



HAL
open science

Contamination atmosphérique par les hydrocarbures aromatiques polycycliques : toxicité et devenir du phénanthrène dans des systèmes sol-plante-microorganismes

Dorine Desalme

► **To cite this version:**

Dorine Desalme. Contamination atmosphérique par les hydrocarbures aromatiques polycycliques : toxicité et devenir du phénanthrène dans des systèmes sol-plante-microorganismes. Sciences agricoles. Université de Franche-Comté, 2011. Français. NNT : 2011BESA2007 . tel-00800328

HAL Id: tel-00800328

<https://theses.hal.science/tel-00800328>

Submitted on 13 Mar 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Contamination atmosphérique par les
Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)
Toxicité et devenir du phénanthrène dans des systèmes
sol-plante-microorganismes**

Présentée et soutenue publiquement par

Dorine DESALME

Le 22 juin 2011

Membres du jury :

Christian GAUVRIT (Directeur de Recherches, INRA Dijon).....Rapporteur
Corinne LEYVAL (Directeur de Recherches, CNRS, Nancy Universités).....Rapporteur
Damien CUNY (Professeur de l'université de Lille)Examineur
Thierry LEBEAU (Professeur, Université de Haute Alsace).....Examineur
Daniel GILBERT (Professeur, Université de Franche-Comté).....Directeur de thèse
Nadine BERNARD (Maître de Conférences, UFC).....Co-directrice de thèse
Philippe BINET (Maître de Conférences, UFC).....Co-directeur de thèse
Geneviève CHIAPUSIO (Maître de Conférences, UFC).....Co-directrice de thèse

Laboratoire Chrono-environnement (UMR CNRS/UFC 6249, Usc INRA)

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Daniel Gilbert, mon directeur de thèse, ainsi que Nadine Bernard, Geneviève Chiapusio et Philippe Binet, mes co-directeurs de thèse de m'avoir choisi pour mener ce travail de thèse. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance de m'avoir fait partager leur connaissances dans leurs domaines de compétences, pour leurs conseils, leur disponibilité et leur investissement dans ce travail de recherche et dans la relecture des articles et de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier Christian Gauvrit, Corinne Leyval, Thierry Lebeau et Damien Cuny qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie aussi le professeur Hervé Richard pour son accueil au sein du laboratoire Chrono-environnement (UMR CNRS/UFC 6249) et ses encouragements, ainsi que le Pays de Montbéliard Agglomération (PMA) pour son soutien financier.

Je remercie chaleureusement Marie-Laure Toussaint pour sa précieuse aide technique, méthodologique et pratique, ses multi-connaissances, son dynamisme et sa bonne humeur (c'est un peu notre Mac Gyver !).

J'adresse mes sincères remerciements aux scientifiques avec qui j'ai collaboré dans le cadre de ce travail de thèse, Tout d'abord à Jean-Claude Roy pour ce qu'une collaboration multi-disciplinaire apprend sur la définition des objectifs et des limites d'une étude. Mais on touche au but... Ensuite à Daniel Epron et à Caroline Plain pour l'intérêt et l'investissement qu'ils ont accordé à notre expérimentation. Cette collaboration a été très enrichissante et mon travail de thèse serait resté inachevé sans celle-ci.

J'exprime également mes remerciements à l'équipe pédagogique de l'UFR STGI de Montbéliard pour son accueil chaleureux pendant mon monitorat, en particulier Marielle Franchi pour son aide et ses encouragements pour mes TP. Un grand merci aussi à Ghislain Peter et Isabelle Gester pour leur disponibilité, leur assistance et leur professionnalisme.

Parmi toutes les personnes citées, je tiens à exprimer une spéciale dédicace aux « Montbéliardais » (aussi appelés world leaders) pour leur présence au quotidien durant toutes mes années de thèse. Merci à Geneviève, Philippe, Vincent et Marie-Laure pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur compréhension, pour les repas de midi animés qui permettaient de décompresser et de relativiser, pour les moments passés à l'extérieur, que cela soit en congrès ou juste au cours de diners improvisés. J'ai énormément appris scientifiquement, professionnellement, culturellement et humainement à vos côtés et je garde des souvenirs mémorables. Merci pour cette convivialité que j'ai peur de ne jamais retrouver ailleurs. A ce sujet, je souhaite leur exprimer mes sincères excuses pour mon humeur massacrant des 2 derniers mois... Désolée pour mon remake de *Kill Bill*.

Je remercie les doctorants et stagiaires avec qui j'ai partagé plus ou moins longtemps le bureau place Tharradin. : Mohammed Bouriou, Lucie Lovy, Karine Adamy « il est 16h ! », Floriane Bosh-Cano, Adeline Wall, Caroline Meyer, Quentin Tenailleau, Iftikhar Hussein « salud bonjour » et Satoshi Shimano « c'est fini ».

Aussi, je pense à Sandrine « Tornade Blanche » qui est restée fidèle au poste quotidiennement (« Bonsoir ! ») et qui s'assure que notre espace de travail reste propre agréable moyennant quelques désagréments du genre « bling !bling ! bling !», « je peux vous embeter ? Il faut que je passe la serpillière sous votre chaise » « et alors, cette thèse, ça avance ? ».

Enfin, rien n'aurait été possible sans la présence et le soutien de mon entourage proche qui a contribué à l'aboutissement de mon cursus universitaire, d'une manière ou d'une autre. Je tiens à remercier mes parents, mon frère Vince et La fée LiLi, pour leur soutien et le bonheur que me procure les moments passés en famille. Merci à Blam et Pol, et à mes couz' Luce, Stan et Ingrid d'être présents dans les bons comme dans les mauvais moments. Enfin, merci à ma poulette Hélène et à PJ qui s'étaient eux aussi embarqués dans la galère du doctorat! Et pour finir, merci à Julien, Dr of Roma University (private joke), qui a toujours cru en moi et a accepté mon choix de mettre 200 km de distance entre nous pendant ces années, même si ça n'a pas toujours été facile. Je te remercie d'avoir été si patient et de me supporter et de me soutenir depuis maintenant 10 ans.

Enfin, je remercie toutes les personnes que je n'ai pas citées ici mais qui ont contribué au bon déroulement de mon cursus universitaire à différentes étapes de sa réalisation et à sa finalisation tant attendue.

“ NaNaNana, NaNaNana, Hé-hé-hé, Goo-ood bye ! ”

Têtes à claques

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	1
Liste des tableaux	3
Liste des publications et des communications relatives aux travaux de thèse	5
1 Introduction générale.....	7
2 Synthèse bibliographique	11
2.1 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) 11	
2.1.1 Structures et propriétés chimiques	11
2.1.2 Emissions	12
2.1.3 Toxicité des HAP atmosphériques.....	14
2.1.4 Cycle global des HAP dans les écosystèmes terrestres.....	16
2.1.5 Réglementation	18
2.2 Devenir des HAP atmosphériques dans l'air 18	
2.2.1 Variation des concentrations en HAP dans l'air	18
2.2.2 Processus de dissipation.....	19
2.3 Comportement et devenir des HAP d'origine atmosphérique dans le sol 22	
2.3.1 Transport et séquestration	23
2.3.2 Dissipation	23
2.4 Devenir et effets des HAP atmosphériques dans les végétaux 25	
2.4.1 Voie racinaire.....	26
2.4.2 Voie foliaire	29
2.4.3 Effets biologiques et physiologiques des HAP atmosphériques sur les plantes.....	31
3 Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique	34
3.1 Présentation 34	
3.2 An exposure device to study atmospheric deposition of PAHs in environmental compartments: Development and validation in microcosms with phenanthrene 37	
3.2.1 Introduction.....	38
3.2.2 Materials and methods	40
3.2.3 Results.....	45
3.2.4 Discussion	49
4 Impact des dépôts atmosphériques de phénanthrène sur le potentiel mycorhizien du sol.....	52

4.1	Présentation	52
4.2	Infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in two agricultural soils affected by atmospheric deposition of phenanthrene	53
4.2.1	Introduction.....	54
4.2.2	Material and methods.....	55
4.2.3	Results.....	57
4.2.1	Discussion.....	60
4.2.2	Conclusions.....	64
5	Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur deux espèces prairiales et leurs symbiontes racinaires	65
5.1	Présentation	65
5.2	Atmospheric phenanthrene transfer and effects on two grassland species and their root symbionts: A microcosm study	66
5.2.1	Introduction.....	67
5.2.2	Materials and methods.....	68
5.2.3	Results.....	72
5.2.4	Discussion.....	75
5.2.5	Conclusion.....	77
6	Effets du phénanthrène atmosphérique sur l'allocation carbonée chez le trèfle	78
6.1	Présentation	78
6.2	Atmospheric phenanthrene pollution modulates carbon allocation in red clover (<i>Trifolium pratense</i> L.)	79
6.2.1	Introduction.....	80
6.2.2	Material and Methods.....	81
6.2.3	Results.....	86
6.2.4	Discussion.....	92
7	Discussion.....	95
7.1	Le dispositif de pollution atmosphérique	95
7.1.1	Méthode de calibration et applications possibles.....	95
7.1.2	Représentativité environnementale.....	96
7.2	Transfert du PHE atmosphérique dans le sol et les végétaux	97
7.2.1	Distribution des concentrations dans les compartiments.....	97
7.2.2	Application à la recherche de bio-indicateurs de pollution atmosphérique par le phénanthrène	99
7.3	Effets biologiques du PHE atmosphérique sur le microsysteme sol-plante-microorganismes	101
7.3.1	Effets sur la biomasse de la plante.....	101

7.3.2	Effet sur les symbiontes	102
7.3.3	Comparaison entre la voie d'exposition foliaire et racinaire	104
7.4	Effet de la pollution atmosphérique par le PHE sur les paramètres écophysiologicals de la plante	105
7.4.1	Effets sur la croissance.....	106
7.4.2	Effets sur l'allocation du carbone dans le système sol plante microorganismes.....	106
8	Conclusions et perspectives	109
9	Références bibliographiques	111

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Synthèse des méthodes utilisées.....	10
Figure 2-1: Formules chimiques des 16 HAP prioritaires et du coronène	11
Figure 2-2 : Expression de la toxicité chez les vertébrés.....	15
Figure 2-3 : Activation métabolique du Benzo(a)pyrène par le cytochrome P450.....	16
Figure 2-4 : Devenir des HAP dans les écosystèmes.....	17
Figure 2-5: Réactions chimiques des HAP dans l'atmosphère.....	20
Figure 2-6 : Schéma global du devenir des HAP dans les sols.....	22
Figure 2-7 : Schéma effet rhizosphère	25
Figure 2-8 : Les principales voies de prélèvement des molécules organiques par les plantes.....	26
Figure 2-9 : Relation entre le facteur de bioconcentration dans les racines (RCF) ou dans les parties aériennes (SCF) et le log K_{OW} des HAP.....	27
Figure 2-10 : Représentation schématique des mouvements, de la localisation et de la dégradation de l'anthracène et du phénanthrène dans les racines après 56 jours de culture dans du sable contaminé.....	28
Figure 2-11 : Diagramme schématique montrant la localisation du PHE dans les feuilles d'épinard (gauche) et de maïs (droite) après 12 jours d'exposition à une atmosphère contaminée par le PHE....	31
Figure 3-1 : Photographie présentant le dispositif d'exposition.....	34
Figure 3-2 : Schema of an exposure chamber (a) Side view; (b) Top view.....	42
Figure 3-3 : View of the meshing of the exposure chamber with the location of the 3 vertical lines (VL1, VL2, and VL3).....	43
Figure 3-4 : Velocity fields in a the vertical median plane containing VL2 obtained by (a) PIV; (b) CFD simulation.....	46
Figure 3-5 : Correlation between (a) the initial mass of PHE pills introduced into the evaporator (m_0 , mg) and inlet PHE concentrations in air ($\mu\text{g m}^{-3}$ air); (b) PAS measurements ($\mu\text{g sampler}^{-1}$) and the air concentrations; (c) PHE concentrations in soils ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) and PAS measurements	47
Figure 3-6 : Velocity fields in a vertical median plane containing VL2 obtained by CFD simulation.....	48
Figure 3-7 : Simulated PHE concentrations distribution (a) along 3 vertical lines (VL1, VL2, V3) and 2 time values (1 day, 14 days); (b) along the vertical line VL1 during 14 days.....	49
Figure 3-8 : Observed and simulated PAS measurements ($\mu\text{g PHE sampler}^{-1}$).....	50
Figure 4-1 : Mycorrhizal infectivity of the soils: mycorrhizal colonization of leek plants (% of colonized plants) grown during 4 weeks on increasing concentrations of soils previously exposed during 2 weeks to ambient air (C) or PHE-enriched air (P1, P2)	60
Figure 4-2 : Relationship between PHE concentration in soils and root lengths (a), shoot biomasses (b) , and the most probable number of viable propagule (MPN) (c).....	61

Figure 4-3 : Multiple factor analysis of the MPN of propagules and environmental data sets (soil, depth and plant).....	62
Figure 5-1 : The experimental PHE atmospheric exposure device.....	69
Figure 5-2 : Biomasses and surface leaf areas of red clover (A) and ryegrass (B) after one month of exposure to ambient air (control) or to atmospheric PHE (polluted).....	74
Figure 6-1 : Kinetics of the fraction of ¹³ C label recovered (FLR, %) in the total plant-soil system (A) , plant (B), respiration (C), shoots (D), leaves (E), stems (F), roots (G) and microbial biomass (H) after 1 month of exposure to atmospheric PHE (polluted, closed squares ■) and to ambient air (control, open diamonds ◇).....	90
Figure 6-2 : Partitioning of ¹³ C (PLR, %) among plant organs (leaves, stems and roots) after 1 month of exposure to atmospheric PHE (polluted) and to ambient air (control).....	91
Figure 7-1 : Concentrations en PHE mesurées dans le sol nu ou avec des trèfles après exposition à un air enrichi en PHE (pollué) ou à l'air ambiant (témoin).....	98
Figure 7-2 : Concentrations en PHE retrouvées dans l'air, les tissus des plantes et le sol dans les 2 système sol-plante-microorganismes étudiés après 1 mois d'exposition au PHE atmosphérique.....	99
Figure 7-3 : Comparaison du devenir et des effets des HAP à partir du sol ou de l'air sur les systèmes sol-plante-microorganismes étudiés.....	105
Figure 7-4 : Bilan de biomasse et d'allocation du carbone.....	107

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires.....	12
Tableau 2-2 : Liste des HAP considérés pour les mesures dans l'air par différents organismes (US-EPA et CITEPA) et la directive européenne du 15 décembre 2004 (2004/107/CE).....	13
Tableau 2-3 : Les facteurs influençant les processus de dépôts gazeux et particulaires.....	21
Tableau 2-4 : Synthèse des effets biologiques et physiologiques en réponse à une exposition aux HAP par voie foliaire et racinaire.....	33
Tableau 3-1 : PHE concentrations recovered in the different compartments after 2 weeks of exposure to atmospheric PHE in the different treatments (PA, PB, PC).....	45
Tableau 4-1 : Main physicochemical characteristics of the 2 soils used in the experiments.....	55
Tableau 4-2 : Phenanthrene (PHE) concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) in soils exposed during two weeks to atmospheric PHE deposition.....	58
Tableau 4-3 : Shoot biomass (mg DW) and root length (mm) of leek after 3 weeks of growth in Maconcourt and Bouzule soils previously exposed during 2 weeks to ambient air (C) or PHE-enriched air (P1, P2) diluted 2 times.....	58
Tableau 4-4 : Arbuscular mycorrhizal infectivity (MSI50) and most probable number (MPN) of viable AMF propagules in soils exposed during 2 weeks to ambient air (C) or PHE-enriched air (P1, P2).....	59
Tableau 4-5 : RV-coefficients (below diagonal) and corresponding P-values (above diagonal) among the four groups of variables used in the MFA.....	62
Tableau 5-1 : PHE concentrations recovered in air, plant tissues and soil in the 2 plant soil systems (red clover and ryegrass) after one month of exposure to atmospheric PHE.....	73
Tableau 5-2: Absorbed and adsorbed PHE in leaves of red clover and ryegrass after one month of exposure to atmospheric PHE.....	73
Tableau 5-3 : Clover symbiotic microorganism analyses after one month exposure to ambient air (control) or PHE-enriched air (polluted).....	74
Tableau 6-1 : PHE concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) recovered in clovers and soils after 1 month of exposure to atmospheric PHE.....	87
Tableau 6-2 : Biomasses and growth parameters of clovers after 1 month of exposure to atmospheric PHE (polluted) and to ambient air (control).....	88
Tableau 6-3 : Total C, total N, and soluble protein contents in clover leaves, stems, roots and in total plant (mg g ⁻¹ dry weight) after 1 month of exposure to atmospheric PHE (polluted) and to ambient air (control).....	88
Tableau 6-4 : Photosynthetic pigment contents (mg g ⁻¹ dry weight) in leaves and stems of clovers after 1 month of exposure to atmospheric PHE (polluted) and to ambient air (control).....	89
Tableau 6-5 : Results of the linear mixed effect (lme) models to test for overall differences between treatments (control and polluted), time and their interaction for the fraction of 13 C label (FLR, %)	

recovered in the total plant, shoots, leaves, stems, roots, microbial biomass (MB) and in cumulative respiration (respi).....90

Tableau 6-6 : Results of the linear mixed effect (lme) models to test for overall differences between treatments (control and polluted), time and their interaction for the 13 C label partitioning (PLR, %) among plant organs (leaves, stems, roots).....92

Tableau 7-1 : Bilan de carbone dans la plante.....106

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

RELATIVES AUX TRAVAUX DE THESE

Publications

1. Desalme D, Binet P, Bernard N, Gilbert D, Toussaint ML, Chiapusio G (2011). Atmospheric phenanthrene transfer and effects on two grassland species and their root symbionts : A microcosm study. **Environmental and Experimental Botany** **71**: 146-151
2. Desalme D, Binet P, Epron D, Bernard N, Gilbert D, Toussaint ML, Plain C, Chiapusio G, Atmospheric phenanthrene pollution modulates carbon allocation in red clover (*Trifolium pratense* L.). **Environmental Pollution** (2011), doi:10.1016/j.envpol.2011.05.015
3. Desalme D, Chiapusio G, Bernard N, Gilbert D, Toussaint ML, Binet P, Infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in two agricultural soils affected by atmospheric deposition of phenanthrene. **European Journal of Soil Biology** (soumis)
4. Desalme D, Roy JC, Chiapusio G, Gilbert D, Toussaint ML, Binet P, Bernard N, An exposure device to study the fate of atmospheric PAHs in environmental compartments in microcosms: development and validation with phenanthrene (à soumettre)
5. Chiapusio G, Desalme D, Pujol S, Bui QT, Bernard N, Toussaint ML, Binet P (2011) Two biochemical forms of phenanthrene recovered in grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) grown in 3 spiked soils. **Plant and soil** **1-2** : 295-303
6. Meyer C, Desalme D, Bernard N, Toussaint ML, Gilbert D, atmospheric deposition of phenanthrene in soils and effects on testate amoebae community (à soumettre)

Communications orales

1. Desalme D, Binet P, Bernard N, Gilbert D, Toussaint ML, Chiapusio G (2010) Devenir des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques d'origine atmosphérique dans un système sol-plante-microorganismes symbiotiques. **XVIe Forum des Jeunes Chercheurs**, Besançon, France, 07-08 Juin 2010.
2. Desalme D, Chiapusio G, Binet P, Toussaint ML, Gilbert D, Bernard N (2010) Simulating atmospheric PAH exposure on terrestrial ecosystems : an original experimental device. **Air Pollution 2010, 18th International Conference on Modelling, Monitoring and Management of Air Pollution**, Kos, Greece, 21-23 June 2010.

3. Desalme D, Roy JC, Chiapusio G, Binet P, Gilbert D, Toussaint ML, Bernard N (2010) Atmospheric exposure of micro-ecosystems in experimental chambers. **20th European SETAC annual meeting: Sciences and Technology for Environmental Protection**, Seville, Spain, 23-27 May 2010.
4. Desalme D, Roy JC, Chiapusio G, Binet P, Gilbert D, Toussaint ML, Bernard N (2010) Simulating atmospheric PAH exposure on terrestrial ecosystems: an original experimental device. **Ecotrons and lysimeters: key tools for studying terrestrial ecosystem responses to global change, to pollutants, and the ecological engineering**, Nancy, France, 29-31 March 2010.
5. Desalme D (2009) Contamination atmosphérique des écosystèmes par les HAP : Etude en microcosmes sur un système sol-plante-microorganismes symbiotiques exposé au phénanthrène. **Séminaires de l'UMR Chrono-Environnement**, 08 Décembre 2009.
6. Desalme D, Chiapusio G, Binet P, Gilbert D, Toussaint ML, Bernard N (2009) Pollution atmosphérique diffuse en phénanthrène sur un système sol-plante-microorganismes symbiotiques. **10èmes journées d'étude des sols**, Strasbourg, France. 12-14 mai 2009.

Posters

1. Desalme D, Binet P, Chiapusio G, Gilbert D, Toussaint ML, Bernard N (2009) Impact d'une pollution atmosphérique en phénanthrène sur un système sol-plante-microorganismes symbiotiques : étude en microcosmes. **Deuxièmes rencontres nationales de la Recherche sur les sites et sols pollués : pollutions locales et diffuses**, Paris, France. 20-21 octobre 2009.
2. Desalme D, Binet P, Chiapusio G, Bernard N, Toussaint ML, Gilbert D (2008) Impact du phénanthrène sur les microorganismes symbiotiques du Trèfle violet (*Trifolium pratense*). **Journées Francophones Mycorhizes**, Dijon, France. 04 - 05 septembre 2008.
3. Desalme D (2008) Impact des contaminations atmosphériques en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sur la qualité des milieux terrestres. **XIVe Forum des Jeunes Chercheurs**, Besançon, France. 12 - 13 Juin 2008.

1 INTRODUCTION GENERALE

Depuis l'avènement de l'ère industrielle au XIX^{ème} siècle, la composition de l'atmosphère a largement évolué reflétant les modifications des activités humaines, sources d'émissions de substances vers l'atmosphère. Cependant, la législation internationale relative à la qualité de l'air n'a été mise en place que tardivement. En effet, c'est seulement au cours des années 1980 que des directives concernant la qualité de l'air et sa surveillance ont été établies aux niveaux européen et mondial et c'est plus récemment que la réduction des émissions de polluants atmosphériques est devenue un enjeu essentiel pour tous les pays industrialisés ou en voie d'industrialisation.

La métrologie de polluants atmosphériques et l'évaluation des risques environnementaux et sanitaires sont des domaines qui évoluent et participent à la prise de décision dans les domaines réglementaires et législatifs, notamment pour une meilleure surveillance de la qualité de l'air. Parmi les nombreuses définitions de la pollution atmosphérique, celle-ci peut être définie, comme « *L'introduction par l'homme de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre la santé humaine en danger, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer les nuisances olfactives excessives* » (loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie (LAURE) n°96-1236 du 30 décembre 1996) (JORF, 1996).

En France, le Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA) remplit la fonction de Centre National de Référence des émissions dans l'air à la demande du Ministère chargé de l'Environnement. A ce titre, le CITEPA détermine régulièrement les quantités rejetées dans l'atmosphère provenant de différentes sources pour diverses substances. Dans l'atmosphère, les polluants atmosphériques sont de différentes natures et de concentrations diverses. Certains polluants sont connus, étudiés et suivis systématiquement depuis les années 1960, comme c'est le cas du dioxyde de carbone (CO₂), du dioxyde de soufre (SO₂), des oxydes d'azote (NO_x), des éléments traces métalliques (ETM) comme le plomb (Pb) ou le mercure (Hg). D'autres polluants sont suivis depuis les années 1990, comme les gaz à effet de serre (CH₄, N₂O), les composés organiques volatils (COV), l'ozone (O₃), les organochlorés (dioxines et furannes), et les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).

Les HAP ont trouvé une place privilégiée dans la problématique de la pollution de l'air. Ils font partie des Polluants Organiques Persistants (POPs), définis par le protocole d'Aarhus (1998) et la convention de Stockholm (2001), deux traités internationaux dont l'objectif commun était de limiter les émissions de ces molécules capables de s'accumuler dans les différents compartiments de l'environnement et susceptibles d'être nocives ou toxiques pour la santé humaine et les ressources naturelles. Depuis 2004, ces HAP font l'objet de réglementations plus strictes et doivent être

1. Introduction générale et objectifs

obligatoirement pris en compte dans la surveillance de l'air (directive européenne 2004/107/CE) (JOUE, 2004).

La famille des HAP regroupe plus d'une centaine de molécules de poids moléculaire élevé, constituées uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène assemblés en cycles benzéniques fusionnés. Ce sont des polluants prioritaires du fait de leur potentiel toxique, mutagène et cancérigène (Atkinson & Arey, 1994; Wild & Jones, 1995; Dusserre *et al.*, 1998). Seize d'entre eux, comptant entre deux et sept cycles aromatiques, doivent être suivis en priorité dans l'environnement selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé, de l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement et de l'Union Européenne à cause de leur toxicité envers les mammifères et les organismes aquatiques (Bjorseth, 1979; IARC, 1983; Wilson & Jones, 1993). Les HAP peuvent être formés naturellement par des réactions à basse température et à haute pression de la matière organique et constituent dans ce cas des hydrocarbures de pétrole.

Leurs émissions dans l'atmosphère sont majoritairement dues à la combustion incomplète des produits pétroliers et du bois. Celles-ci résultent donc en grande partie des procédés industriels et d'autres activités anthropiques. La contribution des sources naturelles telles que les feux de forêt et les éruptions volcaniques n'a d'importance que localement (Edwards, 1983; Wild & Jones, 1995).

Les HAP d'origine atmosphérique sont retrouvés partout dans le sol et les végétaux et peuvent contaminer les animaux et les hommes par transfert dans la chaîne alimentaire (Srogi, 2007). Toutefois, les mécanismes globaux et spécifiques du transfert restent mal connus. Les études portant sur l'impact des HAP ont pour l'essentiel concerné les pollutions localisées du sol ou des sédiments. De telles études avaient pour objectif principal de développer les techniques de bioremédiation et d'identifier les effets des HAP sur les plantes exposés par voie racinaire (Leyval & Binet, 1998; Gao & Zhu, 2004; Joner *et al.*, 2004; Liste & Prutz, 2006). Ces études ont montré que les pollutions lourdes du sol pouvaient altérer la production de biomasse chez plusieurs espèces. Toutefois, les effets varient selon l'espèce végétale considérée, ses relations avec ses symbiontes, la contamination du sol (composés, concentrations, mode de contamination : artificiel ou réel, du temps de contact avec le polluant) ou le type de sol.

D'autres travaux portant sur la pollution atmosphérique par les HAP ont concerné l'utilisation des plantes dans des études de biosurveillance de la qualité de l'air (Lehndorff & Schwark, 2004; Orecchio, 2007; Prajapati & Tripathi, 2008; Sharma & Tripathi, 2008; Lehndorff & Schwark, 2009a; Lehndorff & Schwark, 2009b). Au cours de ces études, des efforts ont aussi été portés sur la modélisation de l'accumulation potentielle de ces polluants dans les tissus des végétaux (Trapp *et al.*, 1994; Tao *et al.*, 2006; Yang & Zhu, 2006; Lin *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Gao & Collins, 2009; Collins & Finnegan, 2010).

1. Introduction générale et objectifs

Cependant, peu d'études ont été menées sur la caractérisation du devenir des HAP d'origine atmosphérique dans les milieux naturels et sur les effets biologiques d'une pollution atmosphérique en HAP à l'échelle d'un microsysteme complexe « sol-plante-microorganismes ». En effet, la plupart des études ont jusqu'à présent été réalisées sur le terrain et n'ont pas permis de préciser les mécanismes fondamentaux du transfert et des effets des HAP dans l'environnement (Barber *et al.*, 2004). Pour pouvoir évaluer ces mécanismes, il est nécessaire de développer des expériences en conditions contrôlées pour mieux comprendre le devenir et les effets de HAP atmosphériques. Cependant, ce type d'expérimentation nécessite d'une part de disposer de systèmes de contamination par voie atmosphérique qui soient suffisamment fiables et reproductibles, et d'autre part de pouvoir réaliser en parallèle des analyses croisées faisant appel à des compétences complémentaires de chimie analytique, de physiologie et de microbiologie.

C'est dans ce contexte général que s'inscrit ce travail de recherche dont les objectifs étaient :

- de développer et de valider un dispositif expérimental original permettant d'exposer des microsystemes sol-plante-microorganismes à une contamination atmosphérique contrôlée en HAP, le phénanthrène (PHE),
- de déterminer l'accumulation du phénanthrène et dans les différents compartiments du microsysteme, c'est-à-dire le sol et les végétaux.
- et d'évaluer l'impact de différentes concentrations en HAP sur les végétaux et certains microorganismes du sol.

Ce mémoire s'articule en 8 chapitres, dont le premier présente le contexte général et les objectifs de l'étude (**Chapitre 1**), le deuxième correspond à une synthèse de l'état des connaissances acquises sur la contamination des écosystèmes terrestres par les HAP atmosphériques (**Chapitre 2**). Les résultats des travaux menés au cours de cette thèse se présentent sous la forme d'un recueil de 4 publications à soumettre, soumises, ou acceptées :

- La première concerne la mise au point d'une méthode de calibration pour le dispositif expérimental d'exposition à une pollution atmosphérique par les HAP (**Chapitre 3, publication à soumettre**),
- La deuxième concerne l'impact d'une pollution atmosphérique par le phénanthrène sur le potentiel mycorhizien de 2 sols (**Chapitre 4, publication soumise**),
- La troisième expose le devenir et les effets biologiques d'une pollution atmosphérique par le phénanthrène sur 2 microsystemes sol-plante-microorganismes constitués ou de trèfle violet (*Trifolium pratense*) ou de ray-grass (*Lolium perenne*) avec leurs symbiotes racinaires (**Chapitre 5, publication acceptée**),

1. Introduction générale et objectifs

- La quatrième étudie les effets d'une pollution atmosphérique par le phénanthrène sur l'allocation carbonée chez le trèfle violet par un marquage au $^{13}\text{C-CO}_2$ qui permet de suivre le carbone depuis son assimilation par photosynthèse jusqu'à sa re-émission dans l'atmosphère par respiration et son transfert vers la biomasse microbienne du sol (**Chapitre 6, publication acceptée**).

Ensuite, le **chapitre 7** présente une synthèse générale et une discussion des résultats les plus significatifs. Les conclusions et les perspectives de ce travail de recherche seront présentées dans le **chapitre 8**.

Un aperçu global des techniques utilisées pour répondre aux objectifs posés dans le cadre de cette thèse est proposé dans la figure 1-1. De plus amples détails concernant les modes opératoires sont disponibles dans les chapitres correspondant.

Thématique	Techniques utilisées	Chapitres concernés
Mise au point dispositif	<ul style="list-style-type: none">• Particle image velocimetry (PIV)• Computer Fluid dynamics (CFD)• Echantillonnage passif	Chapitre 2
Transfert dans la plante et le sol	<ul style="list-style-type: none">• Accelerated solvent extraction (ASE)• Analyse et quantification en CPG-SM	Chapitres 3, 4, 5, 6
Effets sur la plante	<ul style="list-style-type: none">• Biomasse, surface foliaire• Analyse de croissance• Marquage au $^{13}\text{C-CO}_2$	Chapitres 4, 6 Chapitre 6
Effets sur les microorganismes du sol	<ul style="list-style-type: none">• Fréquence et intensité mycorhizes• Nodules de <i>Rhizobium</i>• Potentiel mycorhizien du sol• Biomasse microbienne	Chapitre 4 Chapitre 3 Chapitre 6

Figure 1-1 : Synthèse des méthodes utilisées

2 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

2.1.1 Structures et propriétés chimiques

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des molécules organiques de poids moléculaire élevé (PM) (Fig. 2-1) (Tableau 2-1). Ce sont des polluants semi-volatiles qui se partagent entre les phases gazeuses et liquides selon leur constante de Henry (K_H). Ce sont des molécules neutres très peu solubles dans l'eau ($S_w < 1 \text{ mg L}^{-1}$). Leur hydrophobicité, estimée par le logarithme du coefficient de partage octanol/eau, est relativement élevée ($\log K_{ow} > 3$). Ils sont persistants dans l'environnement comme en témoignent leurs durées de demi-vie (de plusieurs semaines jusqu'à 5 ans pour le pyrène).

