadhain, S. M., Norman, R. S., Pesce, K. V., Kukor, J. J. Zylstra, G. J. (2006). Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Appl Environ Microbiol*, 72, 4078-4087.
- Nichols, T. D., Wolf, D. C., Rogers, H. B., Beyrouy, C. A. Reynolds, C. M. (1997). Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. *Water Air Soil Poll.*, 95, 165-178.
- Norini, M.-P. (2007). Ecodynamique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitements par biopile et par désorption thermique : Influence de la rhizosphère et de la mycorrhization. Thèse de doctorat en Géosciences, Université Henri Poincaré, Nancy 1, 243 p.
- Odenchantz, J. E., Varljen, M. D. Vogl, R. A. (2002). Natural attenuation : Is dilution the solution? *LUSTline*, 40, 8-12.

- Ogunseitan, O. A., Delgado, I. L., Tsai, Y. L. Olson, B. H. (1991). Effect of 2-hydroxybenzoate on the maintenance of naphthalene-degrading Pseudomonads in seeded and unseeded soil. *Appl Environ Microbiol*, 57, 2873-2879.
- Olivares, F. L., Baldani, V. L. D., Reis, V. M., Baldani, J. I. Dobereiner, J. (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biol. Fert. Soils*, 21, 197-200.
- Ouvrard, S., Lapole, D. Morel, J. L. (2006). Root exudates impact on phenanthrene availability. *Water Air Soil Poll.*, 6, 343-352.
- Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and biosphere. *Science*, 276, 734-740.
- Palmroth, M. R. T., Koskinen, P. E. P., Kaksonen, A. H., Munster, U., Pichtel, J. Puhakka, J. A. (2007). Metabolic and phylogenetic analysis of microbial communities during phytoremediation of soil contaminated with weathered hydrocarbons and heavy metals. *Biodegradation*, 18, 769-782.
- Parales, J. V., Kumar, A., Parales, R. E. Gibson, D. T. (1996). Cloning and sequencing of the genes encoding 2-nitrotoluene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. JS42. *Gene*, 181, 57-61.
- Park, H. H., Lee, H. Y., Lim, W. K. Shin, H. J. (2005). NahR : effet of replacements at Asn 169 and Arg 248 on promoter binding and inducer recognition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 434, 67-74.
- Park, J.-W. Crowley, D. E. (2006). Dynamic changes in nahAc gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biot.*, 72, 1322-1329.
- Parrish, Z. D., Banks, M. K. Schwab, A. P. (2005). Assessment of contaminant lability during phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil. *Environ. Pollut.*, 137, 187-197.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.*, 24, 255-265.
- Pfeifer, G. P., Denissenko, M. F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S. S. Hainault, P. (2002). Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*, 21, 7435-7451.
- Pierce, R. C. Katz, M. (1975). Dependency of polynuclear aromatic hydrocarbon content on size distribution of atmospheric aerosols. *Environ Sci Technol*, 9, 347-353.
- Pignatello, J. J. Xing, B. (1996). Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ Sci Technol*, 32, 1-11.
- Potin, O., Rafin, C. Veignie, E. (2004 a). Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 54, 45-52.
- Potin, O., Veignie, E. Rafin, C. (2004 b). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 51, 71-78.
- Ran, Y., Sun, K., Yang, Y., Xing, B. Zeng, E. (2007). Strong sorption of phenanthrene by condensed organic matter in soils and sediments. *Environ Sci Technol*, 41.

- Rehmann, K., Hertkorn, N. Kettrup, A. A. (2001). Fluorethene metabolism in *Mycobacterium sp.* strain KR20 : identity of pathway intermediates during degradation and growth. *Microbiology*, 147, 2783-2794.
- Reid, B., Jones, K. C. Semple, K. T. (2000). Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments : a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution*, 108, 103-112.
- Reid, B., Stokes, J. D., Jones, K. C. Semple, K. T. (2004). Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the extraction and biodegradation of phenanthrene in soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 550-556.