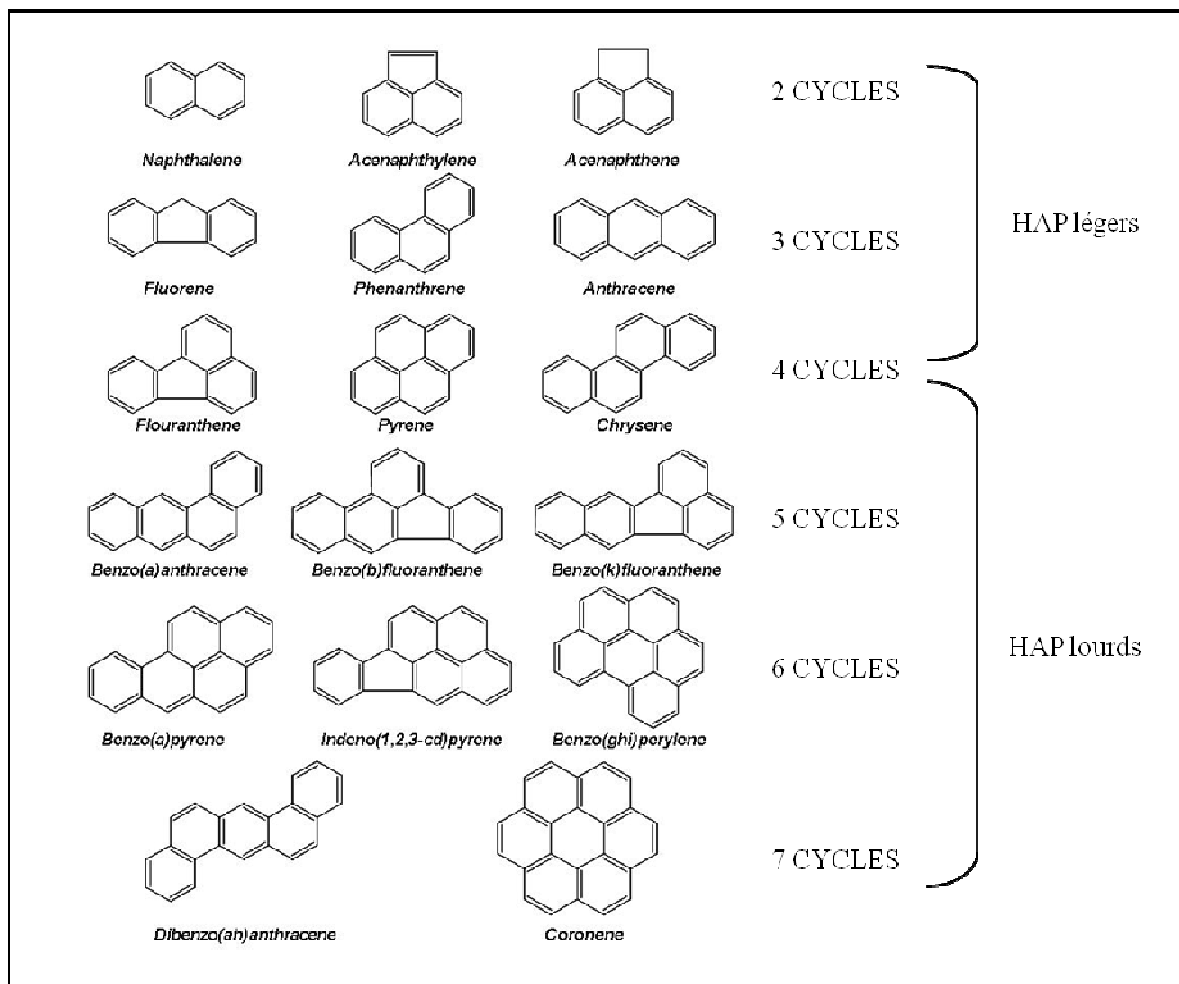


Figure 2-1: Formules chimiques des 16 HAP prioritaires et du coronène

Les propriétés physico-chimiques des HAP varient selon leur poids moléculaire et selon l'arrangement stérique des cycles aromatiques. Ils sont classés schématiquement en HAP légers (< 4 cycles), en HAP intermédiaires (4 cycles) et en HAP lourds (> 4 cycles). D'une façon générale, leur

2. Synthèse bibliographique

solubilité et leur volatilité diminuent, alors que leur hydrophobicité augmente avec leur poids moléculaire.

La distribution des HAP entre les phases gazeuses et particulaires dans l'atmosphère est régie par le coefficient de partage octanol/air ($K_{OA} = K_{OW}/K_H$) (Wang *et al.*, 2009). Plus le K_{OA} d'un HAP est élevé, plus la molécule est présente dans l'atmosphère sous la forme particulaire (Lohmann & Jones, 1998). De plus, cette distribution entre les 2 phases dans l'atmosphère dépend de la température (Tsapakis & Stephanou, 2005).

Tableau 2-1: Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires (Mackay *et al.*, 1992)

HAP	PM (g mol ⁻¹)	S _w (mg L ⁻¹)	K _H (Pa m ³ mol ⁻¹)	Log K _{OW}	Toxicité ^a	Cycles aromatiques (et totaux)
Naphthalene	128	31	43,01	3,37		2
Acenaphthylene	150	16,1	8,4	4,00		2
Acenaphthene	154	3,8	12,17	3,92		2
Fluorene	166	1,9	7,87	4,18	groupe 3	2 (3)
Anthracene	178	0,045	3,96	4,54	groupe 3	3
Phenanthrene	178	1,1	3,24	4,57	groupe 3	3
Fluoranthene	202	0,26	1,037	5,22	groupe 3	3 (4)
Pyrene	202	0,132	0,92	5,18	groupe 3	4
Benz[a]anthracene	228	0,011	0,581	5,91	groupe 2A	4
Chrysene	228	0,0018	0,065	5,86	groupe 3	4
Benzo[b]fluoranthene	252	0,0015		5,80	groupe 2B	4 (5)
Benzo[k]fluoranthene	252	0,0008	0,016	6,00	groupe 2B	4 (5)
Benzo[a]pyrene	252	0,0038	0,046	6,04	groupe 2A	5
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	278				groupe 2B	5(6)
Dibenz[a,h]anthracene	278	0,0006		6,75	groupe 2A	5
Benzo[ghi]perylene	268	0,00026	0,075	6,50	groupe 3	6

^a: selon l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC, 1983) et selon (EPAQS, 1999) : Groupe 2A, substance sans doute cancérigène pour l'Homme ; Groupe 2B: possible cancérigène ; Groupe 3: non classifiable. PM : poids moléculaire ; S_w : solubilité dans l'eau ; K_H : constante de Henry ; K_{OW}: coefficient de partage octanol/eau

2.1.2 Emissions

L'inventaire des sources et la quantification des émissions de HAP dans l'atmosphère est une des parties les moins bien connues de la recherche concernant la distribution globale et leur devenir dans l'environnement (Breivik *et al.*, 2006). En effet, les inventaires diffèrent déjà selon leur objectifs, qu'ils soient politiques (inventaires officiels) et voués à identifier et à contrôler les sources d'émissions ou scientifiques et tentent de comprendre l'impact des émissions sur l'environnement et la santé humaine.

2. Synthèse bibliographique

En Europe, la plupart des émissions est estimée à partir d'une méthodologie reconnue basée sur le principe développé dans le système CORINAIR. Toutefois il existe de nombreux formats d'expression des données qui diffèrent selon la convention, la directive ou la nomenclature juridique à laquelle ils se rapportent, ce qui complique l'homogénéisation des données. De plus, les sources d'émissions répertoriées ne sont pas toujours les mêmes, comme par exemple en Estonie et en Allemagne où les inventaires officiels n'ont pris en compte que le secteur des transports (Breivik *et al.*, 2006).

Au niveau européen, le benzo(a)pyrène (BaP) reste le seul HAP dont les concentrations sont suivies systématiquement dans les mesures de qualité de l'air. Pourtant, bien que son suivi soit justifié par sa toxicité importante avérée, sa représentativité parmi les HAP n'est pas prouvée. Afin d'évaluer sa représentativité pour l'ensemble des HAP reconnus toxiques, six autres HAP non soumis à réglementation dans l'air ambiant doivent être mesurés dans l'air sur un nombre limité de sites (Tableau 2-2). Les sources d'émission contribuant majoritairement aux rejets de HAP dans l'atmosphère en Europe sont le chauffage domestique, le trafic routier et les incendies accidentels et localisés (Gioia *et al.*, 2006).

Tableau 2-2 : Liste des HAP considérés pour les mesures dans l'air par différents organismes (US-EPA et CITEPA) et la directive européenne du 15 décembre 2004 (2004/107/CE)

Institution, organisme	US-EPA	directive 2004/107/CE	CITEPA
Nom des HAP	Naphtalène	Benzo(a)pyrène	Benzo(a)pyrène
	Acénaphtylène		Benzo(b)fluoranthène
	Acénaphène	+	Benzo(k)fluoranthène
	Fluorène		Indéno(1,2,3-cd)pyrène
	Phénanthrène		
	Anthracène	Benzo(a)anthracène	
	Fluoranthène	Chrysène	
	Pyrène	Benzo(b)fluoranthène	
	Benzo(a)anthracène	Benzo(k)fluoranthène	
	Chrysène	Benzo(j)fluoranthène	
	Benzo(b)fluoranthène	Dibenzo(a,h)anthracène	
	Benzo(k)fluoranthène	Indéno(1,2,3-cd)pyrène	
	Benzo(a)pyrène		
	Dibenzo(a,h)anthracène		
	Benzo(g,h,i)pérylène		
	Indéno(1,2,3-cd)pyrène		
Nombre de HAP	16	7	4

En France, le Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA) effectue ses mesures de concentration de HAP dans l'air pour la somme de quatre HAP cités par le protocole d'Aarhus (1998) et le Règlement (CE) n° 850/2004 du Parlement européen et du

2. Synthèse bibliographique

Conseil du 29 avril 2004 (JOCE, 2004b; CITEPA, 2010) (Tableau 2-2). En 2008, 19 tonnes de HAP ont été émises en France métropolitaine, le résidentiel étant le principal contributeur (68 % des émissions totales), suivi du transport routier (25 %) (CITEPA, 2010). Les émissions totales ont diminué de 50 % en 20 ans grâce à un contrôle des rejets dans tous les secteurs sauf dans celui du transport (augmentation de 70 %). En effet, malgré les avancées techniques qui ont permis de diminuer leur rejet (pots catalytiques), l'augmentation des émissions de HAP par le transport routier est liée au large développement du parc automobile français (Bourdeau, 1998).

2.1.3 Toxicité des HAP atmosphériques

Comme pour tous les xénobiotiques, les effets toxiques et les nuisances induits par les HAP sont variables selon leur nature, leurs concentrations, les conditions d'exposition et les cibles biologiques concernées. En général, les expositions à une atmosphère contaminée sont chroniques, c'est-à-dire continues ou répétitives, et mettent en jeu des concentrations faibles en polluants (Dusserre *et al.*, 1998). Pourtant, l'impact de telles expositions est mal connu. En effet, la majorité des connaissances sur la toxicité des HAP ont été recueillies lors d'expositions aiguës à ces polluants.

Chez les vertébrés, le potentiel mutagène et cancérigène des HAP se manifeste via la génération de radicaux libres et la formation d'adduits d'ADN (Atkinson & Arey, 1994; Akcha *et al.*, 2003; Arey & Atkinson, 2003; Shaw & Muller, 2004; Belitsky & Yakubovskaya, 2008) (Fig. 2-2). On distingue dans l'atmosphère les HAP natifs (non-transformés) des HAP transformés. Parmi ces derniers, les nitro-HAP constituent les représentants les plus toxiques, mutagènes et cancérigènes.

2. Synthèse bibliographique

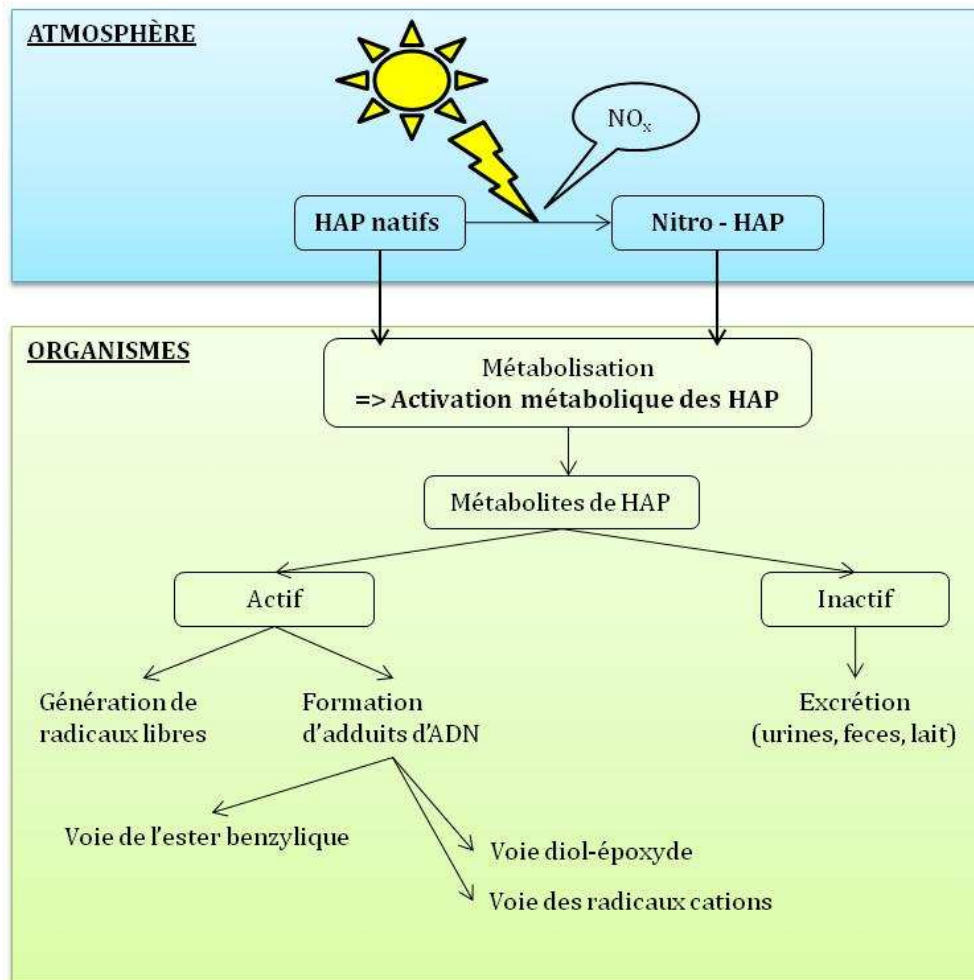


Figure 2-2 : Expression de la toxicité chez les vertébrés d'après Akcha et al. (2003)

La métabolisation des HAP est la réaction biologique responsable de la transformation des HAP natifs (pro-cancérogènes) en molécules plus réactives (cancérogènes) qui peuvent former des adduits d'ADN (Akcha *et al.*, 2003). L'activation des HAP en adduits d'ADN peut se produire par 3 voies différentes dont deux impliquant les systèmes enzymatiques à cytochrome P450 (CYP 450) (Fig. 2-3). Cette activation métabolique peut être rapide c'est pourquoi les adduits d'ADN constituent des marqueurs précoces d'exposition aux HAP et sont fréquemment dosés dans les programmes de biosurveillance des qualités des sols et des eaux. Les CYP 450 ont un rôle ambivalent dans puisqu'ils participent à la fois l'activation métabolique des HAP en adduits d'ADN mais aussi aux processus de détoxification et de protection contre la toxicité induite par les HAP (Uno *et al.*, 2004).

2. Synthèse bibliographique

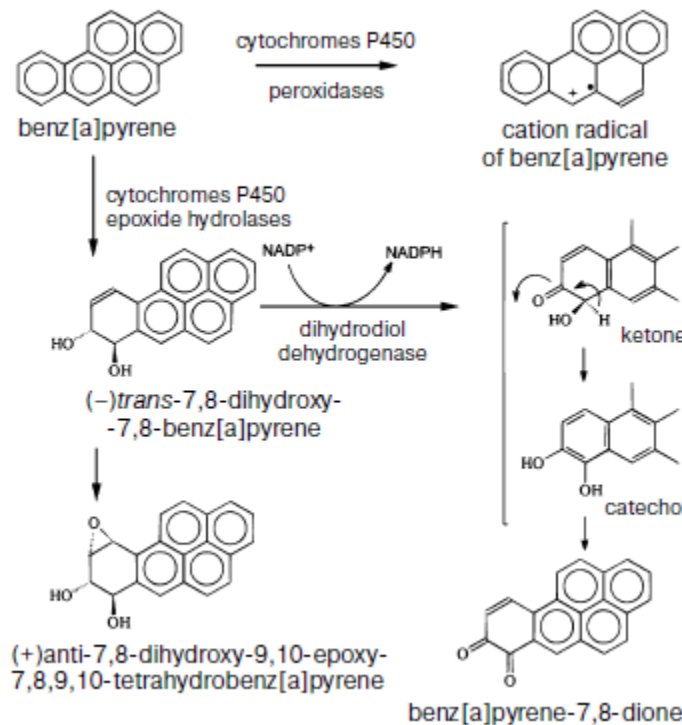


Figure 2-3 : Activation métabolique du Benzo(a)pyrène par le cytochrome P450 (Belitsky & Yakubovskaya, 2008)

2.1.4 Cycle global des HAP dans les écosystèmes terrestres

Les HAP se partitionnent entre l'atmosphère, le sol et la végétation par les dépôts atmosphériques secs gazeux, secs particulaires et humides de particules (Srogi, 2007) (Fig. 2-4). Le transport et la mobilité des HAP dans l'environnement dépendent à la fois de leurs propriétés physico-chimiques, des propriétés des compartiments environnementaux exposés et des conditions environnementales. L'hydrophobicité des HAP témoigne d'un fort potentiel d'adsorption sur les matières organiques et de bioaccumulation dans les tissus gras. Leur structure très stable ne permet leur dégradation dans l'atmosphère que par des attaques de radicaux libres. Dans les sols, ils peuvent être dégradés par certaines voies enzymatiques, mais sont en général récalcitrants à la biodégradation et à la métabolisation. Ils s'accumulent donc dans les sols et les végétaux et peuvent être transférés dans la chaîne alimentaire et avoir des impacts sur l'environnement et la santé humaine.

Les HAP du sol peuvent être transférés à la faune du sol soit directement par ingestion ou contact dermique, soit indirectement par ingestion de matériel végétal contaminé (Achazi & Van Gestel, 2003). Les différentes voies de prélèvement des HAP chez les invertébrés sont bien documentées et sont spécifiques aux grands groupes constituant la faune du sol : la microfaune (nématodes), la mésofaune (enchytrides, collemboles) et la macrofaune (vers de terre, isopodes). Des HAP ont aussi été retrouvés *in situ* chez les vertébrés terrestres et d'eau douce. Ces études ont montré qu'ils s'accumulaient faiblement et étaient rapidement métabolisés, impliquant que les principaux

2. Synthèse bibliographique

effets biologiques directs seraient liés à la formation d'adduits d'ADN et aux risques cancérigènes associés (Malcolm & Shore, 2003).

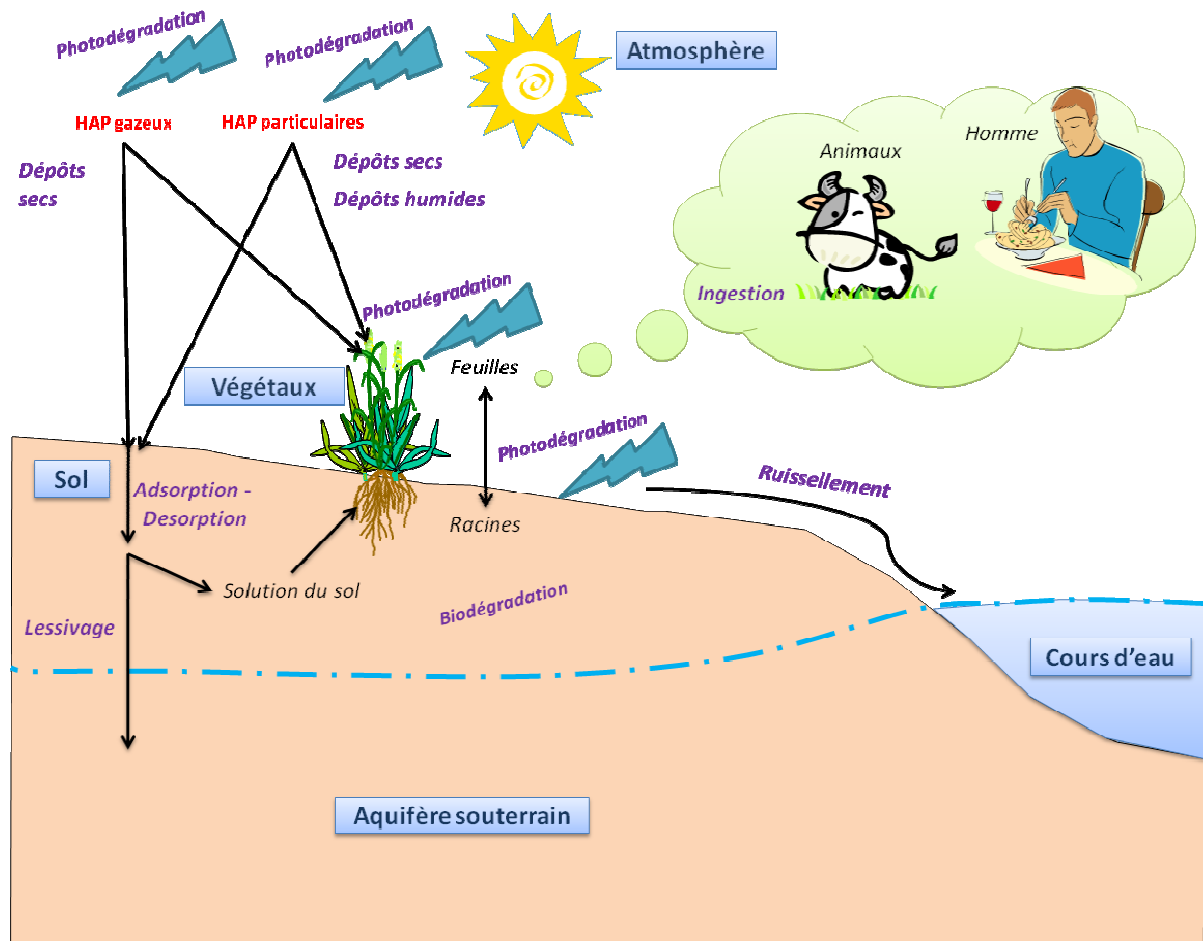


Figure 2-4 : Devenir des HAP dans les écosystèmes

Les HAP atmosphériques se déposent sur les champs cultivés ou les prairies et contaminent les parties aériennes des végétaux, soulevant le problème de transfert dans la chaîne alimentaire et dans les denrées alimentaires (Kipopoulou *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2001; Crepineau *et al.*, 2003; Rey-Salgueiro *et al.*, 2008).

La population humaine est exposée aux HAP par ingestion, inhalation et par contact, mais la principale source d'exposition et de risque reste l'ingestion de fruits, de légumes, et de produits animaux contaminés (viande, poissons, produits de la mer, produits laitiers, œufs) (Brandt & Watson, 2003; Cocco *et al.*, 2007). L'exposition varie au niveau individuel selon le lieu (continent, pays, région, zone rurale/ urbaine/ industrielle, densité de trafic) et les habitudes de vie (consommation de viandes grillées, tabagisme). Dans le cadre d'activités professionnelles, certains travailleurs sont particulièrement exposés aux HAP par voie cutanée et /ou aérienne (ouvriers dans les cokeries, les

2. Synthèse bibliographique

raffineries d'aluminium, employés de voirie, mécaniciens, garagistes, et personnes travaillant à la réhabilitation des sols pollués). Les concentrations en BaP auxquelles ces travailleurs sont exposés peuvent dépasser les 20-40 $\mu\text{g m}^{-3}$ (EPAQS, 1999).

2.1.5 Réglementation

Les HAP ayant des effets délétères reconnus sur les organismes, les outils réglementaires ont permis de définir des valeurs cibles de concentrations en HAP retrouvées dans l'air ambiant, l'eau potable, les sédiments et les boues de station d'épuration (INERIS, 2002). Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de réglementation sur les teneurs en HAP dans les sols et les eaux de surface.

Concernant l'air ambiant, la valeur cible est fixée par la directive 2004/107/CE uniquement pour le BaP à 1 ng m^{-3} en moyenne annuelle calculée sur le contenu de la fraction PM_{10} des poussières en suspension (JOCE, 2004a).

Dans l'eau potable, la valeur seuil est fixée pour le BaP à 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ et pour la somme de 4 HAP (benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(g,h,i)pérylène et indéno(c,d)pyrène) à 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ par le décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001 (JORF, 2001).

La réglementation N° 1881/2006 de la Commission européenne du 19 décembre 2006 portant a définit des teneurs maximales en HAP (BaP) tolérées dans certaines denrées alimentaires, comme par exemple les poissons et autres produits de la pêche, les huiles et graisses utilisées comme complément alimentaire, le beurre de cacao (JOUE, 2006).

2.2 Devenir des HAP atmosphériques dans l'air

2.2.1 Variation des concentrations en HAP dans l'air

Les HAP gazeux comportant 3 ou 4 cycles sont toujours retrouvés en proportions majoritaires dans les profils de HAP mesurés dans l'air (proportions individuelles relatives des différents HAP dans le mélange total des HAP). Par exemple, le phénanthrène est toujours retrouvé majoritairement dans différents sites échantillonnés en Europe (Soderstrom *et al.*, 2005; Tsapakis & Stephanou, 2005; Gioia *et al.*, 2006). Les concentrations et les profils en HAP dans l'air évoluent au niveau global avec la latitude, les composés les plus lourds étant moins représentés sous les latitudes plus élevées, ce qui est lié à une plus grande distance aux sources (Gioia *et al.*, 2006). Les concentrations en HAP particulaires diminuent en général avec la distance aux sources d'émissions (Hafner *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008).

Les concentrations varient également selon les pays. Les concentrations de HAP gazeux mesurés dans l'Est de l'Europe (Slovaquie, République tchèque, Est de la Pologne) sont 10 fois plus

2. Synthèse bibliographique

élevées que les concentrations retrouvées en Suède et en Autriche. De plus, dans chaque pays, les concentrations varient d'un facteur 1 à 3 selon le site considéré (Soderstrom *et al.*, 2005). De plus, la densité de population humaine influence localement les concentrations atmosphériques retrouvées dans différents sites à travers le monde (Hafner *et al.*, 2005).

Les profils de HAP retrouvés dans l'air varient au niveau local selon le type de source d'émission car toutes n'émettent pas le même type de composés. En Europe, les inventaires des sources de HAP ont mis en évidence la dominance des sources de combustions diffusives. La plupart des contributions sont attribuées au chauffage domestique (à bois en Norvège et au charbon/bois au Royaume-Unis (Gioia *et al.*, 2006). La mesure de ratios de concentrations entre certains HAP renseigne sur la contribution de différentes sources d'émissions au niveau local. Par exemple, un ratio fluoranthène/pyrène > 1 permet de conclure à une prépondérance des sources pyrolytiques, tandis que le ratio Phénanthrène/antracène > 1 permet de conclure à la prépondérance de sources pétrogéniques (Mostafa *et al.*, 2008).

Les concentrations en HAP varient également dans le temps à différentes échelles (cycle journalier, saisonnier, interannuel) (Breivik *et al.*, 2006; Gioia *et al.*, 2006). Une saisonnalité des concentrations est observée dans l'hémisphère nord où les concentrations en HAP dans l'air sont plus importantes en hiver à cause d'une augmentation des émissions primaires de HAP, en particulier des combustions liées au chauffage domestique (Prevedouros *et al.*, 2004). Cette saisonnalité a été observée uniquement pour les HAP particuliers lors d'une campagne de surveillance du devenir atmosphérique des HAP dans la région industrielle de Heraklion (Grèce) (Tsapakis & Stephanou, 2005), et l'explique par un changement de la distribution gaz/particule en hiver lorsque les températures baissent.

2.2.2 Processus de dissipation

2.2.2.1 Réactions chimiques

Dans la partie la plus basse de l'atmosphère appelée la troposphère, les HAP sont soumis à différentes réactions photochimiques de dissipation, de dégradation et de transformations. Les HAP particuliers sont soumis à la photolyse qui constitue le processus de dissipation principal auquel les HAP gazeux semblent insensibles (Arey & Atkinson, 2003). Les réactions de photolyse dans la troposphère sont par ailleurs responsables de la formation de nombreuses espèces photo-oxydantes, comme l'ozone (O_3), les radicaux hydroxyles (OH°) et les radicaux nitrates (NO_3°). Les HAP natifs peuvent subir de nombreuses réactions chimiques dans la troposphère avec des réactifs (Fig. 2-5). Les HAP gazeux peuvent participer à des réactions avec NO_3° et OH° . Les HAP particuliers réagissent avec HNO_3 , N_2O_5 . Seul O_3 intervient dans des réactions impliquant des HAP sous forme gazeuse et particulaire.

2. Synthèse bibliographique

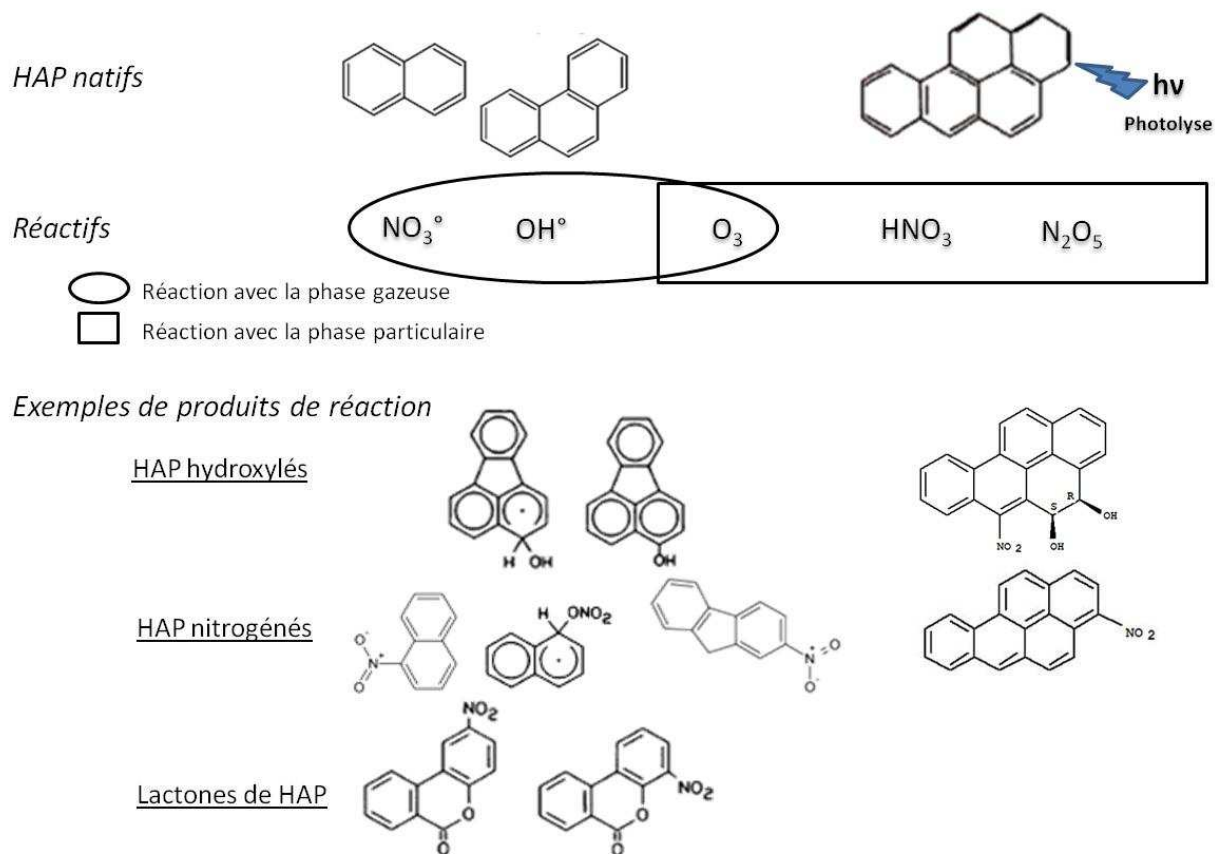


Figure 2-5: Réactions chimiques des HAP dans l'atmosphère d'après Arey & Atkinson (2003)

Les produits de réaction sont plus mutagènes que les HAP natifs. Par exemple, les HAP nitrogénés (Soderstrom *et al.*, 2005), connus pour être hautement cancérigènes peuvent être issus de différents types de réaction, à savoir :

- Les réactions radicalaires des HAP sous forme gazeuse, où l'élément OH° intervient pendant la phase diurne et NO_3° pendant la phase nocturne;
- Les réactions électrophiles des HAP sous forme particulaire avec comme réactifs N_2O_5 et HNO_3 .

Les isomères formés dépendent de la nature du composé natif (gaz ou particule), des types de réactions induits et des concentrations des différents éléments impliqués.

2.2.2.2 Dépôts atmosphériques

Les HAP contaminent les compartiments environnementaux par les dépôts atmosphériques secs de gaz et de particules (Srogi, 2007). Les dépôts humides de HAP, c'est-à-dire la solubilisation des HAP dans l'eau de pluie ou le brouillard, sont limités du fait de leur hydrophobicité. Les dépôts atmosphériques dépendent déjà de la nature du HAP considéré, en particulier de sa répartition entre

2. Synthèse bibliographique

phase gazeuse et particulaire dans l'atmosphère (Tableau 2-3). Les processus de dépôts des HAP gazeux dépendent des variables environnementales et des propriétés du compartiment exposé. Les mécanismes de dépôt des particules dépendent de leur force de gravité, des vents dominants (vitesse et direction) et de la morphologie de la zone réceptrice (présence d'obstacles : constructions, bâtiments, cultures ou forêts).

Tableau 2-3 : Les facteurs influençant les processus de dépôts gazeux et particulaires

	Gaz	Particules
Propriétés du polluant	K_{OA}	Diamètre des particules Densité des particules
Variables climatiques	Vent	Vent
	Température	Lumière
Propriétés des compartiments environnementaux	Nature	Topographie
	Surface exposée	Obstacles
	Morphologie	

Ensuite, la localisation des dépôts varie selon la distance à la source. Les HAP gazeux sont plus susceptibles de subir un transport à très longue distance et d'être retrouvés dans les sites éloignés de toute source d'émission (*remote area*), tandis que les HAP particulaires restent plus près des sources (Nam *et al.*, 2008). Cela est dû au fait que les HAP gazeux peuvent être émis à la fois par des sources primaires (combustions) et par des sources secondaires (compartiments environnementaux tels que le sol ou les végétaux) desquelles ils se volatilisent en fonction des conditions climatiques, en particulier en fonction de la température.

Dans le sol, il a été montré que les concentrations en HAP pouvait varier d'un facteur 3 à 7 entre un prélèvement au bord d'une autoroute (0-10 m) ou à plus de 200 m de celle-ci (Crepineau *et al.*, 2003). La proximité aux sources et la susceptibilité des terrains aux dépôts atmosphériques sont clairement impliqués dans les teneurs plus élevées retrouvées dans le sol. De plus, la proportion de HAP lourds dans les profils de HAP totaux diminue plus on s'éloigne de la source d'émission. La distribution spatiale des concentrations en HAP dans les sols de la région de Pékin (Chine) sont corrélées avec la densité de population et le Produit Intérieur Brut (PIB) (Wang *et al.*, 2010).

Dans les végétaux, les HAP de 3-4 cycles sont retrouvés majoritairement (Kipopoulou *et al.*, 1999; Howsam *et al.*, 2000; Wilcke *et al.*, 2004; Piccardo *et al.*, 2005; Sharma & Tripathi, 2008; Lehdorff & Schwark, 2009a). Les concentrations en HAP dans les végétaux varient, comme dans l'air, selon la saison (Smith *et al.*, 2001; Prajapati & Tripathi, 2008). Les HAP détectés dans du fourrage isolé de toute source de contamination présente des concentrations 40 fois inférieures à celles mesurées près d'une source d'émission (autoroute) (Crepineau *et al.*, 2003).

2. Synthèse bibliographique

Le coefficient de partage des HAP atmosphériques entre la végétation et le sol a mis en évidence une relation avec leur coefficient de partage gaz/particules (Weiss, 2000; Wang *et al.*, 2009). Selon ces auteurs, les HAP gazeux sont retrouvés dans les végétaux, tandis que les HAP particulaires sont retrouvés dans le sol.

Enfin, les concentrations retrouvées dépendent des propriétés propres du compartiment environnemental ou de l'organisme biologique exposé.

2.3 Comportement et devenir des HAP d'origine atmosphérique dans le sol

Les sols constituent le principal réservoir pour les dépôts atmosphériques de HAP (Wild & Jones, 1995; Lichtfouse *et al.*, 2005). Une fois dans les sols, Les HAP vont subir des processus physico-chimiques et biologiques de transport, de séquestration et de dissipation (Fig. 2-6).

Les études sur le devenir des HAP dans les sols ont toutes été menées dans le cadre de pollutions fortes industrielles ou artificielles du sol, mais pas dans le cadre de pollutions diffuses du sol d'origine atmosphérique. Dans la suite de ce mémoire, une distinction sera donc faite entre les pollutions fortes du sol où les concentrations retrouvées sont supérieures à la dizaine de ppm (ou mg kg^{-1} MS) et les pollutions diffuses. Pour comparaison, les concentrations bruit de fond individuelles des HAP dans les sols sont de l'ordre de 1 à 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de sol sec, ce qui correspond à des concentrations totales en HAP de 500 à 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de sol sec (Achazi & Van Gestel, 2003).

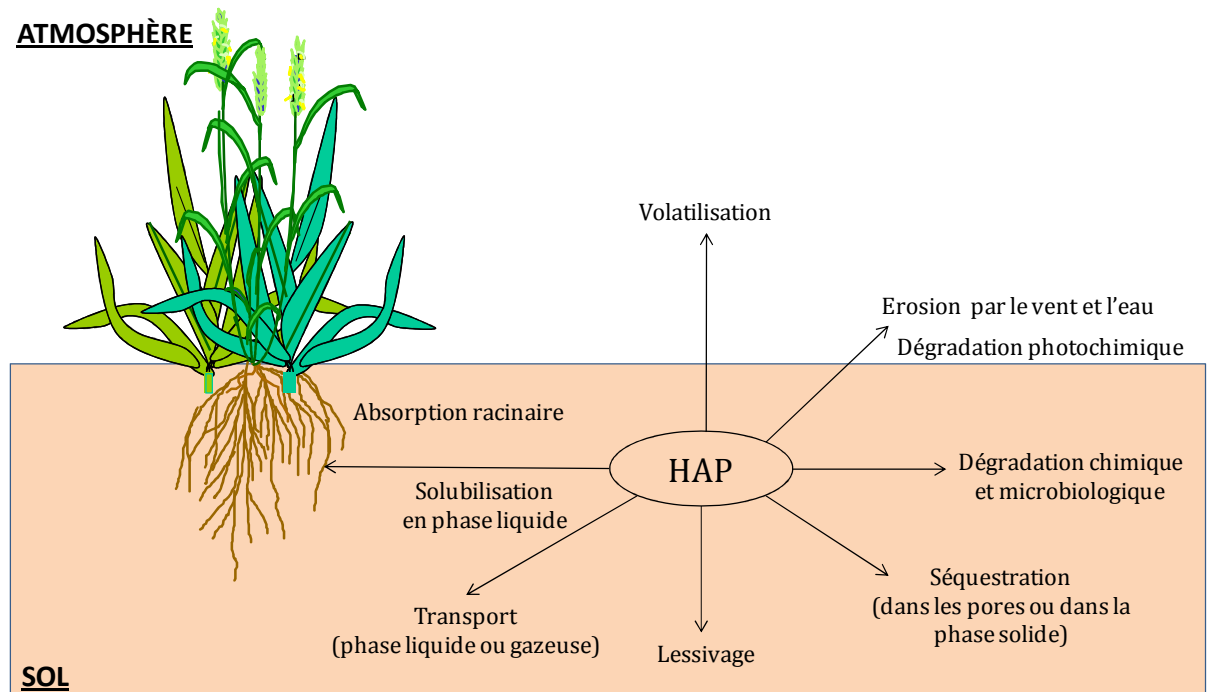


Figure 2-6 : Schéma global du devenir des HAP dans les sols d'après Alcayde et al. (2000)

2.3.1 Transport et séquestration

Il existe 3 mécanismes principaux de transport des polluants dans les sols (Alcayde *et al.*, 2000): le transport en phase liquide, le transport sous effet des mouvements des eaux souterraines après dissolution dans l'eau interstitielle mobile et le transport des polluants volatils en phase gazeuse.

Ces mouvements sont largement compliqués par l'hydrophobicité des HAP et leur capacité de sorption sur la matière organique (MO) (Pignatello & Xing, 1996). La persistance des HAP dans les sols est liée à leur potentiel d'adsorption sur le sol, caractérisé par le coefficient de distribution du carbone organique (K_{OC}) du sol qui à la fois dépend de sa teneur en matière organique et des propriétés du polluant.

Le temps de contact du polluant avec le sol conditionne sa disponibilité chimique et biologique et doit être pris en compte dans l'évaluation des risques liés à la pollution des sols par les composés organiques. La sorption des polluants à la MO est un mécanisme lent, qui peut nécessiter un temps de contact de plusieurs semaines, voire de plusieurs mois (Pignatello & Xing, 1996). On regroupe sous le terme « ageing » (=vieillesse) les processus intrinsèques au sol, autres que la dissipation, qui agissent lorsque la durée de contact avec le polluant augmente. Le résultat final de ce processus est le mouvement des polluants organiques depuis des compartiments accessibles vers des compartiments moins accessibles aux microorganismes (Alexander, 2000). En effet, les polluants se trouvent piégés dans la phase gazeuse de la MO (pores <100 nm et vides) ou dans la phase solide de la MO (Alexander, 2000), ce qui réduit considérablement leur biodisponibilité et favorise la formation de résidus non extractibles (Reid *et al.*, 2000; Uffindell & Meharg, 2007). Ce processus dépend de la nature du sol et est plus important dans un sol argileux que dans un sol sableux (Hatzinger & Alexander, 1995).

2.3.2 Dissipation

2.3.2.1 Dissipation physico-chimique

La dissipation des polluants dans le sol est conceptualisée sous forme de courbe décroissante biphasique constituée d'une première phase de dissipation rapide, puis une phase de dissipation lente. Les HAP les plus volatils (naphtalène) ont une très faible affinité pour le sol et seront éliminés dans l'atmosphère par volatilisation. Le lessivage est en théorie limité par la faible solubilité des HAP. En fait, même les composés les plus solubles sont peu soumis au lessivage. Ainsi, une étude (Amellal *et al.*, 2006b) a démontré que le phénanthrène, malgré une solubilité élevée ($1,1 \text{ mg L}^{-1}$), n'est que peu lessivé dans 2 sols agricoles (2 % de la quantité de départ) même après 6 mois de contact. Le phénanthrène qui s'est fortement adsorbé à la MO du sol n'a qu'une très faible capacité de désorption.

2.3.2.2 Biodégradation

La dégradation des HAP dans les sols fortement pollués se fait majoritairement par voie biologique. D'après Volkering & Breure (2003), la biodégradation des HAP dépend de sa biodisponibilité dans le sol qui varie elle-même selon le log K_{OW} et la dégradabilité intrinsèque du polluant et selon la capacité de dégradation des populations de microorganismes indigènes.

La plupart des bactéries ou champignons du sol capables de dégrader les HAP ont été isolés dans des sols fortement contaminés (Child *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2007). La dégradation se fait majoritairement en aérobiose car de nombreuses espèces de microorganismes sont capables de transformer et minéraliser le noyau aromatique à l'aide des enzymes de la famille des mono et di-oxygénases (Alcayde *et al.*, 2000). La dégradation anaérobie a été observée dans les sols et les sédiments en conditions dénitrifiantes, ou de sulfatoréduction (Andreoni & Gianfreda, 2007) mais son existence *in situ* reste la plupart du temps difficile à démontrer (Volkering & Breure, 2003).

2.3.2.3 Rôle de l'exsudation racinaire et des symbiontes racinaires

La présence de la plante modifie les propriétés chimiques et biologiques du sol environnant par exsudation et par la présence de microorganismes symbiotiques comme les champignons mycorhiziens et les bactéries du genre *Rhizobium*. La rhizosphère constitue la partie du sol sous l'influence des racines. La nature de la rhizosphère dépend de l'espèce végétale considérée, des populations indigènes de microorganismes dans le sol, de l'écosystème.

Les racines exsudent différents types de composés : les mucilages (polysaccharides de grosse taille), des acides organiques et des minéraux. La plupart des molécules excrétées peut servir pour la nutrition des microorganismes libres du sol, et donc augmente l'activité microbienne au voisinage des racines (Fan *et al.*, 2008). Certains composés agissent en tant qu'agents chélatants et diminuent la toxicité des polluants (citrate, malate), d'autres empêchent l'absorption racinaire des polluants (mucilages). L'effet rhizosphère correspond à l'amélioration de la dissipation des polluants stimulée par les exsudats racinaires (Fig. 2-7) (Shann, 1995).

De plus, les racines peuvent s'associer en symbiose avec différents microorganismes pour améliorer leur nutrition en azote (N) ou en phosphore (P) qui sont les éléments les plus limitants dans les sols. Les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF : arbuscular mycorrhizal fungi) forment des mycorhizes avec la majorité des végétaux supérieurs (> 80%) et améliorent leur accessibilité racinaire au P notamment en permettant d'augmenter leur surface de contact avec le sol. Les légumineuses (Fabacées) sont capables d'assimiler l'azote atmosphérique (N_2) grâce aux associations symbiotiques qu'elles forment avec des bactéries du genre *Rhizobium* : les nodules. Toutes ces symbioses imposent un coût de carbone supplémentaire pour la plante.

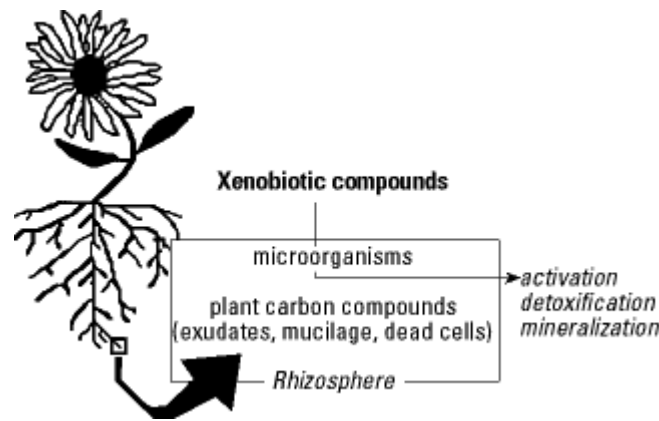


Figure 2-7 : Schéma effet rhizosphère (Shann, 1995)

Il a été montré que la présence de mycorhizes améliore la dissipation des HAP dans les sol fortement contaminés (Binet *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2008). L'amélioration de la dissipation des HAP a lieu directement grâce au prélèvement par la plante et/ou indirectement par stimulation de l'activité microbienne due à l'effet rhizosphère (Gao & Zhu, 2004). Les mycorhizes permettent à la fois d'améliorer la survie des plantes dans les sols contaminés (Leyval & Binet, 1998) et contribuent au prélèvement des HAP du sol par les plantes (Gao *et al.*, 2010).

Les relations plante-microorganismes ont une importance capitale dans le devenir et les effets des HAP dans les sols fortement pollués, mais leur rôle dans la contamination par voie atmosphérique du sol ou à l'échelle d'un microsysteme sol-plante-microorganismes reste encore mal connu.

2.4 Devenir et effets des HAP atmosphériques dans les végétaux

Les HAP atmosphériques peuvent contaminer les plantes directement à partir de l'air par prélèvement au niveau des feuilles et/ou indirectement à partir du sol par prélèvement racinaire (Kipopoulou *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2005) (Fig. 2-8).

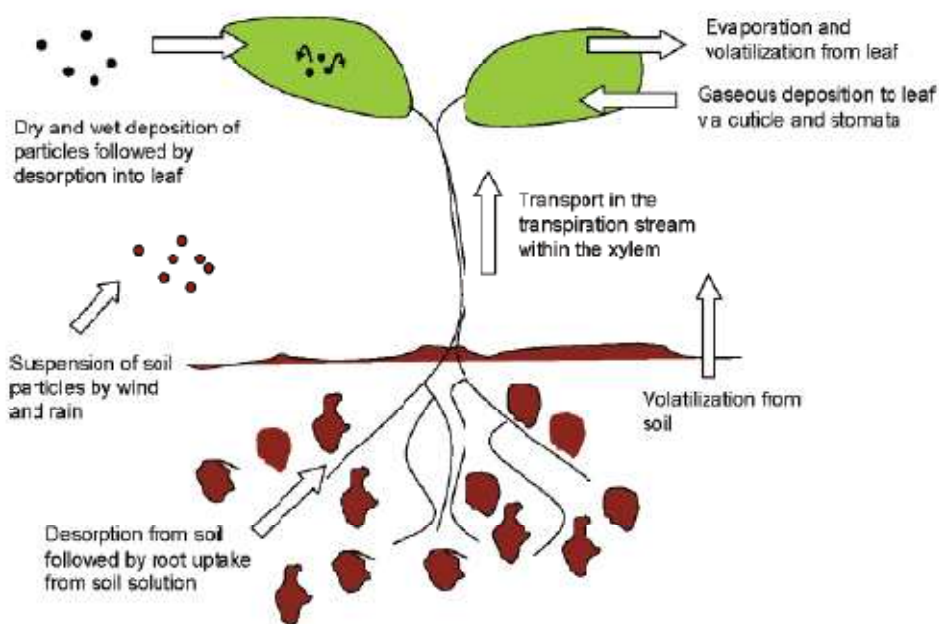


Figure 2-8 : Les principales voies de prélèvement des molécules organiques par les plantes (Collins et al., 2005)

2.4.1 Voie racinaire

Les connaissances sur le prélèvement racinaire des HAP d'origine atmosphérique déposés au sol ont été recueillies dans le cadre de pollutions du sol ou de sédiments à fortes concentrations afin de développer les procédés de phytoremédiation. En revanche, le prélèvement racinaire de HAP a été peu étudié lorsque leurs concentrations dans les sols étaient faibles. Dans des sols fortement contaminés, les HAP s'adsorbent à la surface des racines, peuvent pénétrer dans les tissus racinaires internes, et peuvent même être transloqués vers les parties aériennes (Schwab *et al.*, 1998; Binet *et al.*, 2000; Wild *et al.*, 2005a; Jiao *et al.*, 2007; Srogi, 2007).

L'influence des propriétés physicochimiques des HAP, en particulier de leur K_{OW} et leur solubilité, sur le prélèvement et la translocation des HAP du sol dans les plantes est assez bien documentée (Gao & Ling, 2006; Lin *et al.*, 2007; Yang & Zhu, 2007; Gao & Collins, 2009). Le prélèvement racinaire des HAP serait un phénomène actif (Gao & Collins, 2009) qui augmente avec leur K_{OW} mais qui est limité par le nombre de cycles aromatiques (Fig. 2-9). La translocation racine-feuille des HAP est sous la dépendance du flux de transpiration dans la plante. La capacité théorique de translocation augmente donc logiquement avec la solubilité du composé et diminue avec son K_{OW} . Selon Collins & Finnegan (2010), elle ne serait possible que pour les HAP dont le K_{OW} est compris entre -1 et 5.

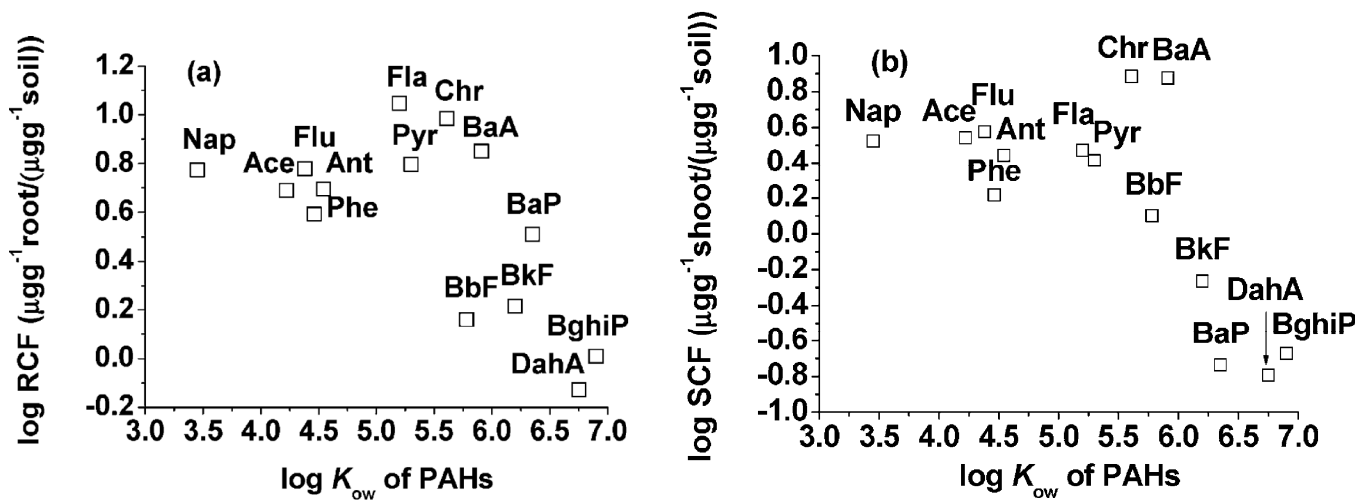


Figure 2-9 : Relation entre le facteur de bioconcentration dans les racines (RCF) ou dans les parties aériennes (SCF) et le $\log K_{ow}$ des HAP (Tao et al., 2009). RCF : Root concentration factor ; SCF : shoot concentration factor

Cependant, les mécanismes fondamentaux de prélèvement des HAP par les racines, de translocation et de stockage, ainsi que les facteurs impliqués sont mal connus alors même qu'ils sont cruciaux dans l'évaluation des risques.

L'observation des mouvements du phénanthrène et de l'anthracène dans les racines de blé et de maïs a été effectuée par Wild et al. (2005a) à l'aide de la microscopie TPEM (two-photon excitation microscopy). Ils entrent radialement dans l'épiderme et pénètrent dans le cortex puis se dirigent vers les parties aériennes par des mouvements latéraux lents qui se font majoritairement par la voie apoplasmique et un peu par la voie symplasmique (Fig. 2-10). La dégradation de l'anthracène en anthrone, anthraquinone et hydroxyanthraquinone est observée directement dans la zone d'élongation et de ramification (Wild *et al.*, 2005a). Ni l'anthracène, ni le phénanthrène n'ont été observés dans les parties aériennes du blé et du maïs après 56 jours d'exposition dans du sable (Wild *et al.*, 2005a). La translocation du phénanthrène et du pyrène vers les parties aériennes a toutefois été observée à de nombreuses reprises comme par exemple chez 12 espèces végétales cultivées 45 jours dans des sols artificiellement contaminés (Gao & Zhu, 2004).

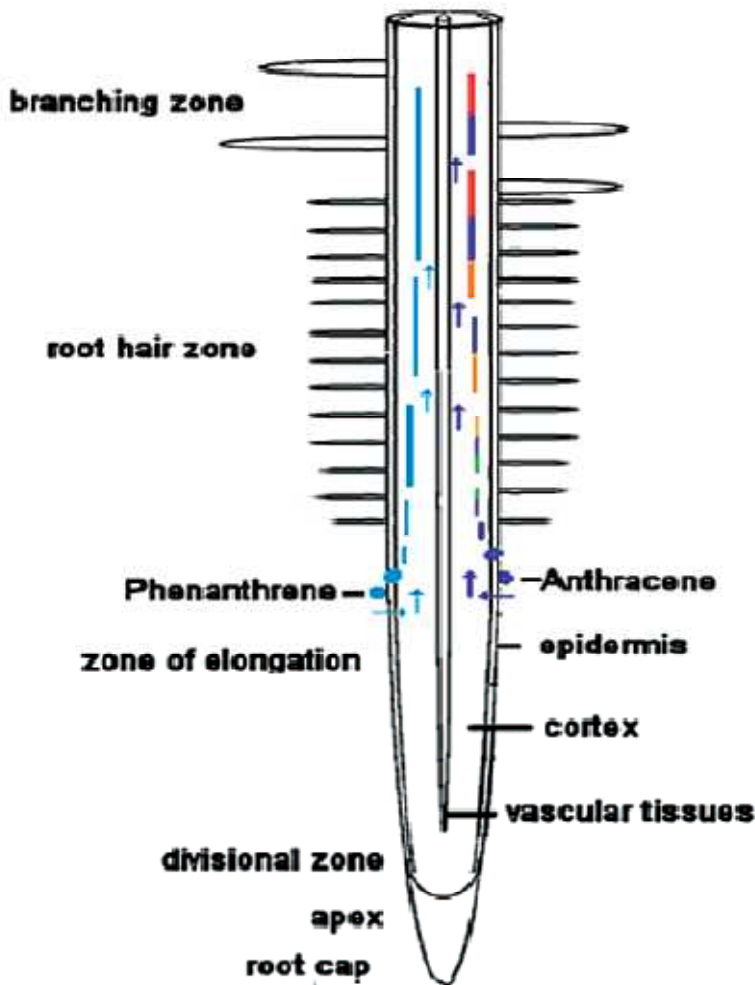


Figure 2-10 : Représentation schématique des mouvements, de la localisation et de la dégradation de l'anthracène et du phénanthrène dans les racines après 56 jours de culture dans du sable contaminé (Wild et al., 2005a). L'anthracène est figuré sur la partie droite et le phénanthrène, sur la partie gauche. Le code couleur est : bleu : anthracène ou phénanthrène ; vert : anthrone ; orange : antraquinone ; rouge : hydroxyantraquinone.

Malheureusement, la plupart des investigations ont été menées en exposant des végétaux aux HAP dans des matrices très différentes du sol, comme des solutions de culture/vermiculite (Gao & Collins, 2009), des cultures hydroponiques (Zuo *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007), ou du sable (Wild *et al.*, 2005a). Cultiver les plantes dans de tels milieux présente des avantages techniques et permet d'identifier les mécanismes fondamentaux du transfert, mais présente l'inconvénient majeur d'éluider la notion de biodisponibilité, qui conditionne le prélèvement racinaire des HAP à partir du sol.

Enfin, la voie racinaire n'a d'importance dans la contamination des végétaux *in situ* qu'en cas de pollution forte des sols (>10-100 mg kg⁻¹ MS) (Collins & Finnegan, 2010).

2.4.2 Voie foliaire

De nombreuses études ont mis en évidence la capacité des végétaux à prélever les HAP atmosphériques par leurs parties aériennes (Simonich, 1994; Kipopoulou *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2006; Wild *et al.*, 2006). Les végétaux occupent une place essentielle dans le cycle global des polluants organiques persistants (POPs) (Simonich & Hites, 1995; McLachlan, 1999). Ils couvrent plus de 80 % de la surface terrestre continentale et leur surface foliaire est en général plus importante que celle du sol sous-jacent. Enfin, les végétaux ont une importante fraction lipidique qui permet une accumulation de substances hydrophobes. Les végétaux ont donc un rôle quantitatif dans l'épuration de l'atmosphère (Simonich & Hites, 1994).

Les concentrations en HAP retrouvées dans les végétaux sont en général corrélées avec les concentrations retrouvées dans l'air. Cette propriété a permis de développer les techniques de biosurveillance végétale. Celles-ci complètent les mesures physico-chimiques réalisées au niveau du compartiment atmosphérique et présentent plusieurs avantages. Notamment, les végétaux sont plus simples à prélever, surtout dans les sites très isolés. De plus, les données sont intégrées sur une longue période car l'accumulation a lieu tout au long de la vie du végétal (période de végétation ou durée totale de vie). Enfin, l'avantage majeur de l'utilisation de matériel biologique consiste à pouvoir étudier les impacts des polluants sur les organismes vivants. Pourtant, cette propriété n'a pas été exploitée en cas d'exposition à la pollution atmosphérique par les HAP.

Les concentrations ainsi que les profils en HAP dans les organes aériens des végétaux diffèrent selon le lieu d'échantillonnage, permettant de distinguer les sites urbains, suburbains et ruraux. Le dosage des HAP particuliers au sein des végétaux donne une information concernant la proximité à des sources d'émissions. En effet, les HAP particuliers sont uniquement retrouvés près des sources d'émissions (Rey-Salgueiro *et al.*, 2008; Sharma & Tripathi, 2008) et pas dans les sites ruraux (Wagrowski & Hites, 1997b). De même, ils sont plus abondants dans les zones de trafic que dans les zones résidentielles (Yang *et al.*, 2007). Les concentrations retrouvées dans les végétaux peuvent également mettre en évidence l'étendue des impacts d'une source, comme par exemple autour d'une usine électrique à base de charbon (Sharma & Tripathi, 2008) ou après une émission accidentelle, comme dans le cas de l'incendie d'une usine chimique (Rey-Salgueiro *et al.*, 2008).

Le devenir des HAP dans les tissus végétaux conditionne à la fois leur transfert dans la chaîne alimentaire et la probabilité d'effets toxiques sur les plantes. Or, les facteurs régissant leur devenir sont assez mal connus car les études sont quasiment toujours effectuées *in situ*, ce qui complique à la fois leur mise en œuvre et l'interprétation des résultats.

L'influence des propriétés physico-chimiques des HAP a fait l'objet de nombreuses études. En particulier, leur partition gaz/particule conditionne leur localisation dans les feuilles (Simonich, 1994; Kipopoulou *et al.*, 1999; McLachlan, 1999; Yang & Zhu, 2007). En effet, les HAP gazeux sont

2. Synthèse bibliographique

capables de pénétrer dans les tissus internes des feuilles tandis que les HAP particuliers restent majoritairement dans la cuticule (McLachlan, 1999; Howsam *et al.*, 2000). Cette distinction entre HAP adsorbé à la cuticule et HAP absorbé dans la feuille est importante puisqu'elle conditionne leur devenir. Les HAP contenus dans la cuticule des feuilles sont mobiles car les couches les plus externes de la cuticule sont sensibles à l'altération. Les HAP contenus dans ces fractions peuvent alors être transférés à la canopée inférieure et au sol par le phénomène de shedding (=versement) (Howsam *et al.*, 2000). Entre 4 et 40 % des HAP émis aux Etats-Unis seraient en permanence récupérés à partir de l'atmosphère vers le sol *via* la végétation par ce phénomène (Wagrowski & Hites, 1997b).

Le devenir des HAP dans les tissus foliaires varie beaucoup selon la localisation des études et les espèces végétales prélevées. Par exemple, Les HAP peuvent être retrouvés majoritairement dans la cuticule, comme c'est le cas dans les feuilles de 6 espèces d'arbres collectés dans la région de Pekin (Chine) (Wang *et al.*, 2008), ou au contraire dans les tissus internes, comme dans des feuilles de maïs récupérés dans un site rural près de Bayreuth (Allemagne) (Kaupp *et al.*, 2000).

La capacité de récupération et de rétention des polluants atmosphériques par les végétaux dépend de leurs propriétés intrinsèques (Bakker *et al.*, 2000; Howsam *et al.*, 2000). De nombreuses études ont tenté d'identifier les paramètres-clés conditionnant cette capacité de rétention. La surface foliaire et le taux de lipides sont les paramètres les plus documentés (Wagrowski & Hites, 1997b; Kaupp *et al.*, 2000). Cependant, les résultats sont contradictoires entre les auteurs. Si la surface foliaire explique les différences observées entre espèces exposées dans le même site (Bakker *et al.*, 1999) et le taux de lipides explique les différences entre les différents tissus d'une même espèce (Simonich, 1994), ces paramètres ne suffisent pas toujours pour normaliser les concentrations (Howsam *et al.*, 2000). Les propriétés de surface des feuilles, telles que la morphologie et la composition de la cuticule et la présence de poils, seraient particulièrement importantes dans le devenir des HAP.