- Reid, B. J., Stokes, J. D., Jones, K. C. Semple, K. T. (2000). Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. *Environ Sci Technol*, 34, 3174-3179.
- Rengel, Z. (2002). Genetic control of root exudation. *Plant Soil*, 245, 2002.
- Rentz, J. A., Alvarez, P. J. J. Schnoor, J. L. (2005). Benzo(a)pyrene co-metabolism in the presence of plant root exudates : Implications for phytoremediation. *Environ. Pollut.*, 136, 477-484.
- Rentz, J. A., Alvarez, P. J. J. Schnoor, J. L. (2008). Benzo(a)pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environ. Pollut.*, 151, 669-677.
- Rentz, J. A., Alvarez, P. J. J. Schnoor, J. L. (2004). Repression of *Pseudomonas putida* phenanthrene-degrading activity by plant root extracts and exudates. *Environ Microbiol*, 6, 574-583.
- Resnick, S. M., Lee, K. Gibson, D. T. (1996). Diverse reactions catalysed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas sp* strain 9816. *J. Ind. Microbiol.*, 17, 438-457.
- Rhee, S.-K., Liu, X., Wu, L., Chong, S. C., Wan, X. Zhou, J. (2004). Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-Mer oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol*, 70, 4303-4317.
- Riffaldi, R. Schnitzer, M. (1972). Electron spin resonance spectrometry of humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 36, 301-305.
- Rivas, J., Gimeno, O., de la Galle, R., Portela, J. R. Martinez de la Ossa, E. (2009). Remediation of PAH spiked soils : Concentration H₂O₂ treatment/continuous hot water extraction-oxidation. *J. Hazard. Mater.*, 168, 1359-1365.
- Robertson, L. A. Kuenen, J. G. (2006). The genus *Thiobacillus*. *Prokaryotes*, 5, 812-827.
- Rockne, K. J., Chee-Sanford, J. C., Sanford, R. A., Hedlund, B. P., Staley, J. T. Strand, S. E. (2000). Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure culture under nitrate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol*, 66, 1595-1601.
- Roling, W. F. M., Milner, M. G., Jones, D. M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R. J. P. Head, I. M. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol*, 68, 5537-5548.
- Romine, M. F., Stillwell, L. C., Wong, K.-K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K. Saffer, J. (1999). Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.*, 181, 1585-1602.

- Rothermich, M. M., Hayes, L. A. Lovley, D. R. (2002). Anaerobic, sulfate-dependent degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated harbor sediment. *Environ Sci Technol*, 36, 4811-4817.
- Rovira, A. D. (1956). Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. I. The nature of root exudate from oats and peas. *Plant Soil*, VII, 178-194.
- Rovira, A. D. (1969). Plant root exudates. *The Botanical Review*, 35, 35-57.
- Rui, L., Kwon, Y. M., Fishman, A., Reardon, K. F. Wood, T. K. (2004). Saturation mutagenesis of toluene ortho-monooxygenase of *Burkholderia capacia* G4 for enhanced 1-naphthol synthesis and chloroform degradation. *Appl Environ Microbiol*, 70, 3246-3252.
- Rutherford, D. W., Chiou, C. T. Kile, D. E. (1994). Influence of soil organic matter composition on the partition of organic compounds. *Environ Sci Technol*, 26, 336-340.
- Salloum, M. J., Chefetz, B. Hatcher, P. G. (2002). Phenanthrene sorption by aliphatic-rich natural organic matter. *Environ Sci Technol*, 35, 1953-1958.
- Sanders, G., Jones, K. C., Hamilton-Taylor, J. Dorr, H. (1995). PCB and PAH fluxes to a dated UK peat core. *Environ. Pollut.*, 89, 17-25.
- Sandrin, T. R., Kight, W. B., Maier, W. J. Maier, R. M. (2006). Influence of a nonaqueous phase liquid (NAPL) on biodegradation of phenanthrene. *Biodegradation*, 17, 423-435.