Cependant, comme dans le cas de la voie racinaire, les mécanismes fondamentaux de prélèvement des HAP par les feuilles et de stockage, ainsi que les facteurs impliqués restent encore mal connus. D'après Wild *et al.* (2006), le phénanthrène et l'antracène traversent la cuticule rapidement (24-48h) pour se retrouver dans les tissus internes de l'épiderme et du mésophylle. (Fig. 2-11). Deux voies différentes de transport cellulaire ont été identifiées pour le phénanthrène: la voie apoplasmique chez le maïs ou symplasmique chez l'épinard (Wild *et al.*, 2006). Le phénanthrène a même été observé dans les vaisseaux du xylème dans le maïs (Wild *et al.*, 2004; Wild *et al.*, 2006).

2. Synthèse bibliographique

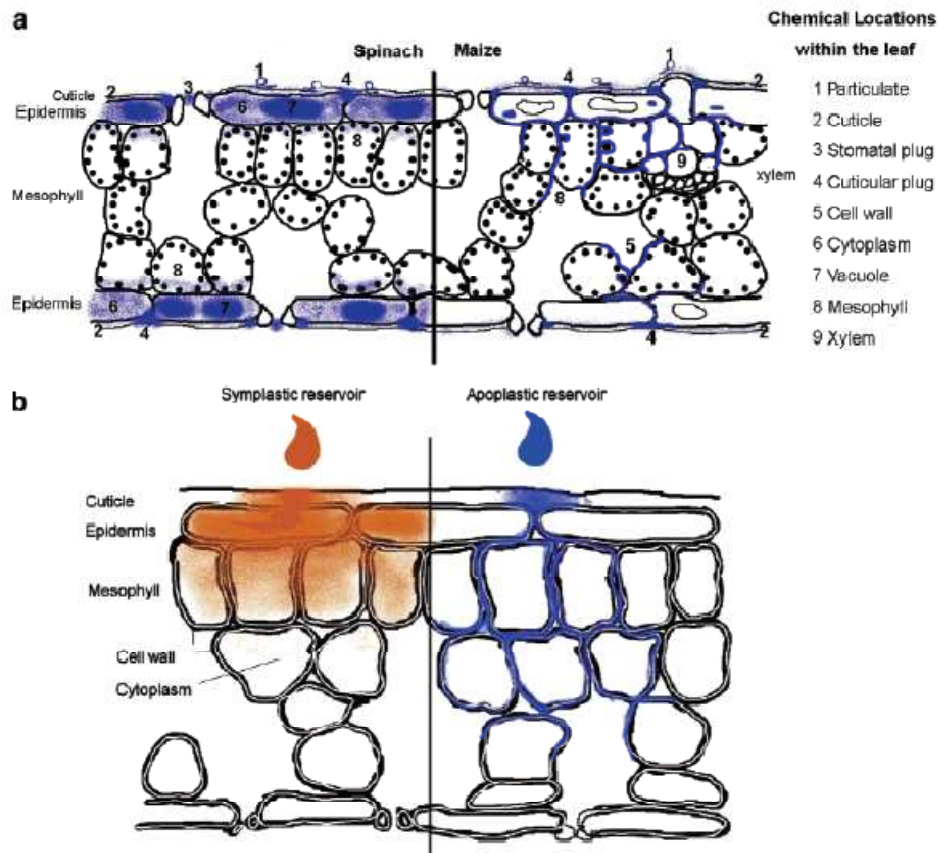


Figure 2-11 : Diagramme schématisant la localisation du PHE dans les feuilles d'épinard (gauche) et de maïs (droite) après 12 jours d'exposition à une atmosphère contaminée par le PHE (Wild *et al.*, 2006)

2.4.3 Effets biologiques et physiologiques des HAP atmosphériques sur les plantes

Les contaminants organiques, considérés comme des micropolluants car ils sont présents en faibles concentrations, peuvent néanmoins exercer des effets toxiques et engendrer un stress chez les végétaux à partir du moment où ils parviennent à pénétrer dans les tissus internes à partir soit des racines soit des feuilles (Verkleij *et al.*, 2009).

In situ, les effets des polluants sont difficilement identifiables car ils sont inclus dans un contexte complexe, comprenant les conditions environnementales et le possible synergisme entre polluants. Des chambres d'exposition ont été conçues pour étudier les effets de l'oxygène, du CO₂, de l'azote, et des BTEX (Greenberg, 2003). Concernant les HAP, certains dispositifs ont été conçus mais n'ont été utilisés que pour des études de bioaccumulation (Peck & Hornbuckle, 2003; Wild *et al.*, 2006; Zuo *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2007).

2. Synthèse bibliographique

Par conséquent, la plupart des expériences ont été menées par vaporisation ou application de solutions aqueuse de HAP (Huang *et al.*, 1996). L'impact des HAP photo-induits (c'est-à-dire transformés par une réaction avec la lumière du soleil) a été étudié depuis une quinzaine d'années sur quelques espèces végétales terrestres (Huang *et al.*, 1996), mais les effets des HAP natifs par la voie de contamination atmosphérique sont encore peu connus. L'application d'anthracène en solution dans du DMSO sur les feuilles du radis ou de la laitue provoquent une diminution de leurs biomasses racinaires et foliaires (Wieczorek & Wieczorek, 2007). Seul un petit nombre d'expériences de phytotoxicité ont été menées sur les HAP atmosphériques par des procédés de fumigation. Sur le pin rouge (*Pinus densiflora*) et la tomate (*Lycopersicon esculentum*), de tels procédés ont mis en évidence un impact sur les paramètres photosynthétiques (Tableau 2-4) (Oguntimehin *et al.*, 2008; Oguntimehin *et al.*, 2010).

Les effets observés après une exposition aérienne aux HAP sont similaires à ceux observés pour la voie d'exposition racinaire où des plantules ont été exposées en boîtes de Petri, en hydroponie, dans du sable ou dans du sol (Aina *et al.*, 2006; Kummerova *et al.*, 2006a; Kummerova *et al.*, 2006b; Liu *et al.*, 2009; Mei *et al.*, 2009; Kummerova *et al.*, 2010) (Tableau 2-4). Il reste cependant difficile de synthétiser les concentrations en HAP et les durées d'exposition utilisées au cours de ces études du à l'hétérogénéité des protocoles utilisés.

Pour tester les pollutions du sol, des cours d'eau et des sédiments par les HAP, des tests de toxicité sur les plantes sont généralement utilisés tels que les tests de germination (Greenberg, 2003). La croissance et la reproduction constituent d'autres critères d'évaluation pertinents mais plus contraignants. Si l'hydroponie simplifie largement ces tests de croissance, sa représentativité environnementale reste discutée.

Quelles que soient les concentrations utilisées et les durées d'exposition sélectionnées, il existe des effets biologiques et physiologiques communs aux deux modes d'exposition par voie racinaire et foliaire: une diminution de biomasse, une perturbation de la photosynthèse et l'induction d'un stress oxydatif.

2. Synthèse bibliographique

Tableau 2-4: Synthèse des effets biologiques et physiologiques en réponse à une exposition aux HAP par voie foliaire et racinaire. BaP : Benzo(a)pyrène ; NAP : naphthalène ; FLT : fluoranthène ; ANT : anthracène ; PHE : phénanthrène ; PYR : pyrène ; Chl a, b : chlorophylle a et b ; F_v/F_m : efficacité photochimique du Photosystème II ; A_{max} : assimilation du CO_2 à lumière saturante, F_0 : fluorescence initiale ; g_s : conductance stomatique ; RuBisCO : Ribulose Bis Phosphate Carboxylase Oxygénase ; SOD : Superoxyde Dismutase ; CAT : catalase ; PPO : polyphenol oxydase ; POD : peroxydase ; APX : ascorbate peroxydase ; GSH : glutathione ; OH^\bullet scavenger

Exposition	HAP	Espèce végétale cible	Germination	Croissance	Photosynthèse	Stress oxydatif	Références
Voie racinaire	BaP/NAP	<i>Trifolium repens</i>		Biomasses foliaire et racinaire =			(Aina <i>et al.</i> , 2006)
	FLT	<i>Pisum sativum</i>		Biomasses foliaire et racinaire \downarrow	Chl a et b, caroténoïdes \downarrow , F_0 , F_v/F_m \downarrow , Φ_P \downarrow , Réaction de Hill altérée		(Kummerova <i>et al.</i> , 2006)
	ANT	<i>Lactuca sativa</i> , <i>Raphanus sativus</i>		Biomasse racinaire \downarrow Root:shoot \downarrow	Pas d'effet		(Wieczorek & Wieczorek, 2007)
	FLT	<i>Pisum sativum</i>	Taux de germination \downarrow	Longueur racines \downarrow	F_0 , F_v/F_m \downarrow , Φ_P \downarrow , Réaction de Hill altérée		(Kummerova <i>et al.</i> , 2008)
	ANT	<i>Cichorium intybus</i> (racines transformées)		Longueur racines \downarrow	Protéines totales \downarrow (racines)	Activité SOD =, Péroxydation des lipides	(Debiane <i>et al.</i> , 2008)
	PHE/PYR/BaP	<i>Festuca arundinacea</i> , <i>Bouteloua curtipendula</i> , <i>Cenchrus ciliaris</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Rhynchelytrum repens</i>	Taux de germination =	Longueur racines et tiges \downarrow , Taux de survie \downarrow			(Reynoso-Cuevas, 2008)
	PHE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Taux de germination \downarrow	Longueur racines \downarrow , Déformation et collapse des membranes mitochondriales et chloroplastiques	<i>chl a</i> et <i>b</i> \downarrow	Activités SOD, POD, APX, CAT \uparrow H_2O_2 \uparrow , GSH \uparrow , Péroxydation des lipides	(Liu <i>et al.</i> , 2009)
	PHE	<i>Camellia Sinensis</i>		Processus de sénescence accéléré	Protéines totales \downarrow , Sucres totaux \downarrow (feuilles)	Formation ROS, Activités SOD, PPO, POD, CAT \uparrow	(Mei <i>et al.</i> , 2009)
Voie foliaire	ANT	<i>Lactuca sativa</i> <i>Raphanus sativus</i>		Biomasses foliaire et racinaire \downarrow , Root:shoot \downarrow	intensité PS \downarrow , g_s \downarrow		(Wieczorek & Wieczorek, 2007)
	PHE/FLT	<i>Pinus densiflora</i>		Domages foliaires	Chl a et b, caroténoïdes \downarrow ,	ajout de mannitol* \downarrow effets négatifs	(Oguntimchin <i>et al.</i> , 2008;
	FLT	<i>Lycopersicon esculentum</i>		(chloroses, nécroses)	RuBisCO \downarrow , A_{max} \downarrow , g_s \downarrow , F_0 \uparrow , F_v/F_m =		Oguntimchin <i>et al.</i> , 2010)

3 MISE AU POINT DU DISPOSITIF DE POLLUTION ATMOSPHERIQUE



Figure 3-1 : Photographie présentant le dispositif d'exposition

3.1 Présentation

Les recherches bibliographiques préliminaires à nos travaux nous ont conduit à faire le constat que les études sur le transfert et les effets des HAP atmosphériques sur les écosystèmes terrestres étaient limitées. En effet, peu de dispositifs expérimentaux ont été mis au point pour créer expérimentalement des ambiances de contamination atmosphérique d'une façon suffisamment fiable et reproductible. Or, le développement d'enceintes d'exposition opérant avec des flux de polluants contrôlés et permettant de cultiver différentes espèces végétales dans des conditions climatiques définies est primordial pour pouvoir disposer d'un outil d'étude pertinent afin d'identifier les mécanismes fondamentaux du transfert des HAP dans les compartiments environnementaux mais aussi les effets sur les plantes. De plus, il était nécessaire de pouvoir décrire précisément la circulation des flux d'air au sein de ces enceintes pour pouvoir décrire la diffusion des contaminants dans les différents compartiments édaphiques et biologiques.

Dans le cadre de nos travaux de recherche, un dispositif expérimental constitué d'enceintes d'exposition cylindriques a donc tout d'abord été développé (Fig. 3-1). Ce dispositif a été conçu pour pouvoir générer des pollutions en HAP sous forme gazeuse, qui constitue la voie préférentielle de

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

contamination des végétaux. Plus précisément, nous avons centré notre étude sur les HAP formés de 3 cycles, qui sont prépondérants dans l'atmosphère (Wagrowski & Hites, 1997b; Gioia *et al.*, 2006). Initialement, deux HAP, le phénanthrène (PHE) et le fluorène (FLU) avaient été choisis, et des expériences préliminaires ont donc été menées avec ces 2 molécules. Finalement, seul le PHE a été retenu pour la suite des expérimentations car son devenir dans les sols et les plantes est mieux documenté que celui du FLU (Amellal *et al.*, 2006a; Wild *et al.*, 2006; Chiapusio *et al.*, 2007).

L'objectif principal à atteindre était de valider ce dispositif expérimental pour son utilisation dans l'étude du transfert et des effets de polluants atmosphériques sur des microsystemes sol-plante-microorganismes ce qui impliquait :

- la caractérisation des flux, et en particulier de vérifier que l'exposition au polluant est homogène dans toute l'enceinte
- de reproduire des concentrations au sein de l'enceinte s'approchant au plus près des concentrations retrouvées *in situ* en cas de pollution
- de mettre au point une méthode d'échantillonnage et de suivi des concentrations atmosphériques en HAP adaptée aux enceintes d'exposition.

Un travail conséquent de mise au point a donc été nécessaire pour fabriquer des enceintes adaptées à la culture des végétaux où une pollution atmosphérique en HAP proche des conditions *in situ* était créée, puis pour définir, calibrer et valider des capteurs passifs capables d'échantillonner et de mesurer les concentrations atmosphériques en PHE dans les enceintes. Pour calibrer la réponse de ces capteurs passifs, la comparaison avec les résultats obtenus à l'aide des méthodes actives a rapidement été exclue car la mesure active des polluants dans les enceintes aurait perturbé le flux et l'exposition. Aucun échantillonneur passif n'étant disponible dans le commerce, il a donc été nécessaire de développer des capteurs spécifiques en utilisant comme modèle les tubes Radiello initialement développés pour le dosage des concentrations de BTEX dans l'air. Le charbon actif contenu dans les tubes et qui permet d'adsorber les composés organiques volatiles s'est révélé efficace pour surveiller les concentrations en PHE dans l'air. Des expérimentations complémentaires ont ensuite dû être réalisées pour optimiser la géométrie des capteurs (diamètre et longueur des tubes), ajuster la quantité de charbon actif, trouver le milieu de séparation adéquate entre l'absorbant et le milieu extérieur et adapter la méthode d'extraction.

Le développement de la méthode de calibration a été réalisé en collaboration avec le laboratoire CNRS FEMTO. Pour étudier les flux dans les enceintes et calibrer les échantillonneurs passifs, nous avons choisi une double approche mêlant expérimentation et méthode mathématique de simulation.

Dans un premier temps, une pollution artificielle par le PHE atmosphérique a été créée dans les enceintes dans lesquelles des capteurs et du sol ont été exposés pendant 2 semaines afin de tester la

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

fiabilité, la reproductibilité et le comportement de ces échantillonneurs et également de déterminer expérimentalement le transfert du PHE dans les sols.

Un modèle mathématique qui simule les flux de PHE dans les enceintes a finalement été développé en parallèle et a été confronté aux résultats expérimentaux. Le Computational Fluid Dynamic (CFD) permet de modéliser les flux de molécules et leurs évolutions temporelles et spatiales à partir de leurs propriétés physico-chimiques et des dimensions de l'objet. Des puits comme le sol et la plante peuvent également être ajoutés.

En résumé, cette étude a permis de valider la pertinence de notre dispositif pour pouvoir mener des études sur le transfert et les effets des HAP atmosphériques. En particulier, ce travail de méthodologie a permis de montrer que les concentrations en PHE atmosphérique :

- étaient distribuées de manière constante et homogène dans la zone où les microsystèmes étaient placés.
- étaient contrôlables en ajustant la quantité de PHE mise au départ dans l'évaporateur et permettaient de fait de créer des contaminations réalistes, c'est-à-dire de simuler des concentrations proches de celles retrouvées *in situ*.
- pouvaient être mesurées à l'aide des échantillonneurs passifs développés dans ce but.

3.2 **An exposure device to study atmospheric deposition of PAHs in environmental compartments: Development and validation in microcosms with phenanthrene**

Dorine Desalme ^{*1}, Jean-Claude Roy ², Philippe Binet ¹, Geneviève Chiapusio ¹, Daniel Gilbert ¹, Marie-Laure Toussaint ¹, Laurent Girardot ², Nadine Bernard ¹

¹ *Université de Franche-Comté, CNRS, UMR 6249, Chrono-environnement, BP 71427, F-25211 Montbéliard cedex, France*

² *Institut FEMTO-ST, UMR 6174, Université de Franche-Comté, 2, avenue Jean Moulin, 90000 Belfort, France*

Soumission prévue en septembre 2011

Abstract

Few experimental devices have been designed to simulate atmospheric pollution by PAHs in controlled conditions. This study aimed at validating small-scale exposure chambers to study effect on and transfer to environment of atmospheric PAHs. The work involved testing 1) the homogeneous distribution of atmospheric concentrations in chambers, 2) the reliability and reproducibility of monitoring of atmospheric phenanthrene (PHE) concentrations by passive samplers. A dual approach coupling experiment and simulations was selected to provide comprehensive validation of our experimental device. PHE was used as a model PAH to generate atmospheric PHE pollution (11-90 $\mu\text{g m}^{-3}$) generated in chambers over the course of two weeks. Passive air samplers (PAS) and soil pots were placed at different locations in exposure chambers. In parallel, computational fluid dynamic simulation (CFD) was used to characterize atmospheric PHE concentrations in chambers and was compared to experimental results. PHE concentrations were distributed homogeneously within the chambers and provided the same exposure conditions wherever the soil pots and passive samplers were placed. PAS measurements and PHE soil extraction results were in accordance with the simulation, validating the exposure device and the monitoring of atmospheric PHE exposure by PASs. Relevance of this device in environmental exposure conditions is discussed.

Key-words: exposure chambers, atmospheric pollution, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), phenanthrene (PHE)

3.2.1 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are semi-volatile persistent organic pollutants (POPs) of environmental concern because of their mutagenic and carcinogenic properties (Wild & Jones, 1995). While the effects of acute exposures to PAHs are well documented (Sverdrup *et al.*, 2001; Sverdrup *et al.*, 2002; Paskova *et al.*, 2006), especially in soils, chronic exposures have been scarcely investigated even if this exposure regime was the most common and probably the most harmful. Primarily emitted into the atmosphere by incomplete combustion of fossil fuel and biomass, they are now found in all environmental compartments including air, soil, water, vegetation and animals because of atmospheric deposition of gas and particles. PAH concentrations in air varied according to the proximity to emission sources, i.e., background and rural areas (from 40 pg m⁻³ to 20 ng m⁻³ in Europe, $\Sigma_{7\text{PAHs}}$) (Gioia *et al.*, 2006), urban areas (136 ng m⁻³ in Chicago, $\Sigma_{13\text{PAHs}}$) and near emission sources (1160 ng m⁻³ near aluminum smelters in Quebec, $\Sigma_{13\text{PAHs}}$) (Hafner *et al.*, 2005). The transfer of PAHs from air to the soil-plant system is a crucial step conditioning their entry into the food chains and the risks for human health and organisms (Simonich, 1994; Kipopoulou *et al.*, 1999).

The partitioning of PAHs between air and the soil-plant system has been mainly studied *in situ* but the environmental fate of airborne PAHs vary greatly in response to environmental variables such as temperature, relative humidity, atmospheric mixing by wind and rainfall (Simonich, 1994). It results that field studies are complicated by many unpredictable and variable environmental factors that prevent a clear identification of the mechanisms of PAH transfer in the soil-plant system. Besides environmental variables, the effects of atmospheric PAHs on organisms are complicated by the possible interactions with other pollutants (whatever its nature, i.e. organic or metallic). Consequently, although simplified, exposure experiments in controlled conditions are required to identify the mechanisms involved in the transfer and the biological effects of atmospheric PAHs in the different environmental compartments of terrestrial ecosystems.

Few experimental devices exist to expose plants to pollutant-enriched atmosphere. Large chambers have been developed to examine the effects of climate changes (Peck & Hornbuckle, 2003) - such as temperature, humidity and light - or to determine the physicochemical properties involved in the partitioning of PAHs (Maddalena *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2007). Such devices need specific exposure facilities such as growth rooms specifically reserved to establish pollution conditions. Smaller exposure chambers have been also described. They investigated either the transfer of atmospheric PAHs specifically into the foliage (Wild *et al.*, 2007) or the fate of PAHs in the different plant compartments but only on plants grown in hydroponics and not in soil (Lin *et al.*, 2006; Zuo *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). Even if most of exposure experiments were performed assuming air concentrations relevant for specific field conditions, they suffered from biases, e.g., they did not provide constant exposure to contaminated air flow, and did not investigate chronic exposures (duration of several weeks or months).

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

Exposure assessment in the field and in experimental conditions has increasingly used the passive sampling technology (Bernard *et al.*, 1999; Tao *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2008). This method is based on the free diffusion of molecules from the sampling material to the sorbent material (Gorecki & Namiesnik, 2002). In addition to their low cost and power-free use (Krupa & Legge, 2000; Gorecki & Namiesnik, 2002), they permit to calculate time-weighted average (TWA) concentrations. Hence, an integrative characterization of the exposure by the product of concentration and exposure duration is more representative than instantaneous measurements based on the frequency of exposures and the peak concentrations, especially for pollutants such as PAHs that act like accumulative phytotoxic elements (Gorecki & Namiesnik, 2002). In addition, passive samplers are particularly preferred in controlled conditions because they do not disturb the sampling region and are easy to handle. Gaseous PAHs were usually collected on absorbent material, such as polyurethane foam (PUF) or activated carbon (AC) (Begerow *et al.*, 1995; Zuo *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007).

Generally, passive air samplers (PAS) validation and calibration were performed either by comparison with active sampling results, or by experimental kinetic calibration (Ouyang & Pawliszyn, 2007). However, active sampling of PAHs is scarcely developed (Peltonen & Kuljukka, 1995) and active and kinetic approaches are both complex, costly, and time-consuming. To overcome these disadvantages, the computational fluid dynamics (CFD) software FLUENT (Fluent, 2009) has been used to simulate airflow and contaminant dispersion. FLUENT solves equations for mass, momentum, energy and species conservation in the considered domain with the finite volume method (Patankar, 1980). CFD tools have been successfully used since two decades for the determination of gaseous pollutants (Clausen *et al.*, 2010) or contaminant particle concentrations (Tian *et al.*, 2006) in indoor environment. The sampling rate of some passive air samplers in freestream has been also simulated with CFD tools for different geometries (Thomas *et al.*, 2006). Experiment and CFD tools are complementary approaches. Nevertheless, the advantages of CFD compared with experimentation are 1) the more complete results because air concentrations, airflow pattern, velocity and other properties can be estimated at all grid points throughout the domain of interest; 2) the more rapidly obtained results; 3) to avoid problem with contaminant toxicity, explosivity and flammability; 4) its potential accurate representation of contaminant distribution in enclosed spaces (Lee *et al.*, 2002).

The work involved 1) the characterization of PHE concentrations in chambers 2) the experimental validation of passive samplers to monitor PHE concentrations and 3) the experimental study of PHE transfer in soil. Phenanthrene (PHE), a 3-ringed PAH, was selected as model PAH because of its specific properties (molecular weight: 178.2 g mol⁻¹; saturation vapor pressure: 0.02 Pa at 25°C), its ubiquity in air (Wagrowski & Hites, 1997b; Gioia *et al.*, 2006), and its frequent use in controlled conditions (Chiapusio *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010; Weisman *et al.*, 2010; Chiapusio *et al.*, 2011). Passive air samplers and simplified microsystems (soil pots) were exposed to atmospheric PHE over the course of two weeks in exposure chambers.

3.2.2 **Materials and methods**

3.2.2.1 Physical description and characterization of the exposure chambers

The experimental device consisted of 32-L cylindrical exposure chambers constructed from polymethyl methacrylate (65 cm high \times 25 cm diameter). Four exposure chambers were placed under the same fumehood and were linked by means of pipes to the same pump generating a continuous air flow (2.25 L min^{-1}) controlled by a flowmeter. In each chamber, the air entered the exposure chamber through a central bottom tube placed above the pot holder, and exited toward the fumehood through a central top exit hole. Atmospheric PHE pollution was generated by the evaporation of the PHE pills (average pill weight = $130 \pm 10 \text{ mg}$) in evaporators placed before each chamber. Pills were weighed at the beginning and at the end of the experiment. Inlet PHE concentrations in chamber air ($\mu\text{g PHE m}^{-3}$) were calculated as the ratio of the pill evaporation rate ($\mu\text{g PHE min}^{-1}$) over the pump flow ($\text{m}^3 \text{ min}^{-1}$). These calculated inlet concentrations were used to develop the mathematical model (§ 2.6.).

3.2.2.2 Particle Image Velocimetry (PIV)

The PIV technique (TSI Europe, Marseille, France) consists in the comparison of the position of tracer particles between two successive images of a fluid flow in a well definite plane (Adrian, 1991). Oil droplets ($\approx 1 \mu\text{m}$) supplied by a smoke generator were used as tracer particles and were injected in the inlet pipe. The small size of these particles leads to the assumption that they faithfully follow the fluid displacements. The vertical median plane of the exposure chamber constituted the investigation plane and was created by a laser light sheet. A charge coupled device (CCD) camera captured the particles scattering light on two image frames corresponding to a double laser pulse. The displacements of particles between two laser pulses were computed with cross-correlation techniques and their values, together with the time delay permit the determination of the velocity pattern in the investigation plane (Stamhuis, 2006).

3.2.2.3 Exposure scenario

Four exposure treatments were tested: 3 “polluted” with PHE-enriched air (PA, PB, and PC) and a control with ambient air (T0). The evaporators of the 4 chambers were filled with a different number of pills (T0, 0 pill; PA, 1 pill; PB, 2 pills; and PC 4 pills) and were wrapped with aluminum foils to prevent photodegradation. This entire device (4 chambers and 1 pump) was repeated in triplicate, under 3 distinct fume hoods. The day/night cycle during exposure experiment (2 weeks) was programmed for 12h of light at 20°C and 12h of dark at 17°C . Temperature, light and hygrometry

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

were monitored in each chamber throughout the experiment by data loggers (HOBO® data logger temp/RH/light/ext channel; Prosensor, France).

Four plastic pots (12 cm high × 8 cm diameter) were put into each exposure chamber. They were filled with 300 g DW of an agricultural soil (Maconcourt, France) previously 2 mm-mesh-sieved. Relative humidity remained between 50 and 60% in the chambers. Humidity of soils was kept constant by a daily water supply in order to maintain the water level constant in the saucers (water rose in soil pots by capillarity).

3.2.2.4 Air and soil sample processing

The air was collected from each chamber all along the experiment by passive air samplers (PASs). PASs consisted of glass tubes (1.6 cm³, 2 cm length × 1 cm diameter) containing 0.8 g of activated carbon (AC) (Merck). PAS were opened at both ends and activated carbon was held inside by gauze (air-AC exchange surface: 2 × 0.8 cm²). PAS were installed horizontally in the top part of the chambers by means of glass rods, each one planted in a soil pot (Fig. 3-2). For PA, PB and PC treatments, PASs were placed at 4 different heights (namely h1, h2, h3 and h4 placed respectively at 14 cm, 19 cm, 24 cm and 29 cm high above the pots), i.e. 16 PASs per chamber. For T0 treatment, PASs were placed at only 1 height (at 14 cm), i.e. 4 PASs per chamber. In each chamber, one PAS was also placed near the exit hole to monitor the PHE concentration of the outflowing air. Blanks were placed under the 3 fume-hoods and in the adjacent laboratory rooms. After 2 weeks of exposure, the 172 PASs were removed from the chambers and AC was conditioned in amber glass bottles at -25°C until analysis. PHE was extracted from AC using 15 mL of carbon disulphur (AnalaR Normapur, VWR Prolabo, purity>99%) under 10-second agitation.

The soil from each of the 48 pots was divided into 2 layers according to depth: the top (0-1 cm) and the deep (1-10 cm) layers. Soil samples were dried at room temperature (18°C) under fumehood aspiration, then ground with mortar and pestle, and finally conditioned in aluminum boxes at -80°C. PHE was extracted twice from 50 g DW of soil with 60 mL of cyclohexane with an Accelerated Solvent Extraction (ASE 100, Dionex, France) during 14 minutes (100°C, 100 bars). All the air and soil extracts were filtered (Teflon syringe filters, 0.45 µm) before 1 µL was injected in a stationary phase (capillary column; 25 mm long × 0.22 mm diameter; 70 to 300 °C; 20 min; 1 mL min⁻¹) of a gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GCMS-QP5050A; Shimadzu, France). PHE retention time was 14.6 min. PHE concentrations measured in PAS were expressed in ng sampler⁻¹. PHE concentrations in soil were expressed in µg g⁻¹ DW.

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

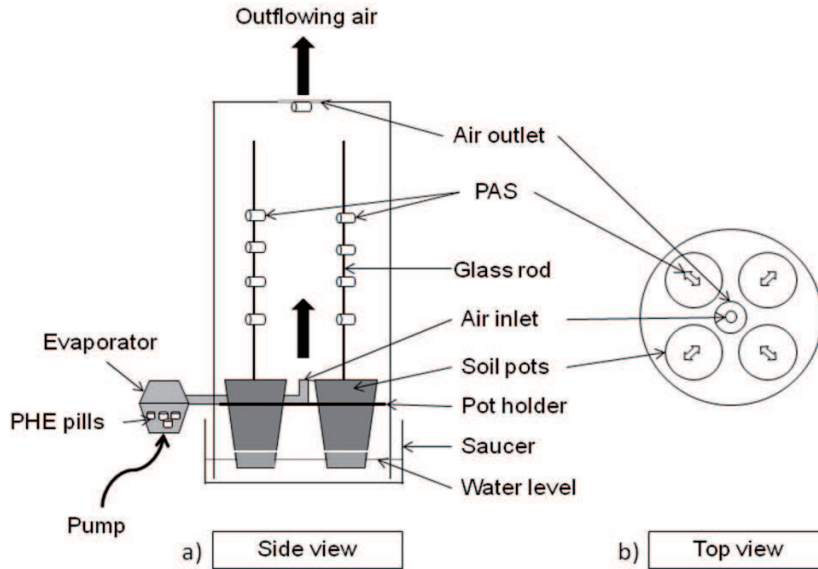


Figure 3-2 : Schema of an exposure chamber (a) Side view; (b) Top view. Air penetrates into the chamber by a central bottom tube connected to the generating pump and go out through a central top exit toward the fumehood. Before reaching each chamber, air passes through an evaporator, which is left empty (control) or filled with PHE pills (polluted treatments). Passive air samplers (PAS), represented as arrows in the top view schema, are fixed on glass rods planted in each pot of soil, at 4 different heights. PAS are oriented radially related to the air entry.

3.2.2.5 Statistical analyses

Each treatment (T0, PA, PB, and PC) was deployed in triplicate (under 3 fume-hoods). Values for each treatment were thus expressed as the mean \pm standard deviation ($n=3$), each mean represented the mean value of 4 pseudo-replicate pots. Friedman tests were conducted to compare the PAS measurements between the different heights and the different position.

3.2.2.6 Numerical simulation

PHE air concentrations

The PHE concentration pattern in the exposure chamber was determined with the Computational Fluid Dynamics (CFD) code FLUENT that allows predicting the transient distribution of a physical quantity ϕ in a 3D domain by solving the following transport equation:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x_j} (u_j \phi) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left(\Gamma_\phi \frac{\partial \phi}{\partial x_j} \right) + S_\phi \quad (1)$$

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

where ϕ stands for mass or velocity components or PHE concentration in air; u_j stands for each velocity component ($j = 1, 2, 3$), Γ_ϕ is the diffusion coefficient of ϕ and S_ϕ is the source or sink term of ϕ .

Spatial and temporal discretizations were used to solve these equations and the values of ϕ were determined for the nodes of a meshing of the fluid domain (Fig. 3-3) and for each time step (Fluent, 2009).

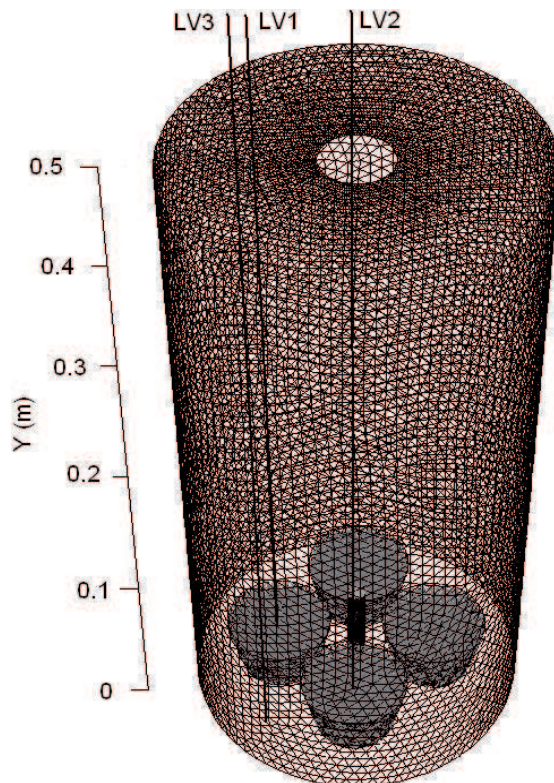


Figure 3-3 : View of the meshing of the exposure chamber with the location of the 3 vertical lines (VL1, VL2, and VL3)

The laminar flow regime was considered inside the experience chamber as the Reynolds number based on both the inlet pipe diameter and the inlet flow rate has an order of magnitude of 10^2 . Boundary conditions for the inlet pipe were determined from the experimental setup (velocity profile and PHE inlet concentrations). The outlet at the top of the chamber was considered as an outflow section with null normal gradient for ϕ . The soil was considered as a porous medium wherein the transport equation for u_j is reduced to the Darcy law (because of the very low expected values for u_j^2 , the quadratic inertial terms can be neglected):

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

$$\frac{\partial p}{\partial x_j} = -\frac{\mu}{K} u_j \quad (2)$$

Where p is the pressure, μ the dynamic viscosity of air ($\mu = 1.8 \cdot 10^{-5} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and K the permeability of the soil ($K = 5 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2$). The sink term of PHE in the soil S_{PHE} was $9.76 \cdot 10^{-12} \text{ kg m}^{-3} \text{ s}^{-1}$, as determined from preliminary experiments. The velocity fields and the PHE concentrations were computed with a one-hour time step.

Passive air samplers (PASs)

The quantity of PHE adsorbed in AC was simulated in a domain whose dimensions correspond to the volume of the passive air samplers (PASs), *i.e.* cylinders of 1 cm diameter \times 2 cm long. The AC was considered as a porous medium whose porosity k was experimentally determined at 0.75. The presence of the impermeable glass tube containing AC led to the choice of a null radial mass flux as boundary condition on the external side of the cylinder. For the two lateral sides of the cylinder, the PHE concentration in the porous medium was considered as equal to the concentration in the surrounding air of the sampler. The very low values of the air speed inside the exposure chamber ($< 0.05 \text{ m s}^{-1}$) led to an insignificant air speed expected value through AC, consequently only diffusive terms were considered for the modelling of the transport of PHE in the PASs. This equation (Murakami *et al.*, 2003) was:

$$k\rho_a \frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x_j} \left(\frac{D}{\rho_a} \frac{\partial C}{\partial x_j} \right) - \rho_{PAS} S \quad (3)$$

Where ρ_a is the density of air, ρ_{PAS} is the density of the activated carbon, C is the concentration of PHE in air, D is the diffusivity of PHE in air and S is the sink term of PHE adsorbed by the activated carbon. This term was determined using the Linear Driving Force model (Murillo *et al.*, 2004) which considers the kinetics of adsorption rate as a linear function of the equilibrium concentration C_S in AC :

$$S = \frac{\partial C_{PAS}}{\partial t} = k_p (C_S - C_{PAS}) \quad (4)$$

Where C_{PAS} is the PHE concentration in the sampler and k_p is an adjustable parameter that depends on the properties of the activated carbon and corresponds to the response time of PHE adsorption.

For low values of PHE concentration in air, the value of C_S is determined with the Henry model (or linear model) :

$$C_S = k_H C \quad (5)$$

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

Where k_H is Henry's coefficient that also depends on the properties of the activated carbon. Equations (3) and (4) are simultaneously solved with the Fluent solver and the coupled values of C and C_{PAS} were determined for each node of the domain.

3.2.3 Results

3.2.3.1 Experimental results

3.2.3.1.1 Determination of PHE concentrations in air and monitoring by PASs

To generate atmospheric PHE pollution, pills were introduced inside an evaporator at the beginning of the experiment (initial mass, m_0), and were submitted to evaporation as covered by a continuous airflow. After 2 weeks, pills were re-weighed and evaporation rates were calculated assuming a constant evaporation rate throughout the experiment period. Inlet PHE concentrations varied from 13 to 90 $\mu\text{g m}^{-3}$ (Table 3-1) and were significantly correlated with m_0 ($r^2= 0.86, P<0.01$) (Fig. 3-4 a).

PHE uptake by PASs was simulated for each treatment (PA, PB and PC) over the exposure period. The theoretic value of the response time $k_P = 0.002 \text{ s}^{-1}$ (see Eqn.4) was chosen as the mean value from the results presented by Murillo *et al.* (Murillo *et al.*, 2004) and the value of Henry's coefficient $k_H = 5.7 \cdot 10^4$ (see Eqn. 5) was determined from the experimental results.

Tableau 3-1 : PHE concentrations recovered in the different compartments after 2 weeks of exposure to atmospheric PHE in the different treatments (PA, PB, PC). PAS results corresponded to the means \pm sd of the 4 PASs placed at the same height. h1,h2, h3 and h4 corresponded to the 4 tested heights, i.e. respectively to 14 cm, 19 cm, 24 cm, and 29 cm above the pots. m_0 corresponded to the initial mass introduced in the evaporator.

Treatment	Pills		Inlet [PHE] _{air} $\mu\text{g m}^{-3}$	PAS					Soil	
	nb	m_0 mg		h1	h2	h3	h4	Mean	Top	Deep
PA	1	117.5	13.3	0.4	0.6	0.4	0.5	0.5	54	5
		121.7	20.8	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	77	8
		136.0	35.5	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	73	9
PB	2	146.0	39.7	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	73	6
		127.5	47.6	0.7	0.9	0.8	0.9	0.8	122	13
		142.4	63.4	0.9	1.0	1.0	1.2	1.0	99	12
PC	4	136.2	77.7	1.9	2.0	2.0	2.0	2.0	147	7
		137.5	80.8	2.1	1.7	1.9	2.1	2.0	158	6
		127.1	90.2	2.2	2.5	2.5	2.5	2.5	261	8

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

All PASs placed inside polluted chambers collected PHE. The PASs accumulated a comparable amount of PHE in the same chamber regardless of their location above one pot or the other (Friedman tests, ns). Then, the 4 PASs placed at the same height could be considered as quadruplicates. The reproducibility of PASs, calculated as the coefficient of variation (CV %) between the quadruplicates, varied from 4 to 26 %. The average PAS measurements varied from 0.5 to 2.4 $\mu\text{g sampler}^{-1}$ according to the exposure treatment (Table 3-1). A significant correlation was established between the PAS measurements and the inlet PHE concentrations ($P < 0.0001$; $\mu\text{g/sampler} = 0.025 * C \text{ PHE air} - 0.049$) (Fig. 3-4 b).

3.2.3.1.2 Transfer of PHE from air to soil

After 2 weeks of exposure, PHE concentrations in top soils varied between 54 and 261 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Table 3-1) and were significantly correlated with PAS measurements (Fig. 3-4 c). By contrast, PHE concentrations in deep soils were not different from control concentrations (Table 3-1).

3.2.3.1.3 Particle image Velocimetry (PIV)

The velocity pattern in the median vertical plane of the chamber was measured with the PIV technique and was presented on Fig. 3-5 a. The air jet flowing in from the pipe clearly appeared along the vertical axis where velocity reached 0.15 m s^{-1} . Velocity rapidly decreased away from the axis and a quasi-constant value of 0.05 m s^{-1} was encountered in the chamber.

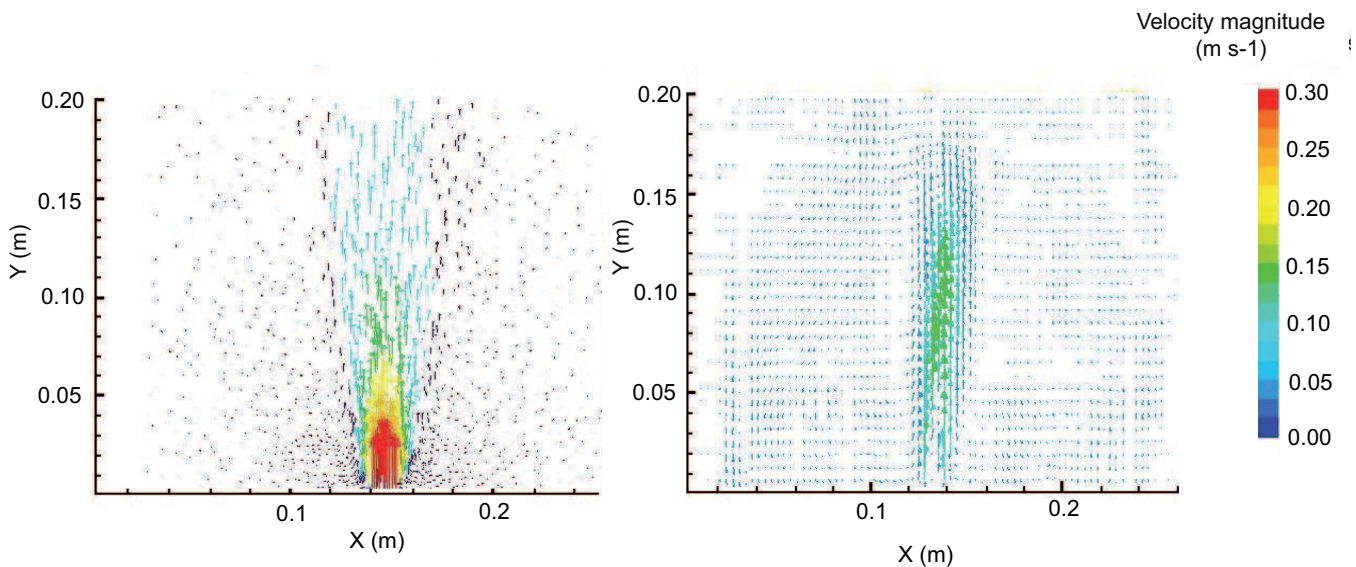


Figure 3-4 : Velocity fields in a the vertical median plane containing VL2 obtained by (a) PIV; (b) CFD simulation

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

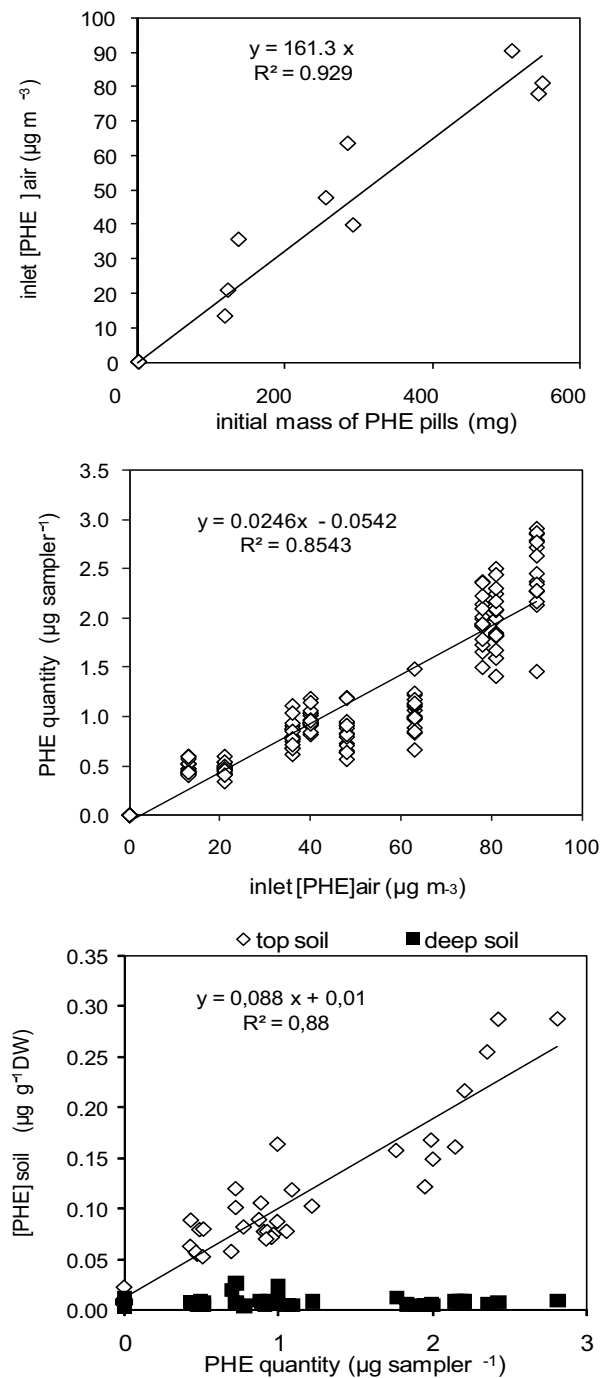


Figure 3-5 : Correlation between (a) the initial mass of PHE pills introduced into the evaporator (m_0 , mg) and inlet PHE concentrations in air ($\mu\text{g m}^{-3}$ air); (b) PAS measurements ($\mu\text{g sampler}^{-1}$) and the air concentrations; (c) PHE concentrations in soils ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) and PAS measurements. Top soil corresponded to the 0-1 cm layer and deep soil corresponded to the 1-10 cm layer. Results represent the means \pm standard deviations of the 3 replicate chambers ($n=3$) or the means \pm sd of the 16 PASs placed in each chamber ($n=48$). Spearman correlations test were conducted ($n=12$; $P<0.05$).

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

3.2.3.2 Airflow simulation

The simulated velocity pattern in the median vertical plane of the chamber was presented on Fig. 3-5 b. The comparison with the measured velocity pattern showed a good agreement everywhere in the chamber except near the inlet pipe end section where simulation gave better results than PIV measurements.

Simulation of the transport of PHE in the chamber showed that concentrations were obviously higher in the vicinity of the central inlet jet and were lower for positions smaller than 0.1 m high, due to presence of the soil pots (Fig. 3-5 b; Fig. 3-6). PHE concentrations in chamber air - simulated for different time-points along a specific vertical line (VL1) (Fig. 3-7 a) - increased up to the 4th day of experimentation. From this moment and until the end of exposure period, PHE concentration remained constant. On day 1 - as on day 14 - there is no difference in the PHE concentration distribution between the 3 tested vertical lines (Fig. 3-7 b). The concentrations did not vary according to the height. Such spatial homogeneity, only presented for the first and the last day of experimentation, was obtained at each time point.

PAS measurement values obtained by simulation agreed well with experimental values (Fig. 3-8)

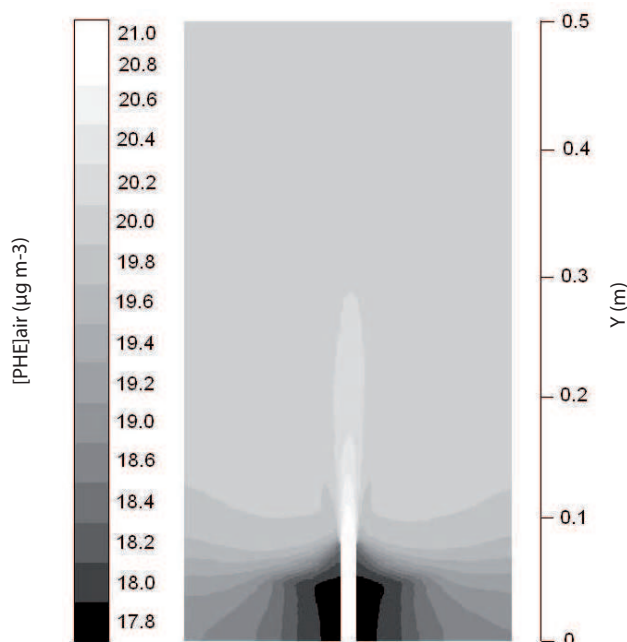


Figure 3-6 : Velocity fields in a vertical median plane containing VL2 obtained by CFD simulation

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

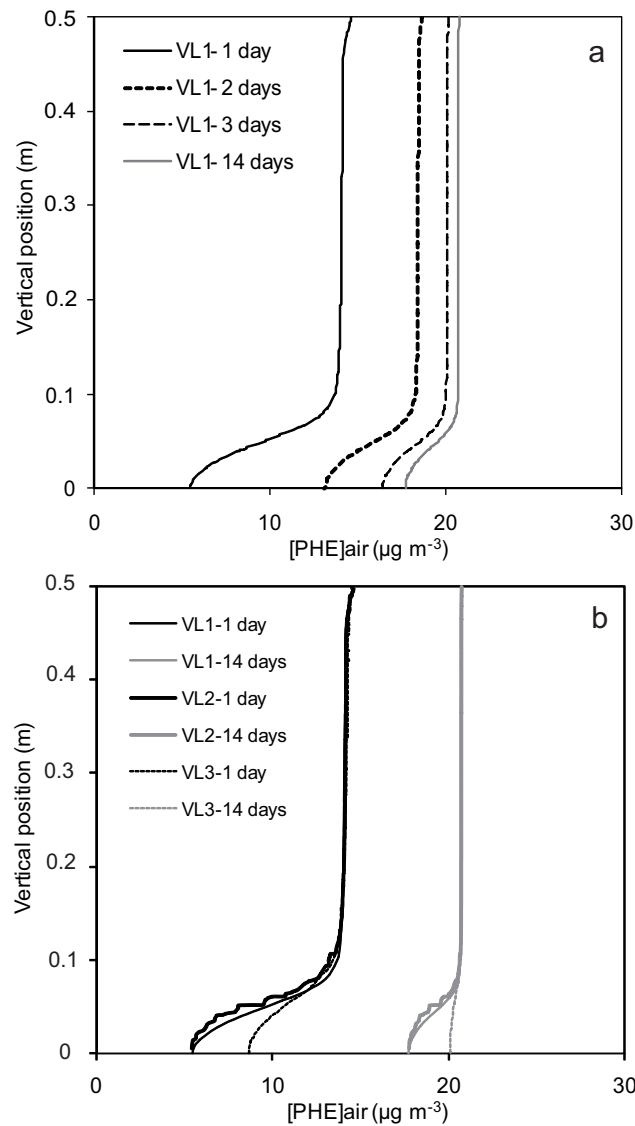


Figure 3-7 : Simulated PHE concentrations distribution (a) along 3 vertical lines (VL1, VL2, V3) and 2 time values (1 day, 14 days); (b) along the vertical line VL1 during 14 days. This simulation was performed with inlet PHE concentration of the PA chambers (i.e. mean concentration of 21 µg m⁻³).

3.2.4 Discussion

The aim of this study was to develop and validate an experimental device for studying the fate of air pollutants in the different compartments of affected ecosystems using phenanthrene (PHE) as a tracer gas.

A dual approach (experiment/ simulation) was chosen to study the airflows and the distribution of PHE concentrations in chambers. The simulations with the CFD code of the airflow pattern in the chamber were in good agreement with the measurements performed with the PIV system, except in the vicinity of the inlet tube, but this local discrepancy did not disturb the region where the PASs were placed. The CFD code - recognized as a valuable tool for simulating the dispersion of air contaminants in exposure chambers (Lee *et al.*, 2002) – calculates the contaminant distribution in chambers

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

according to inlet airflow and PHE concentration, configurations of inlets, outlets and sinks, size and shape of chamber and contaminant density differences.

Both approaches showed that PHE concentrations were uniform and constant in air of the chambers. It implies that injection of a substance from our generation system provided a uniform PHE concentration in the chamber. In our device, atmospheric pollution was realized using pure PHE (i.e. without the use of additional harmful solvent) and remained quite stable over time. In general, PAH generation columns were used to contaminate exposure chamber air (Maddalena *et al.*, 2002; Wild *et al.*, 2006; Zuo *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007). Although effective, these techniques suffered variations in flows and evaporation rates over time and then avoided precise estimation of the exposure levels. Here, the pump provided appropriate and sufficient air homogenization within the chamber to assure constant and uniform PHE exposure concentrations and get rid of unnecessary expensive equipment, such as nitrogen flow or fans.

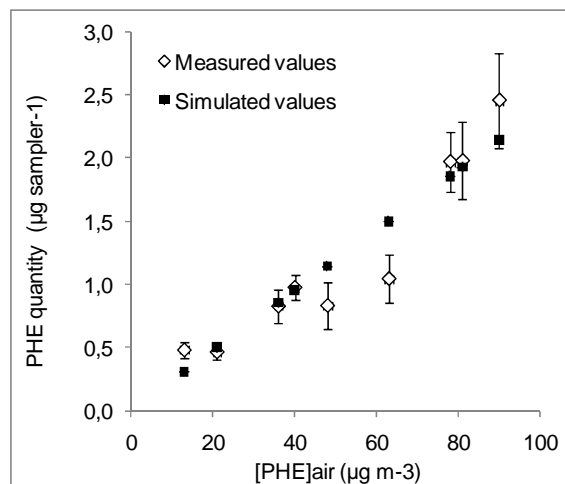


Figure 3-8 : Observed and simulated PAS measurements (µg PHE sampler⁻¹)

The pollution generation system provides a continuous and constant emission of polluted air in chambers and then simulates exposure to an emission source. Besides, PHE concentration values in air corresponded to realistic exposure conditions. Actually, the range of PHE concentrations generated in the air of experimental chambers (13 - 90 µg m⁻³) corresponded to the concentrations often selected in the few experiments performed in controlled conditions (Wild *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). Such concentrations in air were akin those measured near emission sources, such as aluminum smelters and heavy traffic roads (Hafner *et al.*, 2005). Then, the exposure of soil pots to air concentrations relevant for affected ambient conditions resulted in the effective contamination (50 - 260 µg kg⁻¹). In top soils, PHE concentrations were the same magnitude as those quantified at the highway verge (more than 100 µg kg⁻¹) (Tuhackova *et al.*, 2001). Such results implied that the present device was a reliable tool to

3. Mise au point du dispositif de pollution atmosphérique

expose microsystems to atmospheric deposition of gaseous PAHs relevant with environmental exposure conditions.

A pollution concentration range (1 control and 3 levels of pollution) was generated with the device in air and consequently in soils. Actually, the appropriate mass of PHE can be determined and introduced into the evaporator to generate a selected level of atmospheric PHE pollution. Such results showed that exposure levels (air concentrations) can be selected. Moreover, the concentrations were reliably and accurately monitored by the PASs. The response time value of diffusive passive samplers for gas sampling is typically of the order of seconds (Gorecki, 2002). In this study, the short diffusion path in the PASs and the thin porous barrier further reduced their response time. The selection and the monitoring of exposure concentrations can be useful to calculate transfer or accumulation factors in the different environmental compartments such as soil, plants and microorganisms.

Because it simplifies natural processes while remaining realistic, this device provides a tool to identify and better understand the mechanisms of transfer and effect of atmospheric pollutants in environmental compartments. The proper functioning of the exposure device did not require any external intervention throughout the exposure period, implying that the system was not disturbed. Even if the chamber volume is obviously a limitation to expose big organisms, the experimental device could be used to expose higher plants, microorganisms or microfauna. Actually, this device served to study the effects of atmospheric PHE in 2 types of plants (a monocot, *Lolium perene* L., and a dicot, *Trifolium pratense* L.) (Desalme *et al.*, 2011), in arbuscular mycorrhizal fungi in 2 types of soils (Desalme, submitted), and in testate amoeba communities (Meyer *et al.*, in preparation). Moreover, even if limited to one particular exposure regime in this study (PHE, 2 weeks), the system is versatile and can be used to test the impact of different exposure durations on physiological processes. For instance, a one-month exposure to atmospheric PHE has been performed in plants to identify the transfer and effects mechanisms (Desalme *et al.*, 2011), and the physiological processes involved (Desalme, in revision).

Finally, this device is useful to identify the mechanisms involved, but exposure with other and several PAHs (multipollution) should be investigated to approximate *in situ* conditions.

Acknowledgements

The authors want to thank the Pays de Montbéliard Agglomération (PAM) for its financial support.

4 IMPACT DES DEPOTS ATMOSPHERIQUES DE PHENANTHRENE SUR LE POTENTIEL MYCORHIZIEN DU SOL

4.1 Présentation

La première partie de ce travail correspondant au développement et à la validation d'un dispositif expérimental destiné à générer une pollution atmosphérique par le phénanthrène était une étape indispensable pour pouvoir mettre en évidence le devenir des HAP atmosphériques dans le sol et les végétaux. En effet, comme cela a été indiqué dans la synthèse bibliographique, la mise au point d'un dispositif fiable de contamination en HAP par voie atmosphérique a jusqu'à présent constitué l'un des freins majeurs à la réalisation de telles études.

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) sont présent dans la plupart des sols et s'associent à une grande majorité des plantes vasculaires (Harley & Smith, 1983), ce qui permet l'échantillonnage dans la plupart des écosystèmes. De plus, dans la mesure où ils s'associent en symbiose avec les plantes, ils peuvent fournir des informations sur la santé de l'interface sol-plante et jouent un rôle crucial dans les cycles du carbone et des nutriments dans les écosystèmes (Barea *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2009).

Une fois la méthode de contamination mise au point, nous avons tout d'abord choisi d'exposer deux types de sol à une pollution atmosphérique par les HAP afin de caractériser

- le transfert des HAP dans le sol
- l'impact sur le potentiel mycorhizien du sol.

Pour cela, deux sols agricoles voués à la monoculture de maïs ont été sélectionnés: le sol de Maconcourt (88) et le sol de La Bouzule situé à 15 km de Nancy (54).

Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré que :

- Les concentrations en PHE retrouvées dans le sol dépendent 1) des concentrations dans l'air, 2) de la profondeur de sol considérée et 3) des propriétés physico-chimiques du sol. De plus, la contamination par voie atmosphérique que nous avons simulée s'est révélée réaliste, puisque les concentrations mesurées ensuite dans les sols correspondent à des valeurs de contamination diffuses habituellement retrouvées *in situ*.
- Le potentiel mycorhizien du sol, a été largement affecté par l'exposition des sols à une pollution atmosphérique par le PHE. Ce résultat en réponse à une pollution atmosphérique en PHE laisse

4. Impact des dépôts atmosphériques de phénanthrène sur le potentiel mycorhizien du sol

présager un effet sur la qualité biologique du sol, définie à la fois d'un point de vue agronomique (rendement, croissance) et écologique (survie, diversité).

4.2 Infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in two agricultural soils affected by atmospheric deposition of phenanthrene

Dorine Desalme, Geneviève Chiapusio, Nadine Bernard, Daniel Gilbert, Marie-Laure Toussaint, Philippe Binet*

UMR UFC/CNRS 6249 Chrono-environnement,

University of Franche-Comté, 4 place Tharradin, BP 71427, F-25211 Montbéliard cedex, France

Soumis à *European Journal of Soil Biology* (IF 1.24)

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) hold a crucial and functional role in ecosystems because they are involved in cycling elements between soil and plants. This work aimed at evaluating the potential use of indigenous AMF infectivity as bioindicator of the impacts of atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons on soil quality. Phenanthrene (PHE) was selected to expose 2 agricultural soils (Maconcourt, La Bouzule) to a gradient of atmospheric PHE deposition (C, P1, P2). After 2 weeks of exposure, PHE soil concentrations differed according to the exposure level, the soil type and the depth. Leeks (*Allium porrum* L.) were grown during four weeks to assess the soil quality. PHE contamination of the soil top layer (Maconcourt: 560 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P1), 700 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P2); La Bouzule: 1130 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P1), 1350 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P2)) led to decreases in root length, shoot biomass and mycorrhizal infectivity. Number of viable propagules in soils and leek growth parameters were both negatively correlated with PHE soil concentrations. In La Bouzule deep soil, the decrease in mycorrhizal infectivity in relation with PHE diffusion in depth is discussed. These results suggested that indigenous AMF infectivity provide valuable early bioindicator of recent deposition of atmospheric PAHs on soils.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi, atmospheric pollution, polycyclic aromatic hydrocarbons, soil infectivity, toxicity

Abbreviations: PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons; AMF: Arbuscular mycorrhizal fungi; MSI: mycorrhizal soil infectivity; MPN: most probable number

4.2.1 Introduction

The concept of soil quality involves ecological perspectives – including physical, chemical and biological variables – and agronomical ones (i.e. fertility of soil). From a biological point of view, the assurance of life support functions and the maintenance of biodiversity are the main goals to secure sustainable land use (Breure *et al.*, 2005). A range of indices have been proposed to evaluate soil quality, each of them dealing with a different aspect of the term. However, there is still a disagreement about which parameters should be selected to estimate soil quality operationally, especially with respect to the feasibility of data collection and the focus of each particular study (Bastida *et al.*, 2008).

Among the existing biological indices of soil quality, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) offer many advantages. First, they are widespread and associated with almost all vascular plants (Harley & Smith, 1983) enabling the sampling in most natural and agroecosystems. Then, they are strongly linked to plants and provide information about the soil- plant interface fitness. Finally, they play a pivotal role in carbon and nutrient cycles in ecosystems (Barea *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2009). For the above-mentioned reasons, several authors proposed that AMF should be used as universal indicator of soil quality through the determination of the mycorrhizal colonization potential of the soil (Bastida *et al.*, 2008; Fortin *et al.*, 2008; Jansa *et al.*, 2009).

Mycorrhizal soil infectivity and propagule enumeration have been used to assess the soil quality in response to different stresses, e.g. agricultural practices such as tillage, lime or phosphorus fertilization (Hamel *et al.*, 1996), land uses such as fallow (Duponnois *et al.*, 2001) or plant associations (Ouahmane *et al.*, 2006), and also pollution such as atmospheric deposition of heavy metals (Mozafar *et al.*, 2002). To our knowledge, the impact of atmospheric deposition of organic pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), on soil quality have been scarcely investigated (Cabello, 1997). PAHs are highly toxic mutagenic and carcinogenic pollutants (IARC, 1983) primarily emitted in the atmosphere from a range of industrial and domestic processes (home heating and transport) (Wild & Jones, 1995) that enters all environmental compartments by atmospheric deposition, including the soil.

Much attention has been paid in the recent decades on mycorrhizal root symbiosis as a way to improve soil bioremediation of PAH polluted soils but not applied to environmental biomonitoring. Consequently, most of the studies are performed on highly contaminated soils from industrial sites or artificially spiked with PAHs where they are known to affect soil quality (e.g. decreases in seed germination, growth and biomass production (Leyval & Binet, 1998; Sverdrup *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Chiapusio *et al.*, 2007; Nie *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Chiapusio *et al.*, 2011)). For this purpose, mycorrhizal symbiosis is of particular interest, because of its capacity to protect the plant from deleterious PAH effects (Leyval & Binet, 1998), but also because it can improve the PAH transfer from soil to roots (Gao *et al.*, 2010) and PAH degradation and dissipation (Corgie *et al.*, 2003;

4. Impact des dépôts atmosphériques de phénanthrène sur le potentiel mycorhizien du sol

Joner & Leyval, 2003b; Joner & Leyval, 2003a; Liu *et al.*, 2004; Verdin *et al.*, 2006; Chiapusio *et al.*, 2007). However, the mycorrhizal symbiosis responses to PAHs in soils vary greatly according to the considered vegetal species, the profiles and concentrations of PAHs in soils, and physicochemical properties of soils (Chiapusio *et al.*, 2007). However, little is known about the response of AMF infectivity (i.e. fungi parameters only) to case usual concentrations of PAHs recovered in soils.