- Sanguin, H., Remenant, B., Dechesne, A., Thioulouse, J., Vogel, T. M., Nesme, X., Moenne-Loccoz, Y. Grundmann, G. L. (2006). Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium spp.* and bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 72, 4302-4312.
- Saparrat, M. C. N., Guillen, F., Arambarri, A. M., Martinez, A. T. Martinez, M. J. (2002). Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl Environ Microbiol*, 68, 1534-1540.
- Sas, L., Rengel, Z. Tang, C. (2001). Excess cation uptake, and extrusion of protons and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorous deficiency. *Plant Sci.*, 160, 1191-1198.
- Schaller, G. (1987). pH changes in the rhizosphere in relation to the pH-buffering soils. *Plant Soil*, 97, 439-444.
- Schauer, J. J., Rogge, W. F. Hildemann, L. M. (1996). Source apportionment of airborne particulate matter using organic compounds as tracers. *Atmospheric Environment*, 30, 3837-3855.
- Schell, M. A. Wender, P. E. (1986). Identification of the nahR gene product and nucleotide sequences required for its activation of the sal operon. *J. Bacteriol.*, 166, 9-14.
- Schlichting, A. Leinweber, P. (2009). New evidence for the molecular-chemical diversity of potato plant rhizodeposits obtained by pyrolysis-field ionisation mass spectrometry. *Phytochem. Analysis*, 20, 1-13.

- Schmidt, M. W. L. Noack, A. G. (2000). Black carbon in soils and sediments: Analysis, distribution, implications, and current challenges. *Global biogeochemical cycles*, 14, 777-793.
- Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W. Warshawsky, D. (1996). Degradation of pyrene, benzo(a)anthracene, and benzo(a)pyrene by *Mycobacterium sp.* RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl Environ Microbiol*, 62, 13-19.
- Schnitzer, M. (1969). Reactions between fluvic acid, a soil humic compound and inorganic soil constituents. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 33, 75-81.
- Semenov, A. M., van Bruggen, A. H. C. Zelenev, V. V. (1999). Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat. *Microbial Ecol.*, 37, 116-128.
- Semple, K. T., Cain, R. B. Schmidt, S. (1999). Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170, 291-300.
- Semple, K. T., Morriss, A. W. J. Paton, G. I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils : fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur. J. Soil Sci.*, 54, 809-818.
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Hu, Y., Lee, S.-E. Li, Q. X. (2006). Phenanthrene degradation in *Arthrobacter sp.* P1-1 : Initial 1,2-, 3,4- and 9,10-dioxygenation, and meta- and ortho-cleavages of naphthalene-1,2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids. *Chemosphere*, 65, 2388-2394.
- Shamsuzzaman, K. M. Barnslez, E. A. (1974). The regulation of naphthalene oxygenase in *Pseudomonas*. *J. Gen. Microbiol.*, 83, 165-170.
- Sharma, H., Jain, V. K. Khan, Z. H. (2007). Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urban environment of Delhi. *Chemosphere*, 66, 302-310.
- Shen, H., Yan, X., Zhao, M., Zheng, S. Wang, X. (2002). Exudation of organic acids in common bean as related to mobilization of aluminum- and iron-bound phosphates. *Environ. Exp. Bot.*, 48, 1-9.
- Sheng, X., Chen, X. He, L. (2008). Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter sp.* 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 88-95.
- Shou, M., Krausz, K. W., Gonzalez, F. J. Gelboin, H. V. (1996). Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo(a,h)pyrene by human recombinant cytochromes P450, lung and liver microsomes. *Carcinogenesis*, 17, 2429-2433.
- Siciliano, S. D. Germida, J. J. (1998). Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environmental Reviews*, 6, 65-79.
- Siciliano, S. D., Germida, J. J., Banks, M. K. Greer, C. W. (2003). Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Appl Environ Microbiol*, 69, 483-489.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M. Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, 59, 201-222.

- Singer, A. C., van der Gast, C. J. Thompson, I. P. (2005). Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol.*, 23, 74-77.