The purpose of this work was to evaluate the potential use of indigenous AMF as bioindicator of the impacts of atmospheric deposition of PAHs on soil quality. Two mycorrhizal parameters - mycorrhizal soil infectivity (MSI) and the most probable number of infective propagules (MPN) - were measured. We hypothesized that 1) recent PAH deposition in soils could alter the mycorrhizal soil infectivity and the growth of plants and 2) AMF could be more sensitive than plant growth to PAHs. Phenanthrene (PHE) was selected as model compound because of its ubiquity in environmental matrices (Srogi, 2007). Two agricultural soils - selected for their organic matter and clay contents ranging from single to double - were exposed during two weeks to two levels of atmospheric PHE deposition in experimental chambers. The bioassay consisted in using leek seedlings (*Allium porrum*) grown during four weeks in each previously contaminated soil.

4.2.2 Material and methods

4.2.2.1 Contamination of soils by atmospheric deposition of phenanthrene

Two soils were sampled from two agricultural fields in Lorraine (north-east of France): an eutric cambisol from the Vosges mountains (namely “Maconcourt”) and a gleyic luvisol at 15 km from Nancy (namely “La Bouzule”) (Table 4-1). Both soils were collected from the A horizon (0-25 cm), sieved at 2 mm-mesh and put into 48 plastic pots. Twenty four pots were filled with 300 g DW of Maconcourt soil, and 24 with 250 g DW of La Bouzule soil.

Tableau 4-1 : Main physicochemical characteristics of the two soils used in the experiments.

	Maconcourt	La Bouzule
General localization	Vosges	Meurthe-et-Moselle
Sand (%)	65	16
Silt (%)	19	53
Clay (%)	16	31
pH _{H2O}	6.5	6.3
Organic C (g kg ⁻¹)	7.2	14.5
Total N (g kg ⁻¹)	0.8	1.5
Density (g cm ⁻³)	1.7	1.4

4. Impact des dépôts atmosphériques de phénanthrène sur le potentiel mycorhizien du sol

The soil pots were exposed for 2 weeks to atmospheric deposition of PHE in exposure chambers (17-20 °C, 50-60 % hygrometry, 12 h/ 12 h day/night). The exposure chambers are described in Desalme et al. (Desalme *et al.*, 2011). Briefly, a gradient of PHE air pollution was performed, with respectively 0 mg (control, C), 70 mg PHE (polluted level 1, P1), and 150 mg PHE (polluted level 2, P2) initially put into the evaporator. Each treatment was repeated in triplicate, in three distinct chambers. Each chamber contained four soil pots (two pots of Maconcourt soil, two pots of La Bouzule soil). At the end of exposure, all the soils were divided into two layers according to the depth - the top layer (0-1 cm) and the deep layer (1-10 cm) – dried at room temperature under fume-hood aspiration and ground with mortar and pestle. Finally, all the replicates of soils from the same soil type, the same depth, and the same treatment were gathered together. Therefore, 12 pools of soils (2 soils (Maconcourt/La Bouzule) × 3 exposure treatments (C/P1/P2) × 2 soil depths (top/deep) were constituted in this trial.

4.2.2.2 Extraction and quantification of phenanthrene in soils

PHE was extracted by accelerated solvent extraction (ASE100, Dionex, France) and quantified in Gas Chromatography coupled with a Mass Spectrometer (GCMS-QP5050A; Shimadzu, France). Soil samples (50 g) were introduced in 100 mL-cells with diatomaceous earth (5 g) and extracted (100°C, 100 bars) for 15 min with cyclohexane (Carlo Erba, RPE). The extracts were then filtrated with Uptidisc (Teflon syringe filters, 0.45 µm). An automatic sampler injected 1 µL of sample in a stationary phase (capillary column; 25 m long; 0.22 mm diameter, 70°C to 300°C, 20 min, 1 mL min⁻¹). PHE retention time was 14.6 min. PHE concentrations recovered in soils were expressed in µg kg⁻¹ DW.

4.2.2.3 Mycorrhizal parameter assessment (soil infectivity, MSI, and most probable number of propagules, MPN) and plant growth test

The mycorrhizal soil infectivity (MSI) method (Plenchette *et al.*, 1989) is based on a biological test in which a population of mycotrophic plants - such as leek whose mycorrhizal dependency is 97% - is exposed to a range of dilutions of the tested soils. Leek (*Allium porrum* L.) seeds were surface disinfected (5 min in ethanol, followed by 2 hours in 4% v/v sodium hypochlorite solution) and pre-germinated on agar medium (Sigma) for one week. Four seedlings were transplanted in pots containing 100 g of the original soils diluted with sterilized sand. Four dilutions (1:2, 1:4, 1:16, and 1:32) and one control (only sand) were replicated three times (i.e. 147 pots). The pots were covered

4. Impact des dépôts atmosphériques de phénanthrène sur le potentiel mycorhizien du sol

with plastic beads and maintained at 60 % of water holding capacity during 4 weeks in a thermostatic growth chamber (28°C, 16h/8h light/dark, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR).

At harvest time, leek shoots were removed from roots, lyophilized, and shoot dry biomasses were quantified. The soil was removed from the roots by gentle shaking and water washing. Root lengths were measured using the line intersect method (Tennant, 1975). Shoot biomasses and root lengths were all quantified but given only for plants grown in soils diluted 2 times with sand.

The whole root system was stained using the Koske and Gemma technique (Koske & Gemma, 1989) and mycorrhizal colonization was observed at a $\times 150$ magnification and recorded as negative or positive. MSI was expressed as MSI_{50} units per 100 g dry soil, where a MSI_{50} unit is the minimum soil dry weight required to colonize 50 % of the plants (Plenchette *et al.*, 1989). Calculation of MPN was based on the equation described by Sieverding (Sieverding, 1991) and was expressed as the number of infective mycorrhizal propagules per kg dry soil.

4.2.2.4 Data analyzes

Non parametric analyzes were performed as most of experimental quantification data were found to lack homocedasticity and normal distribution. Kruskal-Wallis tests ($P < 0.05$) were performed to compare leek biomass and root lengths after growth in the different soils, Mann-Whitney U tests ($P < 0.05$) to distinguish growth parameters between the top layer and the deep layer in each exposed soil, Khi-square tests ($P < 0.05$) to test the significance of the diminution in infected plant percentage. Spearman correlation tests ($P < 0.05$) were performed between PHE concentrations and root lengths, or shoot biomass, or MPN of propagules in soils. Multiple factor analysis (MFA) was used to assess the general structure of the data and to determine the relationship between MPN of propagules and the 3 environmental variable data sets (soil, depth, and plant) (Escofier & Pages, 1994). All multivariate analyzes were performed with the software R (Team, 2010).

4.2.3 Results

4.2.3.1 Contamination of soils

La Bouzule soil initially contained 10-fold more PHE than Maconcourt soil (Table 4-2). After 2 weeks of exposure to atmospheric PHE deposition, PHE concentrations quantified in the top soils were 560 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P1) and 700 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P2) in Maconcourt soils, 1130 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P1) and 1350 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P2) in La Bouzule soils (Table 2). Thus, PHE concentrations quantified in contaminated top soils were 2-times higher in La Bouzule soil than in Maconcourt soil. Concentrations in deep soils were 18 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P1) and 26 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P2) in Maconcourt soils, 151 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P1) and 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P2) in La Bouzule soils (Table 4-2).

4. Impact des dépôts atmosphériques de phénanthrène sur le potentiel mycorhizien du sol

Tableau 4-2 : Phenanthrene (PHE) concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) in soils exposed during two weeks to atmospheric PHE deposition.

Depth	Treatment	Maconcourt	La Bouzule
Top soil	C	6	85
	P1	562	1128
	P2	703	1348
Deep soil	C	12	113
	P1	18	151
	P2	26	150

4.2.3.2 Leek growth

After 4 weeks of growth in soils, significant decreases in root length (Table 4-3) were observed for leeks grown in Maconcourt P2 top soil (-35%) and in La Bouzule top soils (-50%). Leek shoot biomass (Table 4-3) were significantly altered in all contaminated top soils (-40% in Maconcourt soils and -50% in La Bouzule soils). By contrast, no effect was observed either in leek roots or in shoots grown in contaminated deep soils (Table 4-3). In La Bouzule soils, shoot biomass and root length were always significantly lower in leeks grown in top layer than in its respective deep soils, whatever the treatment (Table 4-3). Root lengths and shoot biomasses were both significantly correlated with PHE concentrations in soils ($P < 0.001$; $\rho = -0.64$ and $\rho = -0.79$ respectively for root and shoot) (Fig. 4-2 a, b). Moreover, a significant correlation was found between root length and shoot biomass ($\rho = 0.84$; $P < 0.001$). The RV-coefficients (Table 4-5) obtained among the four groups of variables used in the multiple factor analysis (MFA) showed that plant growth parameters were significantly related to all selected parameters (“soil”, “depth”, and “MPN of propagules”).

Tableau 4-3 : Shoot biomass (mg DW) and root length (mm) of leek after 3 weeks of growth in Maconcourt and Bouzule soils previously exposed during 2 weeks to ambient air (C) or PHE-enriched air (P1, P2) diluted 2 times. Data represent the means \pm SD (n=3). Means followed by a different superscript letter in the same column are significantly different (Mann-Whitney, $P < 0.05$).

Depth	Treatment	Shoot biomass (mg DW)		Root length (mm)	
		Maconcourt	La Bouzule	Maconcourt	La Bouzule
Top soil	C	19.4 \pm 0.7 ^a	9.3 \pm 0.3 ^{ab}	41.7 \pm 2.9 ^a	28.2 \pm 7.2 ^a
	P1	12.6 \pm 4.0 ^b	5.2 \pm 1.1 ^a	36.0 \pm 8.5 ^{ab}	16.5 \pm 2.2 ^b
	P2	11.1 \pm 3.9 ^b	4.1 \pm 0.6 ^a	27.0 \pm 6.0 ^b	14.7 \pm 1.5 ^b
Deep soil	C	24.9 \pm 1.3 ^c	13.2 \pm 0.9 ^c	53.3 \pm 8.1 ^a	40.0 \pm 5.0 ^c
	P1	16.9 \pm 3.3 ^{ab}	14.6 \pm 2.4 ^c	44.8 \pm 6.8 ^a	34.5 \pm 7.9 ^{ac}
	P2	22.0 \pm 3.5 ^{abc}	12.1 \pm 1.3 ^{bc}	44.3 \pm 7.6 ^a	35.0 \pm 2.6 ^{ac}

4.2.3.3 Mycorrhizal parameters

In Maconcourt soils, leek AMF colonization at the highest relative amount of soil dropped from 50% in control to 30 % in P2 top soil (khi-square test, $P < 0.05$) (Fig. 1 a) but remained unchanged in deep soils (Fig. 4-1 b). In La Bouzule soils, AMF colonization significantly dropped from 50 % to 20 % and to 30 % (khi-square test, $P < 0.05$), respectively in P1 and P2 top soils (Fig. 4-1 c).

The low colonization of plants in both contaminated top soils did not permit to calculate any MSI_{50} -value. The MSI_{50} -value decreased in La Bouzule contaminated deep soils but remained stable in Maconcourt contaminated deep soils (Table 4-4). The MPN of viable propagules decreased by up to 50% in contaminated top soils and by 40% in contaminated La Bouzule deep soil (Table 4-4). The MSI_{50} -value and the MPN of propagules in La Bouzule control soil were both 2-times higher in deep layer than in top layer (Table 4). A negative correlation was established ($\rho = -0.79$; $P < 0.001$) between the MPN of viable propagules and the PHE concentrations in soils (Fig. 2 c).

The multiple factor analysis (MFA) among the MPN of propagules and the 3 environmental data sets confirmed the existence of an overall division between top and deep soils (Fig. 4-3). The distribution of the top soil plots was fragmented with a clear distinction between the 2 soils (Maconcourt, La Bouzule) and between the 3 treatments (C, P1, P2). By contrast, the deep soils plots were much more clustered and separated mainly according to the “soil” data set. The plots of the 3 treatments constituted a same cluster for Maconcourt deep soils, whereas for La Bouzule, a distinction was made between control and contaminated plots.

Tableau 4-4 : Arbuscular mycorrhizal infectivity (MSI_{50}) and most probable number (MPN) of viable AMF propagules in soils exposed during 2 weeks to ambient air (C) or PHE-enriched air (P1, P2). Data are expressed in infection units per 100 g soil (MSI_{50}) and in number of viable propagules per kg dry soil (MPN). nd: not determined

Depth	Treatment	MSI_{50}		MPN	
		Maconcourt	La Bouzule	Maconcourt	La Bouzule
Top soil	C	2	2	15	15
	P1	nd	nd	10	7
	P2	nd	nd	7	7
Deep soil	C	2	4	15	26
	P1	2	2	16	16
	P2	2	nd	20	15

4. Impact des dépôts atmosphériques de phénanthrène sur le potentiel mycorrhizien du sol

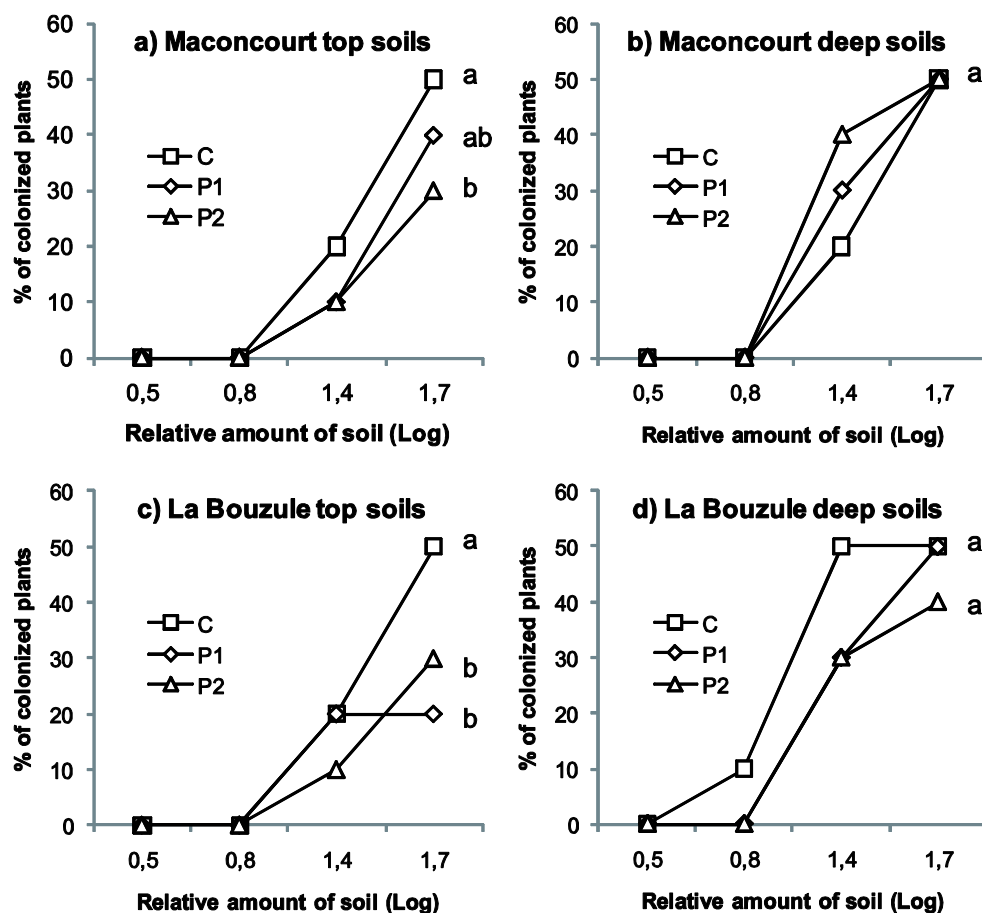


Figure 4-1 : Mycorrhizal infectivity of the soils: mycorrhizal colonization of leek plants (% of colonized plants) grown during 4 weeks on increasing concentrations of soils previously exposed during 2 weeks to ambient air (C) or PHE-enriched air (P1, P2). Different letters indicate significant difference in percentage of colonized plants at the 1:2 dilution between the treatments (C, P1, P2) (khi-square test; $P < 0.05$)

4.2.1 Discussion

The aim of this work was to evaluate the use of mycorrhizal infectivity as bioindicator of soil quality in response to atmospheric PHE deposition. The PHE concentrations quantified in both types of soils before exposure were within the range of PHE concentrations quantified in background soils (from 4.6 to 350 $\mu\text{g kg}^{-1}$) from Western Europe (Nam *et al.*, 2008). After 2 weeks of exposure to atmospheric deposition of PHE, concentrations quantified in both top and deep soils corresponded to realistic soil concentrations. In top soils, they were the same magnitude as those quantified at the vicinity of a busy highway (sum of 10 PAHs from 106 $\mu\text{g kg}^{-1}$ as a grassland background to 3095 $\mu\text{g kg}^{-1}$ at the highway verge) (Tuhackova *et al.*, 2001). The observed PHE effects on leek bioassay are therefore representative of usual atmospheric PAH deposition.

4. Impact des dépôts atmosphériques de phénanthrène sur le potentiel mycorhizien du sol

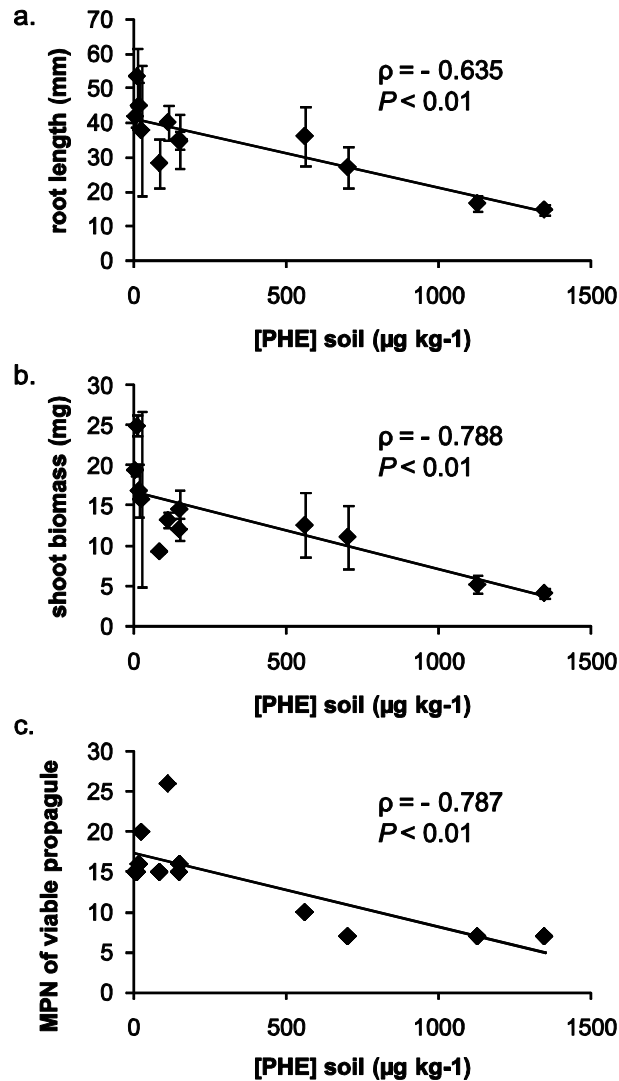


Figure 4-2 : Relationship between PHE concentration in soils and root lengths (a), shoot biomasses (b) , and the most probable number of viable propagule (MPN) (c) .Data are expressed in $\mu\text{g kg}^{-1}$ (PHE concentrations) and in mm (root lengths), in mg DW (shoot biomass), and in number of viable propagules per kg dry soil (MPN).

PHE soil concentrations differed according to soil depth, soil type, and exposure level. As the majority of PHE remained in the first centimeter of the soils, whatever the soil type, the soil depth (top/deep) constitutes a pivotal parameter to take into account in risk evaluations. Diffusion of the pollutant to the depth varied between the 2 soils, being very low in La Bouzule soil and inexistent in Maconcourt soil. PHE concentrations quantified in top soils were 2-times higher in La Bouzule soil than in Maconcourt soil though both were exposed to the same PHE concentration level in air. As a matter of fact, the level of PAHs in soils in the field is a balance between cumulative atmospheric inputs, their retention in soil and loss processes (e.g. leaching, biodegradation and volatilization). These processes are all influenced by soil and environmental properties. It has been demonstrated that phenanthrene sequestration in soils was highly positively correlated with their respective organic

4. Impact des dépôts atmosphériques de phénanthrène sur le potentiel mycorhizien du sol

carbon content (Chung & Alexander, 2002), and that the clay content was negatively correlated with PHE dissipation in soils (Chiapusio *et al.*, 2007). Consequently, higher PHE concentrations in La Bouzule soil was in relation with its 2-times higher organic carbon and clay content (Table 4-1). Our study confirmed the pivotal role of organic carbon and clay contents that condition PHE concentration in soils after exposed to the same atmospheric input.

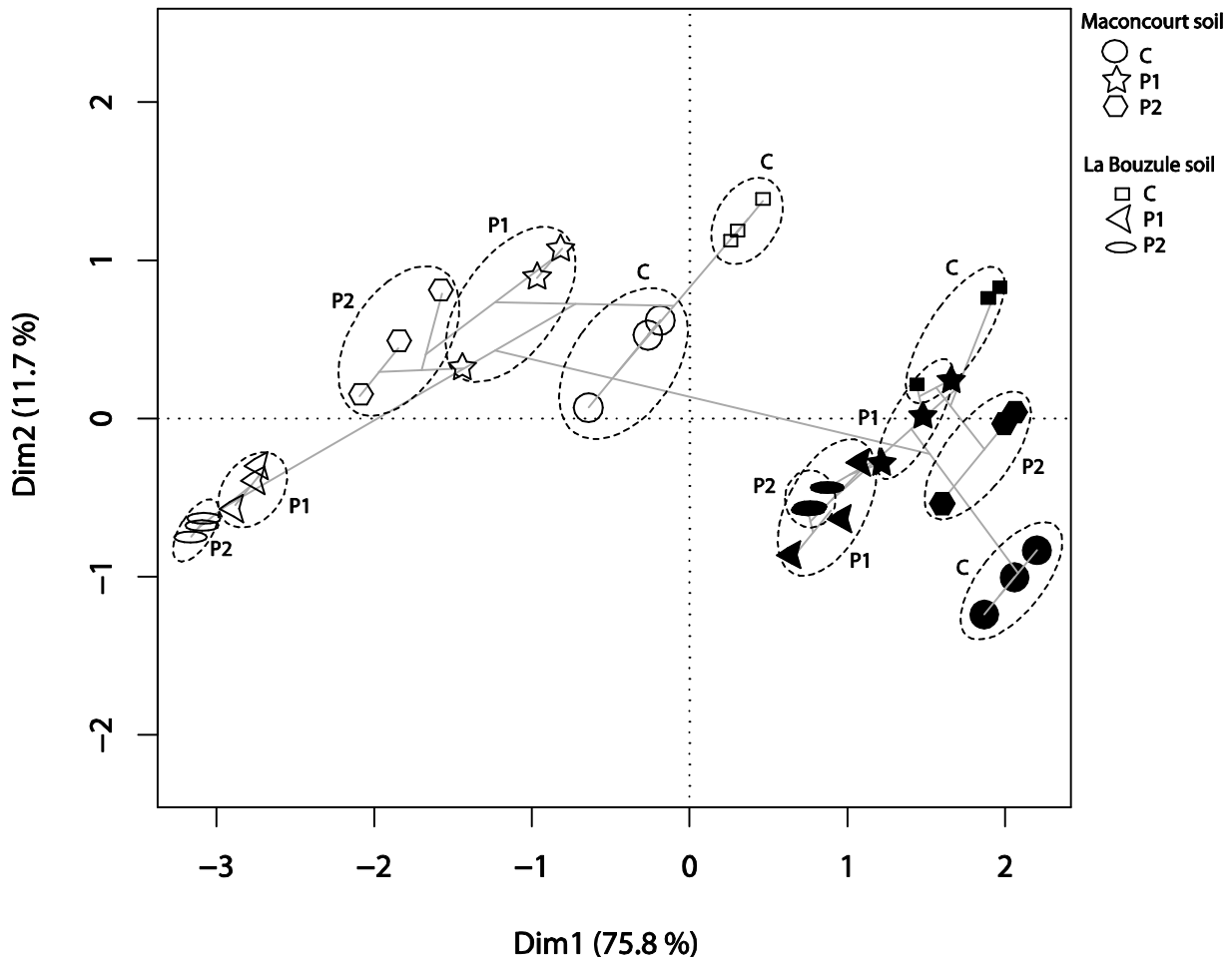


Figure 4-3 : Multiple factor analysis of the MPN of propagules and environmental data sets (soil, depth and plant). Projection of the MFA axes 1 and 2 with the result of a hierarchical agglomerative clustering (grey lines), obtained by Ward's method on the Euclidean distance matrix between MFA site scores, showing two main groups of sampling plots (open symbols "top", filled symbols "deep"). Sampling plots are indicated by "control" (C), "polluted level 1" (P1), and "polluted level 2" (P2).

Tableau 4-5 : RV-coefficients (below diagonal) and corresponding P-values (above diagonal) among the four groups of variables used in the MFA.

	Soil	Plant	Depth	MPN of propagules
Soil	1.00	< 0.01	<0.01	<0.01
Plant	0.64	1.00	<0.01	<0.01
Depth	0.39	0.37	1.00	<0.01
MPN of propagules	0.60	0.36	0.52	1.00

4. Impact des dépôts atmosphériques de phénanthrène sur le potentiel mycorrhizien du sol

Seedling growth significantly decreased in contaminated top soils. Usually, experiments about PAH effects on plant growth were realized in controlled conditions with spiked soils obtained by mixing soil with PAHs dissolved in a solvent such as acetone. In such conditions, the estimate PHE concentrations that caused a 50 % reduction of growth (EC-50) were 850 mg kg⁻¹, 190 mg kg⁻¹, and 760 mg kg⁻¹, respectively in *S. alba*, *T. pratense* and *L. perenne* (Sverdrup *et al.*, 2003). These EC-50 values were largely higher than the PHE concentrations quantified in this work (by a factor of 100). Here, we performed a realistic contamination of soils by atmospheric deposition of PHE that probably resulted in a more bioavailable PHE form in soils than that obtained with solvent-mixed PAH spiked soils. With other respects, both root and shoot biomasses remained unchanged in rice seedlings exposed to increasing concentrations of three PAHs in soils (PHE concentrations from 200 to 5000 µg kg⁻¹ dry soil) (Su & Zhu, 2008). Our results suggested that atmospheric deposition of PHE exerted some deleterious effects on plant growth even at very low concentrations.

The MSI₅₀ of the 2 tested soils was low - 2 units 100 g⁻¹ dry soil - but comparable to values quantified in some agricultural soils in France, Senegal or in some Norwegian soils (Plenchette *et al.*, 1989; Leyval *et al.*, 1995; Duponnois *et al.*, 2001). The low mycorrhizal infectivity and viable propagule numbers found in this study could be the result of the agricultural uses and crop managements in the parcels from which soils were collected. Indeed, both parcels were dedicated to maize monoculture and agricultural practices such as fertilization are known to affect mycorrhizal dependency of plants and to impoverish mycorrhizal potential of soils (Ramos-Zapata *et al.*, 2011). For example, mycorrhizal dependency of leeks dropped from 97 % to 50 % when soluble phosphorus in soil increased from 50 to 150 mg kg⁻¹ (Fortin *et al.*, 2008), impeding the infection of plants by AMF and then, the propagule formation.

The mycorrhizal colonization potential was significantly altered in both types of soils by atmospheric deposition of PHE. Mycorrhizal colonization was also affected in other highly hydrocarbon-polluted soils (Cabello, 1997) or in growth mediums (Debiane *et al.*, 2008; Debiane *et al.*, 2009). Similarly, a decrease in leek root colonization and spore formation was observed in soils exposed to atmospheric deposition of metals (Mozafar *et al.*, 2002). Other PAHs (e.g. anthracene and benzo(a)pyrene) were known to impair the extraradical hyphae length development as well as spore formation and germination (Verdin *et al.*, 2006; Debiane *et al.*, 2008; Debiane *et al.*, 2009). Here, alterations in MSI and propagule number could be the result of a direct toxicity of atmospheric deposition of PHE on fungal propagules contained in the soils. Such results clearly call for further investigations of direct enumeration and germination of fungal spores.

The plant growth and mycorrhizal fungi had a similar response to increasing concentrations of PHE in soils. AMF presence was known to alleviate plant stress under PAH exposure (Leyval & Binet, 1998), and explained such a relationship between plant growth and AMF. All the tested parameters explained 85% of the MPN variation, but the “depth” was the more discriminating factor

4. Impact des dépôts atmosphériques de phénanthrène sur le potentiel mycorhizien du sol

because it conditioned the level of PHE contamination of a specific type of soil under the same PAH inputs. Thus, the MPN of propagules and plant growth gave both the same reliable information about the fertility of a soil and its assurance of life support function.

The level of PHE contamination in La Bouzule contaminated deep soils affected neither leek root length nor shoot biomass. By contrast, mycorrhizal soil infectivity and propagule number were affected, as also demonstrated by the spatial distribution of La Bouzule deep plots. This discrepancy between growth reduction reported in both roots and AMF was found in chicory exposed to anthracene and benzo(a)pyrene in Petri dishes (Debiane *et al.*, 2008; Debiane *et al.*, 2009). Our results indicated that AMF were more sensitive or reacted faster than plant growth to changes in PHE concentrations in a soil. It implies that AMF can be relevant to acquire some information about the atmospheric deposition of PAHs - even low - in any type of soil and so were relevant as bioindicators. The use of AMF as bioindicator of soil quality has been proposed only in case of metallic pollution (Leyval *et al.*, 1995; Leyval *et al.*, 1997; Leyval *et al.*, 2002; Mozafar *et al.*, 2002). Here, we propose to use AMF occurrence (propagules number) and infectivity as early bioindicators of soil contamination by atmospheric PAH depositions.

4.2.2 Conclusions

After 2 weeks of realistic exposure to atmospheric deposition of PHE, concentrations in soils varied with depth, exposure level, and the type of soil. In top soils, concentrations were akin those reported *in situ* for soils located in the vicinity of highway traffic roads and provoked a decrease in both mycorrhizal colonization potential and leek growth. Diffusion of the pollutant in depth in La Bouzule soils affected only the AMF infectivity, suggesting that AMF were more sensitive or reacted faster than plant growth to the fresh soil PHE contamination. Accordingly, this work proposed that AMF infectivity should be used as an early bioindicator providing valuable information on the soil quality in response to atmospheric deposition of PAHs.

Acknowledgments

This work was supported by the Pays de Montbéliard Agglomération (PMA, France). The authors would like to thank V. Jassey for his assistance in statistics, and Dr R. Cherrier (Chambre d'Agriculture de Lorraine, France) for providing the soil samples used in the experiment.

5 TRANSFERT ET EFFETS DU PHENANTHRENE ATMOSPHERIQUE SUR DEUX ESPECES PRAIRIALES ET LEURS SYMBIONTES RACINAIRES

5.1 Présentation

L'étude précédente a montré que le PHE d'origine atmosphérique était transféré dans le sol et affectait sa qualité biologique *via* la diminution du potentiel mycorhizien. Cette étude a aussi montré que le devenir et les effets de la pollution atmosphérique par le PHE variaient avec le type de sol.

Afin de mettre en évidence les transferts et les effets des HAP atmosphériques sur un système plus réaliste, nous avons utilisé les dispositifs de contamination à l'échelle d'un microsystème sol-plante-microorganismes. Deux espèces prairiales, le trèfle violet (*Trifolium pratense*) et le ray-grass (*Lolium perenne*), ont donc été cultivées puis soumises à un flux de PHE pendant 1 mois. Les objectifs de cette étude étaient notamment de :

- caractériser le devenir du PHE atmosphérique dans le système sol-plante-microorganismes
- d'identifier la(es) cible(s) biologique(s) des effets parmi la plante et ses symbiotes.

Le choix des deux espèces prairiales a été motivé par leur large distribution sur tout le territoire français, leur importance potentielle dans le transfert dans les chaînes alimentaires, leur utilisation répandue dans les études sur la pollution des sols par les HAP, et leur association en symbiose avec des mycorhizes, et pour le trèfle avec *Rhizobium*.

Cette étude a montré que le PHE atmosphérique était transféré dans tous les compartiments des microsystèmes. En particulier, les résultats obtenus ont montré que:

- le PHE atmosphérique pénètre majoritairement dans les tissus internes des feuilles du trèfle et du ray grass et est transféré dans les racines *via* le phloème. Des différences de concentrations en PHE entre les deux espèces végétales dans les racines, tiges et feuilles ont été observées.
- le PHE atmosphérique affecte la production de biomasse et le pourcentage de nodules actifs chez le trèfle, tandis qu'il n'affecte ni la production de biomasse ni les symbioses racinaires chez le ray-grass.

5. Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur 2 espèces prairiales et leur symbiotes racinaires

5.2 Atmospheric phenanthrene transfer and effects on two grassland species and their root symbionts: A microcosm study

C

Environmental and Experimental Botany 71 (2011) 146–151



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental and Experimental Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envexpbot



Atmospheric phenanthrene transfer and effects on two grassland species and their root symbionts: A microcosm study

Dorine Desalme, Philippe Binet, Nadine Bernard, Daniel Gilbert, Marie-Laure Toussaint, Geneviève Chiapusio*

Université de Franche-Comté, CNRS, UMR 6249, Chrono-environnement, BP 71427, F-25211 Montbéliard cedex, France

Publié dans *Environmental and Experimental Botany* (IF 3.16)

Abstract

The objective of this work was to determine the transfer of phenanthrene (PHE) from air to grassland plants and soil compartments and its effects on the plant growth and symbiotic root microorganisms (arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* nodules). The experimental procedure exposed *Trifolium pratense* L. or *Lolium perenne* L. to atmospheric PHE pollution ($150 \mu\text{g m}^{-3}$) over the course of one month. PHE was transferred from the air to the leaves and to the soil surfaces. In leaves, PHE was mostly absorbed in the inner leaf tissues, representing 92 % and 73% of the total PHE amount quantified in leaves, respectively for clover and ryegrass. In soils, most of PHE contamination was recovered in the top layer (0-1 cm) and did not readily diffuse into the deep layer (1-10 cm). The highest PHE concentration recovered in deep roots (1.8 and $4.5 \mu\text{g g}^{-1}$ DW, respectively for clover and ryegrass) related to the lowest PHE concentration recovered in its associated soil suggested a PHE translocation from shoots to roots within the 2 plant species. The large PHE amount quantified in clover shoots ($124 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) induced a significant diminution by 30% of the shoot biomass whereas root biomass remained stable. Efficient mycorrhizal symbiosis was maintained during exposure whereas the *Rhizobium* nodule symbiosis was altered in the surface of soil. By contrast, neither biomass accumulation nor symbiotic association was affected in ryegrass, probably due to a lower

5. Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur 2 espèces prairiales et leur symbiotes racinaires

sensitivity of this species to PHE exposure. Perspectives of carbon allocation and N nutrition perturbations are suggested in clovers.

Keywords: atmospheric PAHs; soil-plant system; *Trifolium pratense*; *Lolium perenne*; *Rhizobium*; mycorrhiza

Abbreviations: PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; PHE, phenanthrene; AMF, arbuscular mycorrhizal fungi; ASN, active symbiotic nodules

5.2.1 Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are a large class of carcinogenic compounds emitted into the atmosphere by incomplete combustion of fossil fuel or biomass (Wild and Jones, 1995). As semi-volatile chemicals, PAHs can be transported over long distances in the atmosphere (Prevedouros et al., 2004). In general, 3-4 ringed PAHs are largely predominant in air wherever the sampling was established, whether in rural, suburban or urban areas (Wagrowski and Hites, 1997; Gioia et al., 2006). PAHs can partition from air to water, soil and vegetation, through dry gaseous, dry particle-bound and wet depositions (Kaupp and McLachlan, 1999). They are persistent in various environmental media and can subsequently enter the food chains (Kipopoulou et al., 1999; Rychen et al., 2005). Nowadays, it is well known that human exposure mainly occurs by ingestion of contaminated agricultural and natural food (Cocco et al., 2007).

Because of its capacity to accumulate PAHs from around the air, vegetation uptake is of great interest. Generally, the aims of studies based on vegetation are to assess *in situ* PAH contamination levels by developing environmental monitoring using mosses, lichens, needles and leaves of higher plants (Otvos et al., 2004; Orecchio 2007; Prajapati and Tripathi, 2008; Lehndorff and Schwark, 2009; Shukla and Upreti, 2009). Although foliar uptake is assumed to be the major PAH exposure pathway in the environment (Tao et al., 2004), atmospheric PAH translocation within plants and their phytotoxic effects remain poorly investigated.

Until now, the phytotoxic effects of PAHs on plants were mostly investigated through root exposure by means of polluted water in Petri dishes (Ren et al., 1996; Kummerova et al., 2006; Liu et al., 2009; Weisman et al., 2010), test tubes (Kummerova et al., 2010) or in polluted hydroponics (Mei et al., 2009; Zhang et al., 2010), or by means of soil or sand contaminations (Aina et al., 2006; Wieczorek and Wieczorek, 2007; Muratova et al., 2009a). The few experiments conducted under atmospheric controlled conditions focused on leaf uptake and demonstrated the PAH uptake, mobility and storage within leaves (Wild et al., 2006). Atmospheric PAH translocation behaviors into plant organs were investigated in maize and tea plant but only in hydroponic plant cultures (Lin et al., 2006; Lin et al., 2007).

5. Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur 2 espèces prairiales et leur symbiotes racinaires

Soil is a crucial environmental factor involved in the translocation and the phytotoxic effects of organic pollutants in plants. In natural environments, plants are strongly linked with their root symbionts, which play a major role in the plant response to abiotic stresses. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are well known to enable survival and growth of plants in PAH-polluted soil (Leyval and Binet, 1998). Other symbiotic association such as *Rhizobium* bacteria - leguminous plants could promote plant resistance to pollutant stress. For example, inoculation of *Sinorhizobium meliloti* in phenanthrene-polluted sand increased *Sorghum bicolor* acclimatation rate and their biomass (Muratova et al., 2009b). AMF and rhizobia were both sensitive to PAHs in soils as the symbiosis efficiencies were altered (Chiapusio et al., 2007). However, the response of root symbionts has not been investigated in relation with their host plant exposure to atmospheric PAHs.

On the basis of the above reported evidence, we test the hypothesis that in realistic environmental conditions, atmospheric phenanthrene (PHE) must be largely uptaken by leaves and might be to a lesser extent transferred/translocated to roots. In such a way, PHE could affect both plant growth and root symbionts. Therefore, the objective of the present study was to determine (1) the complete distribution of atmospheric PHE in plant organs and soils and (2) its effects on plant growth and its symbiotic root microorganisms (AMF and *Rhizobium* nodules).

The experimental procedure was to expose 2 grass plants to the same level of atmospheric PHE pollution in 2 independent experiments. The subject of our research was the three-ring PAH phenanthrene (PHE), selected as target compound due to its ubiquity in air (Wagrowski & Hites, 1997a), its frequent use in simplified model systems (Chiapusio *et al.*, 2007), and its relative insensitivity to photodegradation and metabolization (Wild *et al.*, 2005b; Wild *et al.*, 2005a). Red clover (*Trifolium pratense* L.), as a dicotyledonous plant, and ryegrass (*Lolium perenne* L.), as monocotyledonous plant, were selected as representative grassland plant species.

5.2.2 Materials and methods

5.2.2.1 Culture of plants

Red clover (*Trifolium pratense* L.) or ryegrass (*Lolium perenne* L.) seeds were disinfected (5 min in ethanol followed by 2 hours in sodium hypochlorite solution (4%, v/v)) and germinated in Petri dishes with Vincent medium (Purchase *et al.*, 1997) during 3 days (clover) and 5 days (ryegrass). For each experiment, 28 plastic pots (12 cm high, 8 cm diameter) were filled with 100 g DW of sand at the bottom separated with tissue from 300 g DW of a previously sieved (2 mm-mesh) eutric cambisol (WRB) recovered from an agricultural field in Maconcourt (Vosges, France). Nine seedlings of clover or ryegrass were transplanted into each plastic pot and cultivated in a thermostatic growth chamber during one month (25°C, photoperiod 12h/12h, 70% constant relative humidity, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

5. Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur 2 espèces prairiales et leur symbiotes racinaires

PAR). After 4 weeks of preculture (T0), 4 plastic pots were harvested for each plant species. The 24 remaining plastic pots of each plant species were placed inside the exposure device during 4 weeks (T1).

5.2.2.2 Atmospheric PHE exposure device (Fig. 5-1)

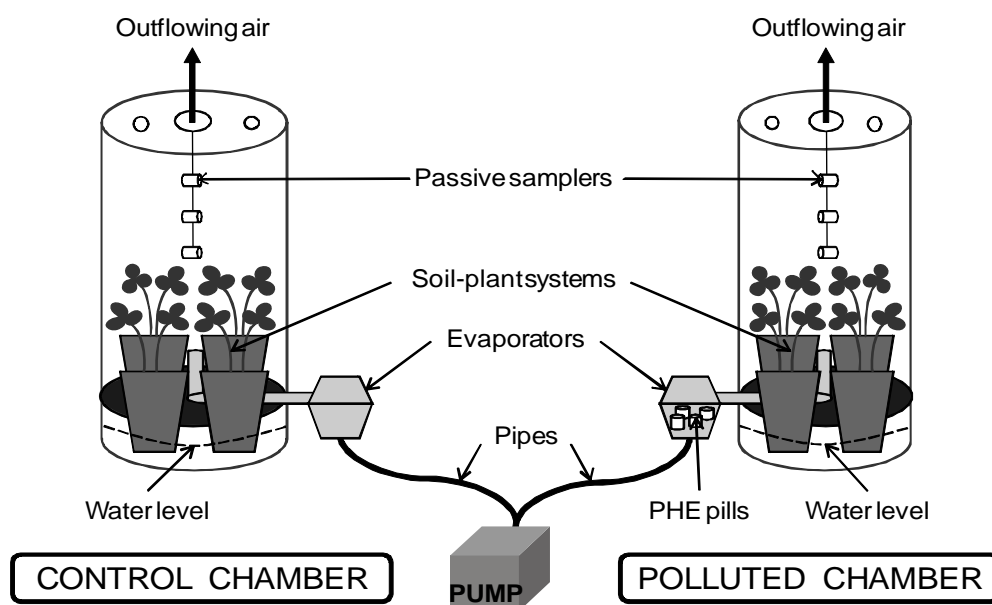


Figure 5-1 : The experimental PHE atmospheric exposure device. Two exposure chambers (1 control and 1 polluted) were related to the same pump and placed under the same fumehood. In each chamber, 4 soil-plant systems (4 pots) were exposed to ambient air (control) or PHE-enriched ambient air (polluted) for one month. PHE concentrations were monitored throughout the exposure period by passive samplers. Pot bottoms were immersed in water to maintain the same relative humidity.

For both experiments, the exposure device consisted of 2 cylindrical polymethyl methacrylate (PMMA) chambers (65 cm high, 25 cm diameter) crossed by a continuous air flow (2.25 L/min) and placed under the same hood. Before reaching the chambers, air passed through an evaporator filled with PHE pills (polluted chamber) or left empty (control chamber). PHE pills (150 mg) were made from PHE powder (Sigma-Aldrich; molecular weight: 178.2 g mol⁻¹; saturation vapor pressure: 0.02 Pa at 25°C) using a pill maker. This device (control and polluted exposure chambers) was repeated in triplicate, under 3 hoods for each exposure experiment. PHE concentration in the chamber air was calculated by the pill evaporation rate (difference in pill mass between T0 and T1). In addition, the calculated atmospheric PHE concentrations were monitored throughout the experimentation with 3 passive samplers (activated carbon: 0.8 g) placed in each chamber. 4 plastic pots of the same plant species were put into each chamber (20 °C, photoperiod 12h/12h, 135 μmol m⁻² s⁻¹ PAR). Relative humidity was kept constant due to the immersion of the plastic pot bottoms in water maintained at the same level.

5.2.2.3 Sampling and sample preparation

In each experiment, the 24 plastic pots were removed from the chambers and harvested at T1. For both plant species, shoots were separated from roots and separately weighted (fresh weight). To determine surface leaf areas, leaves were displayed and flattened by the means of a glass window to take photographs (Canon TV Zoom Lens, J6x11-II, 11.5-69 mm, 1:1.4, Kaiser Bench). Pictures were treated with a computerized image processing and analysis system (Leica Q500 IW imaging software, France). Leaves were separated into 2 pools. In the first pool, an extraction procedure adapted from Binet et al. (2000) was performed to distinguish adsorbed PHE from absorbed PHE in leaves. Leaves were immersed in chloroform (10 mL) for 10 seconds and chloroform extracts were stored at -25°C prior to PHE quantification. In the second pool, leaves were not chloroform-treated. The total PHE concentration recovered in leaves (i.e. Table 1) was considered as the total PHE recovered in the 2 pools. The soil was divided into 2 layers with the corresponding roots: top (0-1 cm) and deep (1-10 cm) layers. Root fresh weight was determined for each layer and 50 mg was kept in ethanol: water solution (50:50, v/v) until forthcoming AMF quantification. All plant and soil samples were freeze-dried to quantify dry weight (DW) biomass and water content, then ground with a ball crusher, finally conditioned at -25°C until further analyses.

5.2.2.4 Extraction and quantification of PHE in air, plant and soil

5.2.2.4.1 *Passive sampler extraction*

PHE sorbed into activated carbon was extracted with 15 mL of carbon disulphide (CS₂, AnalaR Normapur, VWR Prolabo, purity > 99.9%) under 10-second agitation.

5.2.2.4.2 *Plant sample extraction*

100 mg DW of shoots or roots were mixed with diatomaceous earth (5 g). Extraction of this mix was performed twice with 25 mL of cyclohexane (Carlo Erba RPE) by accelerated solvent extraction (ASE100®; Dionex, France) in 10 mL-cell during 14 minutes (100°C, 100 bars).

5. Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur 2 espèces prairiales et leur symbiotes racinaires

5.2.2.4.3 Soil sample extraction

PHE in top (30 g DW) and deep (90 g DW) layers of soils was extracted twice with cyclohexane, in 34 mL and 100 mL-cell respectively. Bound residues of PHE were quantified from the 2 layers of soil. Top (25 g DW) and deep (50 g DW) layers of soil were firstly ASE extracted and then hydrolyzed with 50 mL or 100 mL respectively of chloridric acid (3 N) at ambient temperature during 12 hours. Bottoms were re-lyophilized and were ASE extracted one more time with cyclohexane.

5.2.2.4.4 PHE quantification

All the CS₂, plant, and soil extracts were filtered (Teflon syringe filters, 0.45 µm). PHE quantification was performed with Gas Chromatography coupled with a Mass Spectrometer (GCMS-QP5050A; Shimadzu, France). An automatic sampler was used to inject 10 µL of sample in a stationary phase (capillary column Varian VF-5ms; 30 m long; 0.25 mm inner diameter, 70°C to 300°C, 20 min, 1 mL min⁻¹). PHE retention time was 14.6 min. PHE concentrations recovered in stems, roots, and soils were expressed in µg g⁻¹ DW and in leaves in µg g⁻¹ DW and in µg cm⁻². Adsorbed and absorbed PHE quantified in leaves were expressed in percentage of the total amount recovered in the leaf pool. Bioconcentration factor (BCF, day⁻¹) was the ratio of the PHE concentration in plant tissues (µg g⁻¹ DW) to the air concentration (µg g⁻¹ air, at 25°C) reduced to one day.

5.2.2.5 Symbiotic microorganism analyses

Quantification of clover and ryegrass root colonization by AMF was made on fresh 1 cm - fragments of roots stained with trypan blue as described by Koske and Gemma (1989). 50 fragments per pot were mounted on microscope slides and observed at 150 x magnification. Mycorrhization infection of every fragment was noted according to the scale proposed by Trouvelot et al. (1985). Nodule enumeration was performed on clover roots with dissecting microscope (x 10) directly after being removed from each studied layer of soil. Total and active symbiotic nodules (ASN) were counted related to the characteristic red color of active ones. All nodule measurements were expressed as number per 100 mg DW roots.

5.2.2.6 Statistical analysis

For the two independent experiments, no significant difference was noticed concerning air contamination between the 3 polluted chambers (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$, $n = 3$), so they were

5. Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur 2 espèces prairiales et leur symbiotes racinaires

considered as real replicates. As one replicate corresponded to 4 pots, $n=12$ for all analyses of these 2 experiments. Non parametric analyses were then performed as most of experimental quantification data were found to lack homocedasticity and normal distribution. Mann-Whitney U tests ($P<0.05$) were performed to compare the PHE concentrations recovered in any compartment between the 2 plant species. Wilcoxon paired analyses ($P<0.05$) were made to compare PHE concentrations recovered in the different organs in the same plant species. Microbial parameters were treated with Chi-square tests ($P<0.05$) to determine whether the PHE-exposure could affect mycorrhizal root parameters and active nodule percentages.

5.2.3 Results

5.2.3.1 Atmospheric PHE exposure

At T1, no PHE was detected in the atmosphere of control chambers in any experiments. PHE quantified in control clover and ryegrass ranged from 0.5 to 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW in shoots and roots, and was around 0.008 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW in the soil.

According to the evaporation rate of PHE pills, the concentration in air of polluted chambers over the exposure period was 152 $\mu\text{g m}^{-3}$ for the clover experiment and 155 $\mu\text{g m}^{-3}$ for the ryegrass experiment (Table 5-1). These concentrations were significantly correlated with the PHE scavenging by activated carbon of passive samplers ($r^2= 0.73$, $P<0.001$).

5.2.3.2 PHE recovered in clover experiment

Atmospheric PHE was transferred from air to all the considered clover organs during the exposure, but principally in shoots (124.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) (Table 1). By contrast, clover roots at T1 were 100-times less contaminated (1.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) than shoots. PHE transfer from air to leaves (170.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) was 3-times higher than to stems (68.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW). Moreover, 7.7 % of the total PHE recovered in leaves was adsorbed to the cuticle and 92.3 % was absorbed in the inner tissues of leaves (Table 2). Bioconcentration factor (BCF) between air and leaves was 50 day^{-1} .

PHE bound residues were quantified to validate PHE extraction in soils and represented 27.0 ± 11.4 % (top soil) and 24.2 ± 9.2 % (deep soil) of the total amount of PHE extracted (extractable PHE + bound residues). PHE assayed in soil demonstrated a significant difference according to the depth (Table 1), as there was four times more PHE in the top layer (0.046 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) than in the deep layer (0.012 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW).

5. Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur 2 espèces prairiales et leur symbiotes racinaires

Tableau 5-1 : PHE concentrations recovered in air, plant tissues and soil in the 2 plant soil systems (red clover and ryegrass) after one month of exposure to atmospheric PHE. Data represent the means \pm S.D. Top roots and top soils correspond to the 0-1 cm layer; deep roots and deep soils correspond to the 1-10 cm layer. Asterisks indicate significant differences of concentration in the same compartment between red clover and ryegrass systems (Mann-Whitney U test; $P < 0.05$). Means followed by a different letter in the same line (same plant species) were significantly different (Wilcoxon paired test; $P < 0.05$).

	AIR ($\mu\text{g m}^{-3}$)	PLANT ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$)				SOIL ($\mu\text{g kg}^{-1}\text{DW}$)					
		Total plant	Total shoots	Leaves	Stems ¹	Total roots	Top roots	Deep roots	Total	Top soil	Deep soil
red clover	152 \pm 31	95.3 \pm 26.0 ^a	124.0 \pm 35.9 ^b	170.1 \pm 54.5 ^c	68.7 \pm 16.3 ^d	1.7 \pm 0.4 ^e	0.8 \pm 0.3 ^f	1.8 \pm 0.5 ^e	18 \pm 6 ^f	46 \pm 32 ^g	12 \pm 5 ^h
ryegrass	155 \pm 34	31.7 \pm 3.2 ^{**}	48.1 \pm 5.3 ^{b*}	67.8 \pm 8.1 ^c	9.6 \pm 1.5 ^d	3.7 \pm 1.3 ^{e*}	3.3 \pm 0.7 ^{e*}	4.5 \pm 0.9 ^{e*}	21 \pm 6 ^f	72 \pm 27 ^g	10 \pm 3 ^h

¹ For ryegrass, “stems” includes stems and leaf sheath

5.2.3.1 PHE recovered in ryegrass experiment

PHE was mostly transferred from air to leaves (67.8 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$) (Table 5-1). PHE concentrations quantified in roots (3.7 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$) were similar in top and deep roots (Wilcoxon paired test; $P > 0.05$, NS). Furthermore, 27.2 % of the PHE recovered in leaves was adsorbed to cuticular waxes and 72.8 % were absorbed in leaves (Table 5-2). Bioconcentration factor (BCF) between air and leaves was 15 day⁻¹. PHE contaminations of soils were akin to those of the clover soil systems (Table 5-1).

5.2.3.2 Effect of atmospheric PHE on ryegrass and clover growth

The biomass of ryegrass was not affected by atmospheric PHE (Fig. 5-2B). On the contrary, PHE exposure induced a general clover biomass reduction of around 15 %. This decrease was totally due to shoot biomass diminution (Fig. 5-2A). A considerable decline of 30% was measured for leaf and stem dry weights, but also for leaf areas (284 \pm 40 cm²/pot and 207 \pm 50 cm²/pot in control and polluted treatments, respectively) (Fig. 5-2A). By contrast, atmospheric PHE exposure did not affect significantly root biomass, neither in top layer, nor in deep layer (Fig. 5-2A).

Tableau 5-2: Absorbed and adsorbed PHE in leaves of red clover and ryegrass after one month of exposure to atmospheric PHE. Data represent the means \pm S.D. Asterisks indicate significant differences of PHE concentration between red clover and ryegrass (Mann-Whitney U test; $P < 0.05$).

	<i>total PHE in leaves</i>		<i>PHE adsorbed to cuticle</i>		<i>PHE absorbed in inner leaf tissues</i>	
	$\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$	$\mu\text{g cm}^{-2}$	$\mu\text{g cm}^{-2}$	% total PHE	$\mu\text{g cm}^{-2}$	% total PHE
<i>Red clover</i>	167.6 \pm 69	0.39 \pm 0.16	0.03 \pm 0.01	7.7 \pm 3.2	0.36 \pm 0.16	92.3 \pm 3.2
<i>Ryegrass</i>	79.1 \pm 9.9 *	0.19 \pm 0.04 *	0.05 \pm 0.01 *	27.2 \pm 6.5	0.14 \pm 0.03 *	72.8 \pm 6.5

5. Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur 2 espèces prairiales et leur symbiotes racinaires

5.2.3.1 Effect of atmospheric PHE on ryegrass and clover root symbionts

No mycorrhizal colonization or nodulation was observed at T0 in any species. At T1, intensity of root mycorrhizal colonization in ryegrass roots was below 1%. On the contrary, root symbioses were observed in both control and PHE-exposed clovers at T1. Mycorrhizal parameters - frequency, intensity and arbuscular abundance - were similar in control and polluted clovers, in top and deep roots (Table 5-3). The mycorrhizal root frequencies were around 25% for both control and polluted pots in the 2 layers. Number of active symbiotic nodules was similar in control and polluted pots for both considered root layers (Table 5-3). Nevertheless, percentage of active nodules in top roots dropped significantly from 79.5 % in control pots down to 68.7 % in exposed pots.

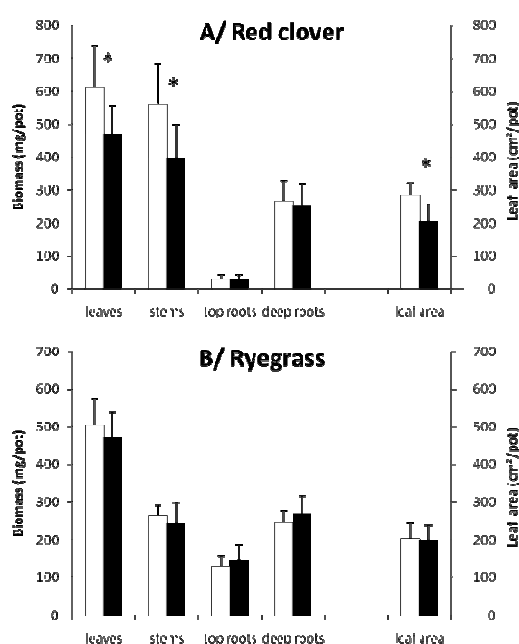


Figure 5-2 : Biomasses and surface leaf areas of red clover (A) and ryegrass (B) after one month of exposure to ambient air (control) or to atmospheric PHE (polluted). Data represent the means \pm S.D. Top roots correspond to the 0-1 cm layer and deep roots correspond to the 1-10 cm layer. Asterisks indicate significant differences of biomass and leaf area between control and polluted pots (Mann-Whitney U test; $P < 0.05$).

Tableau 5-3 Clover symbiotic microorganism analyses after one month exposure to ambient air (control) or PHE-enriched air (polluted).

Treatment	Compartment	Mycorrhiza			<i>Rhizobium</i> nodules	
		Frequency (%)	Infection intensity (%)	Arbuscular abundance (%)	ASN (nb/100 mg root)	ASN/total nodules (%)
Control	top roots	23.0	1.8	0.5	86	79.5
	deep roots	27.1	2.9	0.9	160	86.1
Polluted	top roots	19.5	1.5	0.3	98	68.7 *
	deep roots	24.9	2.6	0.8	140	82.4

5. Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur 2 espèces prairiales et leur symbiotes racinaires

Results of mycorrhizal root frequency, infection intensity, and arbuscular abundance are expressed in %. Active symbiotic nodule (ASN) numbers are expressed in nodules/100 mg DW roots and in % (ASN/total nodules). Top roots correspond to the 0-1 cm layer; deep roots correspond to the 1-10 cm layer. Asterisk indicates significant ASN/total nodules difference between control and polluted top roots (Chi-square test; $P < 0.05$).

5.2.4 Discussion

In the present investigation, the $150 \mu\text{g m}^{-3}$ PHE exposure corresponded to atmospheric PHE concentrations selected in the few atmospheric exposure studies (from 50 to $330 \mu\text{g m}^{-3}$) performed in controlled conditions (Lin et al., 2006; Wild et al., 2006). Ambient PHE concentrations are highly variable in the environment. Values are expressed in pg m^{-3} in rural areas (Gioia et al., 2006), in ng m^{-3} in urban areas (Prevedouros et al., 2004), and in $\mu\text{g m}^{-3}$ near emission point sources, e.g. near aluminum smelters and heavy traffic roads (Hafner et al., 2005).

Experiments underlined the ability of clover and ryegrass to accumulate a large amount of PHE from the air over the course of one month (95.3 and $31.7 \mu\text{g g}^{-1}$ in total plant respectively for clover and ryegrass). This plant capacity was demonstrated with other plant species exposed to atmospheric PAHs in controlled conditions, such as tea or maize (Lin et al., 2006; Lin, et al., 2007). PHE was more concentrated in shoots than in roots in clover and ryegrass where the leaves constituted the PHE sink (170 and $68 \mu\text{g g}^{-1}$ DW respectively). In both plant species, PHE was mostly absorbed in leaves rather than adsorbed to cuticular waxes. This result was in accordance with *in situ* experiments such as those of Wang et al. (2008) who found that airborne particulate and gaseous PAHs were likely the sources of PAHs for cuticle and the inner tissues respectively. Moreover, PHE extracted from clover and ryegrass tissues was not closely bound to cell walls as 99% of the PHE was recovered from the first ASE extraction (unpublished data). Our results suggested a cytoplasmic localization of PHE in leaf and root cells of both plant species. Wild et al. (2006) documented for spinach a PHE accumulation in leaf cell cytoplasm and storage into vacuoles.

Bioconcentration factor (BCF) corresponds to the integrative parameter which allows comparison between any plant species and atmospheric contamination levels. BCF of ryegrass leaves (15/day) was lower than BCF of clover leaves (50/day) and tea leaves (95.5/day) (from Lin et al. 2006). The surface area is one parameter which could explain BCF differences (Chen et al, 1997). The observed BCF differences between clover and ryegrass were not related to their leaf areas but to the different sensitivity of each plant species to uptake PHE. Since ryegrass leaf blade twist, the keeled abaxial surface of leaf protect like a natural roof the adaxial side of the leaf blade from airborne xenobiotics (Ringelmann et al., 2009). Abaxial surface of ryegrass leaves is a low-hydrophobicity smooth wax film, unlike clover leaves whose both sides are shaped and covered with hair (Zoric et al., 2009). Thus, leaf morphology constitutes a crucial factor involved in the scavenging of PHE by foliage and explained the differences between the 2 grassland plants.

5. Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur 2 espèces prairiales et leur symbiotes racinaires

In clovers, 8 % of the total PHE amount in leaves remained adsorbed in the cuticle, whereas adsorbed PHE in ryegrass cuticle represented 27 %. In term of concentration per leaf area unit, adsorption of PHE to the cuticular waxes was 2 times higher in ryegrass than in clovers. Structural characteristics of the cuticle explain these differences. Transfer of organic compounds across plant cuticles is governed by diffusion. The penetration of PHE in epidermic cells and the inner leaf tissues occurs when equilibrium concentration is reached in the cuticle (Wild et al., 2006). Our results suggested that the equilibrium concentration in ryegrass cuticle was higher than that of clover cuticle.

Roots were also contaminated after atmospheric PHE exposure, but in very low concentrations compared with shoots (respectively around 70 times and 15 times less in clover and ryegrass). In both species, PHE concentrations in deep roots were higher than in top roots, but were only significant for clover. However, the highest PHE concentration recovered in deep roots was related to the lowest PHE concentration recovered in its associated soil (conversely for the top roots and its soil). Experiments conducted with rice cultures clearly demonstrated that PAHs recovered in roots were related to PAH concentrations in air (Jiao et al., 2007). PHE recovered in roots came from shoots through phloemic transport or from soil. Our results provide argument for phloemic transport from leaves to roots but call for complementary experiments using radiolabelled compounds.

As a consequence of the high PHE contamination of clover shoots and its absorption in inner tissues, leaf and stem biomasses were strongly diminished (- 30%) while root biomass remained unaffected. Such results highlight a reliable physiological impact of PHE on clover growth such as disturbances in the photosynthesis process (Oguntimehinet al., 2008; Oguntimehinet al., 2010) or in carbon allocation. By contrast, the absorbed-PHE by ryegrass did not affect its growth. PHE concentration was too low to induce physiological disturbances or/and ryegrass was not sensitive to PHE. Ryegrass is known to be less sensitive to PAHs than clover in PAH-spiked soils (Sverdrup et al., 2003), but not in the case of an atmospheric exposure.

In the environment, plant resistance to pollutants also depends on its associated root symbionts. Generally, toxicological tests on AMF and *Rhizobium* nodules are conducted with seedlings grown in soils previously contaminated by PAHs (industrially or artificially). On the contrary, in the present work, plants were grown in a soil contaminated by atmospheric deposition gradually over one month. In ryegrass roots, mycorrhizal colonization was too low to determine whether PHE exposure had an effect. The lack of efficient mycorrhizal association with ryegrass roots was in relation with the weak mycorrhizal dependency of this plant species (Wilson, 1998). By contrast, clover roots were colonized by mycorrhizal fungi and nodules during their exposure to atmospheric PHE, emphasizing that PHE exposure did not have any effect on the clover root symbiosis establishment. Consequently, clovers had an efficient mycorrhizal symbiosis during their exposure. In case of a previously PAH contaminated soil, the mycorrhizal root parameters significantly diminished while the plant biomass

5. Transfert et effets du phénanthrène atmosphérique sur 2 espèces prairiales et leur symbiotes racinaires

decreased (Leyval and Binet, 1998; Chiapusio et al., 2007). The benefits and/or disadvantages for the plant to maintain its mycorrhizal symbioses under atmospheric PHE exposure need to be clarified. The percentage of ASN in clover roots decreased in the top layer, indicating that the nodule symbiosis was sensitive to the atmospheric PHE exposure. Results did not permit us to precisely determine whether such response was due to a direct PHE effect on *Rhizobium*, or due to physiological response of clover whose roots were contaminated. However, this diminution implied physiological disturbances in clovers related to nitrogen nutrition.