- Singleton, D. R., Powell, S. N., Sangaiah, R., Gold, A., Ball, L. M. Aitken, M. D. (2005). Stable-isotope probing of bacteria capable of degrading salicylate naphthalene, or phenanthrene in a bioreactor treating contaminated soil. *Appl Environ Microbiol*, 71, 1202-1209.
- Sinyakina, S. V. Kuzyakov, Y. (2002). The ¹⁴C tracer study of carbon turnover in soil in a model experiment. *Eurasian Soil Sci*, 35, 1287-1295.
- Slater, T. F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry Journal*, 222, 1-15.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H. Berg, G. (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial community studied by denaturing gradient gel electrophoresis : Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol*, 67, 4742-4751.
- Smith, M. J., Flowers, T. H., Duncan, H. J. Alder, J. (2006). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil aged PAHs residues. *Environ. Pollut.*, 141, 519-525.
- Smreczak, B., Maliszewka-Kordybach, B., Klimkowicz-Pawlas, A. (2008). Assessing the bioavailability of phenanthrene to soil microorganisms using the Tenax extraction method. *Environ. Geochem. Hlth*, 30, 183-186.
- Soclo, H. N., Garrigues, P. Ewald, M. (2000). Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas . *Mar. Pollut. Bull.*, 40, 387-396.
- Steer, J. Harris, J. A. (2000). Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 869-878.
- Stehr, J., Muller, T., Svensson, K., Kamnerdpetch, C. Scheper, T. (2001). Basic examination on chemical pre-oxidation by ozone for enhancing bioremediation of phenanthrene contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biot.*, 57, 803-809.
- Stokes, J. D., Wilkinson, A., Reid, B. J., Jones, K. C. Semple, K. T. (2005). Prediction of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in contaminated soils using an aqueous hydroxypropyl-B-cyclodextrin extraction technique. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, 1325-1330.
- Stolz, A. (2009). Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl. Microbiol. Biot.*, 81, 793-811.
- Straube, W. L. N., Hansen, C. C., Ringleberg, L. D., Pritchard, P. H. Jones-Meehan, J. (2003). Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarminig with biostimulation and bioaugmentation. *Acta Biotechnology*, 23, 179-196.
- Stringfellow, W. T. Aitken, M. D. (1995). Competitive metabolism of naphthalene, methyl-naphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading *Pseudomonas*. *Appl Environ Microbiol*, 61, 357-362.

- Stuart-Keil, K. G., Hohnstock, A. M., Drees, K. P., Herrick, J. B. Madsen, E. L. (1998). Plasmids responsible for horizontal transfer of naphthalene catabolism genes between bacteria at a coal tar-contaminated site are homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 Appl Environ Microbiol, 64, 3633-3640.
- Stubner, S. (2004). Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. J. Microbiol. Meth., 57, 219-230.
- Suen, W.-C., Haigler, B. E. Spain, J. C. (1996). 2,4-dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia sp.* strain DNT : Similarity to Naphtalene dioxygenase. J. Bacteriol., 178, 4926-4934.
- Supaka, N., Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Omori, T. Juntongjin, K. (2001). Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas sp.* strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism. ScienceAsia, 27, 21-28.
- Swindell, A. L. Reid, B. (2006). Comparison of selected non-exhaustive extraction techniques to assess PAH availability in dissimilar soils. Chemosphere, 62, 1126-1134.
- Szeliga, J. Dipple, A. (1998). DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. Chemical Research in Toxicology, 11.
- Takizawa, N., Iida, T., Sawada, T., Yamauchi, K., Wang, Y.-W., Fukuda, M. Kiyohara, H. (1999). Nucleotide sequences and characterisation of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* Pak1 and *Pseudomonas putida* OUS82. J. Biosci. Bioeng., 87, 721-731.
- Tapiainen, T., Järvinen, K., Pääkkö, P., Bjelogrić, N. Vähäkangas, K. (1996). TPA decreases the p53 response to benzo(a)pyrene-DNA adducts in vivo in mouse skin. Carcinogenesis, 17, 1377-1380.
- Thiele-Bruhn, S. Brummer, G. W. (2004). Fractionated extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from polluted soils : estimation of PAH fraction degradable through bioremediation. Eur. J. Soil Sci., 55, 567-578.
- Thomas, J. M., Yordy, J. R., Amador, J. A. Alexander, M. (1986). Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. Appl Environ Microbiol, 52, 290-296.
- Thompson, J. P., Higgins, G. D. Gibson, D. T. (1994). CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680.
- Toledo, F. L., Calvo, C., Rodelas, B. Gonzales-Lopez. (2006). Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. Systematic and Applied Microbiology, 29, 244-252.
- Treccani, V., Walker, N. Wiltshire, G. H. (1954). The metabolism of naphthalene by soil bacteria. J. Gen. Microbiol., 11, 841-848.
- Ueda, K., Tagami, Y., Kamihara, Y., Shiratori, H., Takano, H. Beppu, T. (2008). Isolation of bacteria whose growth is dependent on high levels of CO₂ and implications of their potential diversity. Appl Environ Microbiol, 74, 4535-4538.

- Vacca, D. J., Bleam, W. F. Hickey, W. J. (2005). Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic Acid-sorbed phenanthrene. *Appl Environ Microbiol*, 71, 3797-3805.
- van Noort, P. C. M. Wondergem, E. (1985). Scavenging of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons by rain. *Environ Sci Technol*, 19, 1044-1048.
- van Veen, J., van Overbeek, L. S. van Elsas, J. D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 61, 121-135.
- Vancura, V. Hovadik, A. (1965). Root exudates of plants II. Composition of root exudates of some vegetables. *Plant Soil*, XXII, 21-32.
- Veignie, E., Rafin, C., Woisel, P. Cazier, F. (2004). Preliminary evidence of the role of hydrogen peroxide in the degradation of benzo(a)pyrene by a non-white rot fungus *Fusarium solani*. *Environ. Pollut.*, 129, 1-4.
- Verdin, A., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Fontaine, J., Grandmougin-Ferjani, A. Durand, R. (2006). Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza*, 16, 397-405.
- Vinas, M., Sabaté, J., Espuny, M. J. Solanas, A. M. (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of Heavily creosote-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol*, 71, 7008-7018.
- Volkering, F., Breure, A. M., Sterkenburg, A. van Andel, J. G. (1992). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons : effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl. Microbiol. Biot.*, 36, 548-552.
- Wang, K. Xing, B. (2005). Structural and sorption characteristics of adsorbed humic acid on clay minerals. *J. Environ. Qual.*, 34, 342-349.
- Wang, P. Zhou, R. (2006). Determination of organic acids exuded from plant roots by high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*, 24, 239-242.
- Wang, X. Brusseau, M. L. (1995). Cyclopentanol-enhanced solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by cyclodextrins. *Environ Sci Technol*, 29, 2346-2351.
- Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., LaDow, K. Schneider, J. (1995). Biotransformation of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chemico-Biological Interactions*, 97, 131-148.
- Wenzel, W. W. (2008). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil*, 321, 385-408.
- Wenzel, W. W., Wieshammer, G., Fitz, W. J. Puschenreiter, M. (2001). Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. *Plant Soil*, 237, 37-45.

- White, J. C., Incorvia Mattina, M., Lee, W.-Y., Eitzer, B. D. Iannucci-Berger, W. (2003). Role of organic acids in enhancing the desorption and uptake of weathered p,p'-DDE by *Cucurbita pepo*. *Environmental Pollution*, 124, 71-80.
- Wick, L. Y., de Munain, A. R., Sprngael, D. Harms, H. (2002). Responses of *Mycobacterium sp.* LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Appl. Microbiol. Biot.*, 58, 378-385.
- Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshda, T., Habe, H. Omori, T. (2001). Quantification of the carbazole 1,9a-dioxygenase gene by real-time competitive PCR combined with co-extraction of internal standards. *FEMS Microbiol. Lett.*, 202, 51-57.
- Wijnja, H., Pignatello, J. J. Malekani, K. (2004). Formation of π - π complexes between phenanthrene and model π -acceptor humic subunits. *J. Environ. Qual.*, 33, 265-275.
- Wilcke, W., Zech, W. Kobza, J. (1996). PAH-pools in soils along a PAH-deposition gradient. *Environ. Pollut.*, 92, 307-313.
- Wilson, M. S., Herrick, J. B., Jeon, C. O., Hinman, D. E. Madsen, E. L. (2003). Horizontal transfer of phnAc dioxygenase genes within one of two phenotypically and genotypically distinctive naphthalene-degrading guilds from adjacent soil environments. *Appl Environ Microbiol*, 69, 2172-2181.
- Wodzinski, R. S. Bertolini, D. (1972). Physical state in which naphthalene and bibenzyl are utilized by bacteria. *Applied Microbiology*, 23, 1077-1081.
- Wodzinski, R. S. Coyle, J. E. (1974). Physical state of phenanthrene for utilisation by bacteria. *Applied Microbiology*, 27, 1081-1084.
- Woese, C. R., Kandler, O. Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms : Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4576-4579.
- Wornat, M. J., Ledesma, E. B. Sandrowitz, A. K. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons identified in soot extracts from domestic coal-burning stoves of Henan Province, China. *Environ Sci Technol*, 35, 1943-1952.
- Xing, B. Pignatello, J. J. (1997). Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinyl chloride) and soil organic matter. *Environ Sci Technol*, 31, 792-799.
- Xu, S. Y., Chen, Y. X., Wu, W. X., Wang, K. X., Lin, Q. Liang, X. Q. (2006). Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation. *Science of the Total Environment*, 363, 206-215.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V. Fredrickson, H. L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl Environ Microbiol*, 61, 1706-1713.
- Yang, Y., Ratté, D., Smets, B. F., Pignatello, J. J. Grasso, D. (2001). Mobilization of soil organic matter by complexing agent and implications for polycyclic aromatic hydrocarbon desorption. *Chemosphere*, 43, 1013-1021.

- Yen, K. M. Gunsalus, I. C. (1982). Plasmid gene organization : Naphthalene / salicylate oxidation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 79, 874-878.
- Yi, H. Crowley, D. E. (2007). Biostimulation of PAH degradation with plants containing high concentrations of linoleic acid. Environ Sci Technol, 41, 4382-4388.
- Yoshitomi, K. J. Shann, J. R. (2001). Corn (*Zea mays*, L.) root exudates and their impact on ¹⁴C-pyrene mineralization. Soil Biol. Biochem., 33, 1769-1776.
- You, I. S., Ghosal, D. Gunsalus, I. C. (1988). Nucleotide sequence of plasmid NAH7 gene nahR and DNA binding of the nahR product. J. Bacteriol., 170, 5409-5415.
- Young, C. C., Ho, M.-J., Arun, A. B., Chen, W.-M., Lai, W. A., Shen, F.-T., Rekha, P. D. Yassin, A. F. (2007). *Pseudoxanthomonas spadix* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. Int J Syst Evol Microbiol, 57, 1823-1827.
- Yunker, M. B. Macdonald, R. W. (2003). Alkane and PAH depositional history, sources and fluxes in sediments from the Fraser River Basin and Strait of Georgia, Canada. Organic Geochemistry, 34, 1429-1454.
- Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou, A. I. Drainas, C. (2004). Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. Appl Environ Microbiol, 65, 124-131.
- Zhang, J., He, M. Shi, Y. (2009). Comparative sorption of benzo(a)pyrene to different humic acids and humin in sediments. J. Hazard. Mater., 166, 802-809.
- Zuniga, M. C., Durham, D. R. Welch, R. A. (1981). Plasmid- and chromosome-mediated dissimilation of naphthalene and salicylate in *Pseudomonas putida* PMD-1. J. Bacteriol., 147, 836-843.
- Zylstra, G. J. Kim, E. J. (1997). Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. J. Ind. Microbiol. Biot., 19, 408-414.