5.2.5 Conclusion

In one month, atmospheric PHE was recovered in shoots and in roots of clover and ryegrass suggesting a phloemic transport. Clover and ryegrass leaves were the PHE sink but species differences were highlighted. Solely clover shoot biomass was strongly affected (- 30%) while clover maintained efficient mycorrhizal symbioses but not nodule symbioses. Realistic integrative experiments are reliable in monitoring the fate of atmospheric phe in plant soil systems and give an overview of the effects of such pollutants. Thus, interesting perspectives of carbon allocation and n nutrition perturbations are suggested.

Acknowledgements

This work was supported by the Communauté d'Agglomération du Pays de Montbéliard (France). The authors would like to thank Dr R. Cherrier (Chambre d'Agriculture de Lorraine, France) for providing the soil samples used in the experiment, and K. Adamy for its help for analytical procedures. They also thank Dr B. Perren for its English edits.

6 EFFETS DU PHENANTHRENE ATMOSPHERIQUE SUR L'ALLOCATION CARBONEE CHEZ LE TREFLE

6.1 Présentation

Les résultats obtenus lors de l'étude portant sur le trèfle et sur le ray-grass ont montré que la biomasse du trèfle était affectée par l'exposition au PHE atmosphérique. Cependant, ces travaux n'ont pas permis de préciser les mécanismes physiologiques impliqués dans cette diminution. Dans la mesure où la biomasse aérienne a subi une diminution de 25 %, tandis que la biomasse racinaire restait constante et que la mycorhization était conservée tout au long de l'étude, nous avons émis l'hypothèse que l'impact observé chez le trèfle pouvait être lié à un effet du PHE portant principalement sur la photosynthèse et/ou sur l'allocation carbonée. Les principaux effets biologiques des HAP sur les plantes relevés dans la bibliographie concernent le processus photosynthétique, les effets sur l'allocation de la plante n'ayant jamais été étudiés, à l'exception d'une étude récente qui rapporte l'effet des HAP contenus dans les sédiments sur l'allocation carbonée chez *Phragmite* (Nie *et al.*, 2010).

L'objectif de cette étude était donc de déterminer si l'allocation du carbone était effectivement perturbée chez le trèfle après 1 mois d'exposition au PHE atmosphérique.

Pour cela, les trèfles ont été exposés dans les mêmes conditions que précédemment (1 mois ; 160 $\mu\text{g m}^{-3}$) et l'allocation du carbone a été analysé dans le système sol-plante en effectuant un marquage au $^{13}\text{C-CO}_2$.

Cette étude a mis en évidence :

- Une perturbation de la croissance, en particulier du taux d'assimilation net,
- Une modification de l'allocation de biomasse
- et un changement dans l'allocation du carbone.

Plus précisément, les résultats obtenus ont montré :

- Une rétention du carbone dans les feuilles, probablement pour assurer la mise en place de mécanismes de réparation ou de défense,
- Une diminution de l'allocation carbonée vers les racines, qui pourrait être due à une diminution de l'exsudation racinaire et/ou de l'export de carbone vers les symbiontes.

6.2 Atmospheric phenanthrene pollution modulates carbon allocation in red clover
(*Trifolium pratense* L.)

ARTICLE IN PRESS

Environmental Pollution xxx (2011) 1–7



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol



Atmospheric phenanthrene pollution modulates carbon allocation
in red clover (*Trifolium pratense* L.)

Dorine Desalme^a, Philippe Binet^a, Daniel Epron^{b,c}, Nadine Bernard^a, Daniel Gilbert^a,
Marie-Laure Toussaint^a, Caroline Plain^{b,c}, Geneviève Chiapusio^{a,*}

^a Université de Franche-Comté, CNRS, UMR 6249 Chrono-environnement, BP 71427, F-25211 Montbéliard Cedex, France

^b Nancy Université, UMR 1137, Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Faculté des Sciences, BP 70239, F- 54506 Vandœuvre-les-Nancy Cedex, France

^c INRA, UMR 1137, Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Centre INRA de Nancy, F- 54280 Champenoux, France

Publié dans *Environmental Pollution* (IF 3.42)

Abstract

The influence of atmospheric phenanthrene (PHE) exposure ($160 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) during one month on carbon allocation in clover was investigated by integrative (plant growth analysis) and instantaneous ^{13}C pulse-labelling approaches. PHE exposure diminished plant growth parameters (relative growth rate and net assimilation rate) and disturbed photosynthesis (carbon assimilation rate and chlorophyll content), leading to a 25% decrease in clover biomass. The root-shoot ratio was significantly enhanced (from 0.32 to 0.44). Photosynthates were identically allocated to leaves while less allocated to stems and roots. PHE exposure had a significant overall effect on the ^{13}C partitioning among clover organs as more carbon was retained in leaves at the expense of roots and stems. The findings indicate that PHE decreases root exudation or transfer to symbionts and in leaves, retains carbon in a non-structural form diverting photosynthates away from growth and respiration (emergence of an additional C loss process).

Capsule: Exposure of clover to atmospheric PHE affected not only its growth, but also biomass partitioning and C allocation among its organs.

Key-words: atmospheric PAH; plant-soil system; biomass partitioning; plant growth analysis; ^{13}C -labelling.

Abbreviations: PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; PHE, phenanthrene, R:S, root-shoot biomass ratio; RGR, relative growth rate; NAR: net assimilation rate; C_{MIC} , microbial biomass C; chl, chlorophyll

6.2.1 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are persistent, ubiquitous organic by-products of the incomplete combustion of fossil fuel and biomass. They reach ecosystems through short or long-range atmospheric deposition of particles or gas (Wild and Jones, 1995). Since they can exert toxic mutagenic and carcinogenic properties the contamination of ecosystems by PAHs raises environmental and human health issues (IARC, 1983). The pivotal position of plants in natural and agro ecosystems provides an exposure route for PAHs to the higher trophic levels (Kipopoulou et al., 1999).

Atmospheric PAHs are well studied in field experiments for environmental monitoring (Srogi, 2007). In such a context, PAH effects mainly depend on the exposure concentration, the time and the ability of plants to take up and accumulate such pollutants. Nevertheless, the physiological mechanism accounting for the effects of PAHs on plant growth was sparsely considered mostly because of inhomogeneous environments. Hence, experimental devices that simulate atmospheric PAH exposures were required to clarify such physiological aspects (Zuo et al., 2006). Until now, PAH effects have been mainly studied in the case of root exposure through contaminated soil or water (Aina et al., 2006). In such a context, PAHs induced physiological disturbances, such as the decrease in germination, growth (root length and shoot biomass) and in chlorophyll content (chlorophyll *a* and *b*) (Kummerova et al., 2006, 2008, 2010; Liu et al., 2009).

In the few studies concerning atmospheric exposure to PAHs, plant biomass was usually affected but contradictory results were reported for biomass partitioning, with either leaf or root biomass diminished by PAH exposure. For example, biomass production of *Cucumis sativus* and *Brassica napus* was altered by foliar application of an aqueous solution of PAHs (Huang et al., 1996). Root biomass of *Lactuca sativa* (lettuce) and *Raphanus sativus* (radish) was affected by 2 weeks of foliar application of anthracene in aerosol form (Wieczorek and Wieczorek, 2007). Physiological disturbances in primary metabolic processes in plants were also reported. For instance, the photosynthetic rate decreased by about 20% in lettuce and radish exposed to anthracene (Wieczorek and Wieczorek, 2007). A decrease in photosynthetic and respiration activities was also observed in *Pinus densiflora* and *Lycopersicon esculentum* when their foliage was fumigated with fluoranthene (Oguntimehin et al., 2008, 2010).

6. Effets du phénanthrène atmosphérique sur l'écophysiologie du trèfle violet

In a previous work (Desalme et al., 2011), a significant decrease in shoot biomass was highlighted in clover exposed to atmospheric phenanthrene, while root biomass remained unchanged. Such a biomass decrease in clover remained unexplained but suggested a change in carbon allocation. Plants do regulate carbon allocation in response to abiotic stress in a way to ensure their survival (Grantz, 2003; Pell et al., 1994; Ruehr et al., 2009). Carbon allocation in plants is assessed by integrative (plant growth analysis) and/or instantaneous (^{13}C -CO₂ labelling) approaches. Plant growth analysis is an explanatory and holistic approach to interpret plant form and function across harvest-intervals that relates growth to carbon acquisition and allocation (Hunt et al., 2002). Additional information is given by the ^{13}C -CO₂ labelling technique which permits to elucidate the fate of recently assimilated carbon within the plant soil system (Olsson and Johnson, 2005). The impact of atmospheric PAHs on carbon allocation in plants has been sparsely investigated solely in plants grown in petroleum-polluted soil. Results demonstrated that carbon allocation was modified in favor of belowground parts in response to root exposure to PAHs (Nie et al., 2010).

The main objective of this work was to elucidate how carbon allocation in plant and soil compartments was affected by atmospheric phenanthrene exposure. Clover was selected as a functionally important model grassland species that is found in both natural and agroecosystems. Phenanthrene (PHE) is a gaseous PAH generally considered as a model of PAH because of its ubiquity and its preponderance in the atmosphere (Gioia et al., 2006). Clover was grown in agricultural soil and exposed to a PHE-enriched atmosphere during one month. We hypothesized that, at the end of the PHE exposure, 1) the relative growth rate (RGR), net assimilation rate (NAR) could diminish and 2) the root:shoot (R:S) allometric coefficient and the carbon allocation (i.e. ^{13}C labelling) to roots could be impaired.

6.2.2 Material and Methods

6.2.2.1 Culture and exposure

Red clover (*Trifolium pratense* L., var. Jonas, Caillard) seeds were disinfected (5 min in ethanol followed by 2 h in sodium hypochlorite solution (4%, v/v)) and germinated in Petri dishes with Vincent medium during 3 days (Purchase et al., 1997). The soil that came from an agricultural field in Maconcourt (Vosges, France) was characterized as an eutric cambisol (WRB). Thirty-eight plastic pots (12 cm high, 8 cm diameter) were filled with 300g dry weight (DW) of 2 mm-mesh sieved soil. Nine seedlings were transplanted into each pot and cultivated in a thermostatic growth chamber (25°C, photoperiod 12h/12h, 70% constant relative humidity, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation (PAR)). After one month of culture, 12 pots were harvested as a starting point for growth analysis.

6. Effets du phénanthrène atmosphérique sur l'écophysiologie du trèfle violet

Four pots were placed inside polluted and control chambers (n= 3 chambers for both treatments, i.e. 24 pots in total) during one month (20 °C, photoperiod 12h/12h, 135 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR). An additional set of 1 polluted and 1 control chamber was installed to provide unlabelled plant and soil materials. As described in Desalme et al. (2011), the air was enriched with PHE before reaching each polluted chamber by passing through an evaporator filled with PHE pills. PHE concentrations in air were monitored throughout the experimentation in each chamber (polluted and control) with passive samplers made of activated carbon.

6.2.2.2 Labelling

After one month of PHE exposure, the ^{13}C -labelling was performed using the exposure chambers with the holes fitted with a rubber septum. The 3 replicate chambers were labelled simultaneously. Evolution of $^{12}\text{CO}_2$ and $^{13}\text{CO}_2$ concentrations inside each chamber was monitored simultaneously with a $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$ infrared gas analyzer (S710, SICK/MAIHAC). When the chamber was closed, the ambient CO_2 concentration declined at a rate of 0.825 and 1.05 $\mu\text{mol CO}_2 \text{s}^{-1}$ in polluted and control system, respectively. When $^{12}\text{CO}_2$ concentration reached values around 120 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, pure $^{13}\text{CO}_2$ (99.299 atom %; Eurisotop, Cambridge Isotope Laboratory Inc., Andover, MA) was injected at a flow rate set to maintain $^{13}\text{CO}_2$ concentration between 600 and 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ while $^{12}\text{CO}_2$ concentration ranged between 200 and 300 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. After 1.5-h labelling, the chambers were opened and vented for 10 minutes to remove all $^{13}\text{CO}_2$ in excess then the light was turn off. The first sampling was done 15 min after turning off the lights (i.e. 2 hours after the beginning of the labelling) (T0).

6.2.2.3 Sample collection

Leaves, stems, roots and soil were sampled over a 4-day period: 2 h (T0), 14 h (T1), 38 h (T2) and 86 h (T3) after the beginning of the labelling. Samples of unlabelled pots (^{13}C natural abundance) were collected just before the labelling to avoid any risk of contamination from 6 additional chambers (3 polluted and 3 controls) devoted to provide unlabelled samples. At each sampling time and in each pot (n=3 per treatment), plant shoots were rapidly cut from roots, separated into leaves and stems. The root/soil system was separated into top (0-1cm depth; 50 g DW) and deep layer (1-15 cm depth; 250 g DW) where the roots were recovered and rinsed with distilled water. All the plant samples were weighted and frozen in liquid nitrogen (- 80 °C) before being freeze-dried and ground to powder for further analyzes. Soil samples were all divided into 2 subsamples for PHE quantification (dry soil) and microbial biomass measurements (fresh soil), respectively.

6.2.2.4 Total organic content and ^{13}C abundance determination in the different C pools

Plant samples were analyzed for total C and N with a NC elemental analyzer (CE instruments, NA 1500, Italy). Each soil sample was divided into 2 samples: one kept as is (non-fumigated samples) and the other submitted to chloroform fumigation extraction during 24h to solubilize microflora (fumigated samples). Microbial biomass was extracted from each soil samples (40 g of fresh soil) by with of K_2SO_4 (100 mL of 0.05 M) (Vance et al., 1987). Total organic content in the soil and in K_2SO_4 extracts was determined with a TOC analyzer (TOC-V 5000, Shimadzu). Microbial biomass C (C_{MIC}) was calculated as the difference of C content between the fumigated and the non-fumigated extracts. ^{13}C isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) in plant, soil and K_2SO_4 extracts were determined by an isotope ratio mass spectrometer (IRMS Finnigan, Delta S, Germany). By convention, ^{13}C isotope composition was expressed relative to Pee Dee Belemnite standard ($R_{\text{PDB}} = 0.011179602$). The following equation was used to calculate the $\delta^{13}\text{C}$ of microbial biomass ($\delta^{13}\text{C}_{\text{MB}}$, ‰)

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{MB}} = \frac{\delta^{13}\text{C}_f \times C_f - \delta^{13}\text{C}_{\text{nf}} \times C_{\text{nf}}}{(C_f - C_{\text{nf}})} \quad \text{Eqn 1}$$

where C_f and C_{nf} refer to the amount of C extracted from fumigated and non-fumigated soil, respectively, and $\delta^{13}\text{C}_f$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{nf}}$ to their $\delta^{13}\text{C}$ values.

Isotope composition of CO_2 respired by the soil-plant system was recorded during 3 consecutive days on the 3 polluted and the 3 control pots collected at T3. Each pot was introduced inside an airtight 2.4 L-chamber. The accumulation of $^{12}\text{CO}_2$ and $^{13}\text{CO}_2$ in the dark were measured during 30 minutes with the $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$ infrared gas analyzer (S710, SICK/MAIHAC, Germany). The $[^{12}\text{CO}_2]$ and $[^{13}\text{CO}_2]$ were used to calculate the isotope composition of the air inside the chamber ($\delta^{13}\text{C}$).

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2} \cdot R_{\text{PDB}} - 1 \quad \text{Eqn 2}$$

$\delta^{13}\text{C}$ was plotted against the inverse of total CO_2 concentration (Keeling plots) to estimate the isotope composition of respired CO_2 (Keeling, 1958; Ngao et al., 2005).

Total respiration (in mg C h^{-1}) was calculated from the slope of the linear increase in total CO_2 concentration in the chamber.

The relative abundance of ^{13}C in any compartment including respiration (A_i , expressed in atom %) can be calculated as

6. Effets du phénanthrène atmosphérique sur l'écophysiologie du trèfle violet

$$A_i = \frac{{}^{13}\text{C}_i}{({}^{12}\text{C} + {}^{13}\text{C})_i} = \frac{\left(\frac{\delta^{13}\text{C}_i}{1000} + 1\right) \times R_{PDB}}{\left[\left(\frac{\delta^{13}\text{C}_i}{1000} + 1\right) \times R_{PDB} + 1\right]} \quad \text{Eqn 3}$$

The ^{13}C label recovered in any compartment i (LR_i , mg ^{13}C) was calculated as

$$\text{LR}_i = \frac{(A_{i,lp} - A_{i,up})}{100} \times Q_i \quad \text{Eqn 4}$$

with Q_i the quantity of C in the compartment i (mg C). lp and up denote labelled and unlabelled pots.

For plant materials, Q_i was the product of the carbon content (C_i) and the dry mass (DM_i) of the compartment i . For microbial biomass, Q_i was the product of C_{MIC} and the soil mass per pot.

Cumulative ^{13}C recovered in respiration (LR_r) in the dark was determined assuming an exponential decay of the amount of excess ^{13}C recovered in respiration at a given time ($R_{13\text{Cex},t}$) according to Plain *et al.* (2009). $R_{13\text{Cex},t}$ (mg $^{13}\text{C h}^{-1}$) was calculated according to Eqn 4 using R instead of Q_i . An exponential function was fitted to the data

$$R_{13\text{Cex},t} = R_{13\text{Cex},0} \times \exp(-K \times t) \quad \text{Eqn 5}$$

where t is time after labelling (in hours) and K is the decay constant. K and $R_{13\text{Cex},0}$ are the best-fit adjusted parameter of the model.

LR_r at any time can be calculate using an integral of Eqn 5

$$\text{LR}_{r,t} = \text{LR}_{r,\infty} \times (1 - \exp(-K \times t)) \quad \text{Eqn 6}$$

with the asymptotic value of cumulative ^{13}C recovered in respiration ($\text{LR}_{r,\infty}$), i.e., the total amount of labelled carbon that could be recovered in the respiration, calculated as the ratio of $R_{13\text{Cex},0}$ to K .

Finally, the fraction of assimilated ^{13}C recovered in the compartment i (FLR_i , %) of the plants was expressed in percentage of the total quantity of ^{13}C assimilated by the plant (i.e. the quantity of ^{13}C in the plants harvested at T_0).

$$\text{FLR}_{i,t} = \frac{\text{LR}_{i,t}}{\sum_i \text{LR}_{i,0}} \quad \text{Eqn 7}$$

The partitioning of LR in each compartment at a given harvest-time ($\text{PLR}_{i,t}$, %) was expressed in percentage of the total ^{13}C recovered in the system at the respective harvest-time t (i.e. the total ^{13}C recovered at T_1 , T_2 or T_3)

$$PLR_{i,t} = \frac{LR_{i,t}}{\sum_i LR_{i,t}} \quad \text{Eqn 8}$$

6.2.2.5 PHE extraction and quantification in air, plant and soil

At the end of the exposure time, PHE pills were removed from the evaporator of the polluted chambers. PHE sorbed into activated carbon was extracted with 15 mL of carbon disulphide (AnalaR Normapur, VWR Prolabo, purity > 99.9%) under 10-second agitation.

The plant sample extraction consisted in mixing 100 mg DW of polluted and control stems, leaves or roots with diatomaceous earth (5 g). Extraction was performed twice with 20 mL of cyclohexane (Carlo Erba RPE) by an accelerated solvent extraction (ASE100; Dionex, France) in 10 mL-cell during 14 minutes (100°C, 100 bars).

The soil sample extraction consisted in mixing 50 g DW of polluted and control top or deep layers of soils with diatomaceous earth (10 g). Extraction of the mix was performed twice with 120 mL of cyclohexane (Carlo Erba RPE) by ASE in 100 mL-cell during 14 minutes (100°C, 100 bars).

PHE quantifications in passive samplers, plants and soils were performed with a Gas Chromatography coupled with a Mass Spectrometer (GCMS-QP5050A; Shimadzu, France). An automatic sampler was used to inject 1 µL of sample in a stationary phase (capillary column; 25 m long; 0.22 mm diameter, 70°C to 300°C, 20 min, 1 mL min⁻¹). PHE retention time was 15.1 min. PHE concentrations recovered in leaves, stems, roots, and soils were expressed in µg g⁻¹ DW.

6.2.2.6 Protein and photosynthetic pigment contents

For total protein quantification, samples of 100 mg fresh weight (FW) were ground in liquid nitrogen, with an extraction buffer (Tris-buffer, pH=8) and polyvinylpyrrolidone (0.05 g per 100 mg plant FW) (Pedrol Bonjoch and Ramos Tamayo, 2001). Homogenates were then centrifugated (16000 rpm for 20 min, 2°C). The soluble protein content of the supernatant was determined by the Coomassie Blue method, using serum albumin as standard (Bradford, 1976).

Photosynthetic pigment content (chlorophyll *a* and *b*, carotenoids) in leaves and stems were extracted from 100 mg FW ground with mortar and pestle in 10 mL of 80 % acetone (Arnon, 1949). Pigment contents were calculated from the equations of McKinney (1941) with the absorbance of the extracts at 460 nm, 645 nm and 663 nm.

6.2.2.7 Growth analysis

Classical plant growth analysis was performed using the excel tool developed by Hunt *et al.* (2002). The tool derives relative growth rate (RGR) in whole plant dry weight together with its components: net assimilation rate (NAR), specific leaf area (SLA), and leaf weight fraction (LWF) defined and related instantaneously in the following way:

$$\frac{1}{W} \frac{dW}{dt} = \frac{1}{L_A} \frac{dL_A}{dt} \times \frac{L_A}{L_W} \times \frac{L_W}{W} \quad \text{Eqn 9a}$$

$$\text{RGR} = \text{NAR} \times \text{SLA} \times \text{LWF} \quad \text{Eqn 9b}$$

Where t is time, W is total dry weight per pot, L_A is total leaf area per pot, and L_W is total leaf dry weight per pot. The product of SLA and LWF is known as leaf area ratio (LAR)

$$\text{RGR} = \text{NAR} \times \text{LAR} \quad \text{Eqn 10}$$

The root:shoot (R:S) allometric coefficient is also derived for the same harvest-interval.

All 6 parameters are estimated as mean values solely across one harvest-interval with a standard error and 95% confidence limits attached to this estimate.

6.2.2.8 Statistical analyzes

All analyzes were performed with the software R 2.10.1 (R Development Core Team, 2010). Mann-Whitney U tests ($P < 0.05$) were used to test for differences between the treatments (control and polluted) in plant and microbial biomasses, PHE concentrations, total C, total N, protein and photosynthetic pigment contents. Wilcoxon paired test ($P < 0.05$) were used to distinguish differences in PHE concentrations among the different compartments in the same plant soil system.

Analyzes of variance (ANOVA; $P < 0.05$) were performed on the linear mixed effect models to test for overall differences in the ^{13}C allocation (FLR and PLR) with time, between treatments and the interaction between time and treatment.

6.2.3 Results

6.2.3.1 PHE transfer in the plant soil system

In control pots, PHE was not found in air or in plants. PHE concentration in the air of polluted chambers was $160.3 \pm 6.4 \mu\text{g m}^{-3}$. After one month of exposure, PHE quantified in leaves, stems and roots represented 73 %, 25 % and 2 %, respectively, of the total PHE quantity found in the plant. PHE concentrations were 30-fold higher in shoots ($60 \mu\text{g g}^{-1}$) than in roots ($2 \mu\text{g g}^{-1}$) (Table 1). PHE concentrations quantified in the soils were 100-fold lower than concentrations in clover. The

6. Effets du phénanthrène atmosphérique sur l'écophysiologie du trèfle violet

contamination by PHE in the first centimeter of soil ($0.109 \mu\text{g g}^{-1}$) was significantly 5-fold higher than below the first centimeter ($0.022 \mu\text{g g}^{-1}$).

6.2.3.1 Effects of atmospheric PHE on clover

At the end of the one-month exposure to PHE, a significant decrease in the whole clover biomass was noted (Table 2) due to the 25%-decrease in shoot biomass (from 800 mg DW to 580 mg DW). The R:S ratio of polluted clover significantly increased from 0.32 to 0.44 (Table 2) as did the R:S allometric coefficient (1.36 versus 1.56). Significant decreases in relative growth rate (RGR) and net assimilation rate (NAR) were highlighted in PHE-exposed clover (Table 2). The respiration rate remained unchanged ($27.1 \pm 2.5 \text{ mg C g}^{-1}\text{DW day}^{-1}$ and $24.5 \pm 4.6 \text{ mg C g}^{-1}\text{DW day}^{-1}$ for polluted and control system, respectively). Soil microbial biomass C (C_{MIC}) was significantly lower (-30%) in polluted soils than in control soils for both top and deep layers (Table 2). C_{MIC} was 3-fold higher in top soil than in deep soil whatever the treatment.

Tableau 6-1 : PHE concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) recovered in clovers and soils after 1 month of exposure to atmospheric PHE. Data represent the means \pm standard deviation (n=12). Letters indicate a significant difference in PHE concentrations between the different compartments (Wilcoxon-paired test, $P < 0.05$).

PHE concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	
Total plant	$40.9 \pm 18.7^{\text{ad}}$
Shoots	$57.8 \pm 26.4^{\text{b}}$
Leaves	$70.2 \pm 26.8^{\text{c}}$
Stems	$38.1 \pm 27.7^{\text{d}}$
Roots	$1.8 \pm 1.0^{\text{e}}$
Top roots	$1.7 \pm 1.0^{\text{e}}$
Deep roots	$1.9 \pm 1.0^{\text{e}}$
Soil	$0.040 \pm 0.018^{\text{f}}$
Top soil	$0.109 \pm 0.086^{\text{g}}$
Deep soil	$0.022 \pm 0.010^{\text{h}}$

The C:N ratio did not differ in leaf and stem between control and PHE treatment even if the total C content was significantly diminished in stems (Table 3). On the contrary, a decrease in the total N content in roots led to a significant increase in the root C:N ratio (Table 3). Soluble protein contents were not modified by exposure to PHE in any organs of the plant (Table 3). In leaves, chlorophyll (Chl_a , Chl_b and Chl_{a+b}) pigment contents were all reduced in polluted plants but the $\text{chl}a/\text{chl}b$ ratio remained unchanged (Table 4). As carotenoid contents remained stable, the $\text{chl}a+b/\text{carotenoid}$ ratio

6. Effets du phénanthrène atmosphérique sur l'écophysologie du trèfle violet

was significantly diminished by PHE exposure (Table 4). No difference in pigment content was observed in stems.

Tableau 6-2 : Biomasses and growth parameters of clovers after 1 month of exposure to atmospheric PHE (polluted) and to ambient air (control). Data represent the means \pm standard deviation (n=12). Asterisks indicate a significant difference in biomass or in growth parameters between control and polluted clovers (Mann-Whitney U test, $P < 0.05$).

RGR: relative growth rate; NAR: net assimilation rate; LAR: leaf area ratio; LWF: leaf weight fraction; SLA: specific leaf area

	Control	Polluted
Plant biomass (mg)		
Total plant	1060 \pm 99	831 \pm 178 *
Shoots	802 \pm 73	579 \pm 131 *
Leaves	463 \pm 47	358 \pm 84 *
Stems	339 \pm 32	221 \pm 52 *
Roots	258 \pm 42	251 \pm 54
R:S	0.32 \pm 0.04	0.44 \pm 0.07 *
Microbial biomass C (C_{MIC}) ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil)		
Top soil	90.3 \pm 12.3	55.1 \pm 23.2 *
Deep soil	35.9 \pm 6.5	23.6 \pm 9.9 *
Growth parameters		
RGR $\text{mg g}^{-1} \text{day}^{-1}$	94.4 \pm 3.7	84.8 \pm 5.4 *
NAR $\text{g m}^{-2} \text{day}^{-1}$	5.2 \pm 0.6	4.6 \pm 0.7 *
LAR $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$	232 \pm 14	236 \pm 21
LWF $\text{mg g}^{-1} \text{day}^{-1}$	419 \pm 21	427 \pm 28
SLA $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$	57.4 \pm 5.8	58.0 \pm 8.2
R:S allometry	1.36 \pm 0.04	1.56 \pm 0.06 *

Tableau 6-3 : Total C, total N, and soluble protein contents in clover leaves, stems, roots and in total plant (mg g^{-1} dry weight) after 1 month of exposure to atmospheric PHE (polluted) and to ambient air (control). Data represent the means \pm standard deviation (n=12). Asterisks indicate a significant difference in total C, total N contents, or C:N ratio between control and polluted clovers (Mann-Whitney U test, $P < 0.05$).

	Leaves		Stems		Roots		Plant	
	Control	Polluted	Control	Polluted	Control	Polluted	Control	Polluted
Total C	419 \pm 6	417 \pm 7	398 \pm 3	392 \pm 5 *	364 \pm 27	380 \pm 36	402 \pm 7	400 \pm 8
Total N	16 \pm 5	17 \pm 5	9 \pm 2	9 \pm 2	18 \pm 3	14 \pm 1 *	14 \pm 3	14 \pm 3
C : N ratio	28 \pm 6	27 \pm 7	46 \pm 8	43 \pm 8	21 \pm 3	27 \pm 3 *	30 \pm 6	30 \pm 5
Proteins	30 \pm 9	30 \pm 10	9 \pm 3	9 \pm 2	27 \pm 12	26 \pm 6	16 \pm 9	17 \pm 8

6. Effets du phénanthrène atmosphérique sur l'écophysiologie du trèfle violet

Tableau 6-4 : Photosynthetic pigment contents (mg g⁻¹ dry weight) in leaves and stems of clovers after 1 month of exposure to atmospheric PHE (polluted) and to ambient air (control). Data represent the means \pm standard deviation (n=12). Asterisks indicate a significant difference in chlorophyll contents between control and polluted clovers (Mann-Whitney U test, $P < 0.05$).

	Leaves		Stems	
	Control	Polluted	Control	Polluted
chl <i>a+b</i>	7.3 \pm 2.3	5.0 \pm 1.5 *	2.0 \pm 1.0	1.4 \pm 0.3
chl <i>a</i>	5.1 \pm 1.7	3.4 \pm 1.1 *	1.1 \pm 0.4	0.9 \pm 0.3
chl <i>b</i>	2.3 \pm 0.7	1.6 \pm 0.5 *	0.9 \pm 0.6	0.5 \pm 0.2
chl <i>a</i> /chl <i>b</i>	2.2 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	1.5 \pm 0.4	1.7 \pm 0.5
carotenoids	0.7 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2	0.10 \pm 0.04	0.11 \pm 0.05
chl <i>a+b</i> /carot	9.3 \pm 1.2	7.8 \pm 1.2 *	14.2 \pm 3.8	11.0 \pm 1.9

6.2.3.2 ¹³C dynamics and allocations in the different compartments

At the first sampling time-point (T0), the ¹³C excess averaged 2270 $\mu\text{g } ^{13}\text{C}$ per pot, indicating a significant assimilation of ¹³C by clover during labelling. As expected, the ¹³C was totally recovered in plants at T0 (Fig. 1b). By assumption, there was no ¹³C recovered in the respiration at T0 (Fig. 1c). The highest proportion of ¹³C in the system always occurred in shoots (Fig. 1d). At T0, 97 % of the ¹³C was recovered in shoots (75 % in leaves, 22 % in stems) and 3 % in roots (Fig. 1d-g). The initial percentages of ¹³C were similar between control and polluted system in all plant organs (Fig. 1d-g).

The fraction of assimilated ¹³C (FLR_{i,t}) recovered in the different compartments changed over time except in stems (Table 5). The ¹³C dynamics was not modified by the treatment in any compartment, as demonstrated by the non significant time \times treatment interaction in the lme model (Table 5). The cumulative amount of ¹³C recovered in the respiration obviously increase with time for both treatments (Fig. 1c). The ¹³C recovered in leaves decreased over time, losing more than 50% of the fixed ¹³C between T0 and T3 (Fig. 1e). In roots, the fixed ¹³C peaked at T1 (14 % for polluted clover; 22% for control clover) and remained stable from that moment (Fig. 1g). The ¹³C in microbial biomass was always very low, increasing between T0 and T1 (0.10 %) and decreasing slowly afterwards (Fig. 1h).

Although the amount of ¹³C recovered in all the studied C pools -except in leaves- was lower in polluted than in control system, this was only significant in roots, stems, cumulative respiration and total ¹³C recovery (Table 5; $P < 0.05$). The total percentage of ¹³C recovered during the chase period

6. Effets du phénoanthrène atmosphérique sur l'écophysiologie du trèfle violet

(Fig. 1a) was significantly lower in the polluted system (60-82%) than in the control system (90-102%) (Table 5; $P < 0.05$). The total amount of ^{13}C that can be recovered in respiration ($\text{LR}_{r,\infty}$) was significantly lower in polluted system (30%) than in control plant soil system (38%).

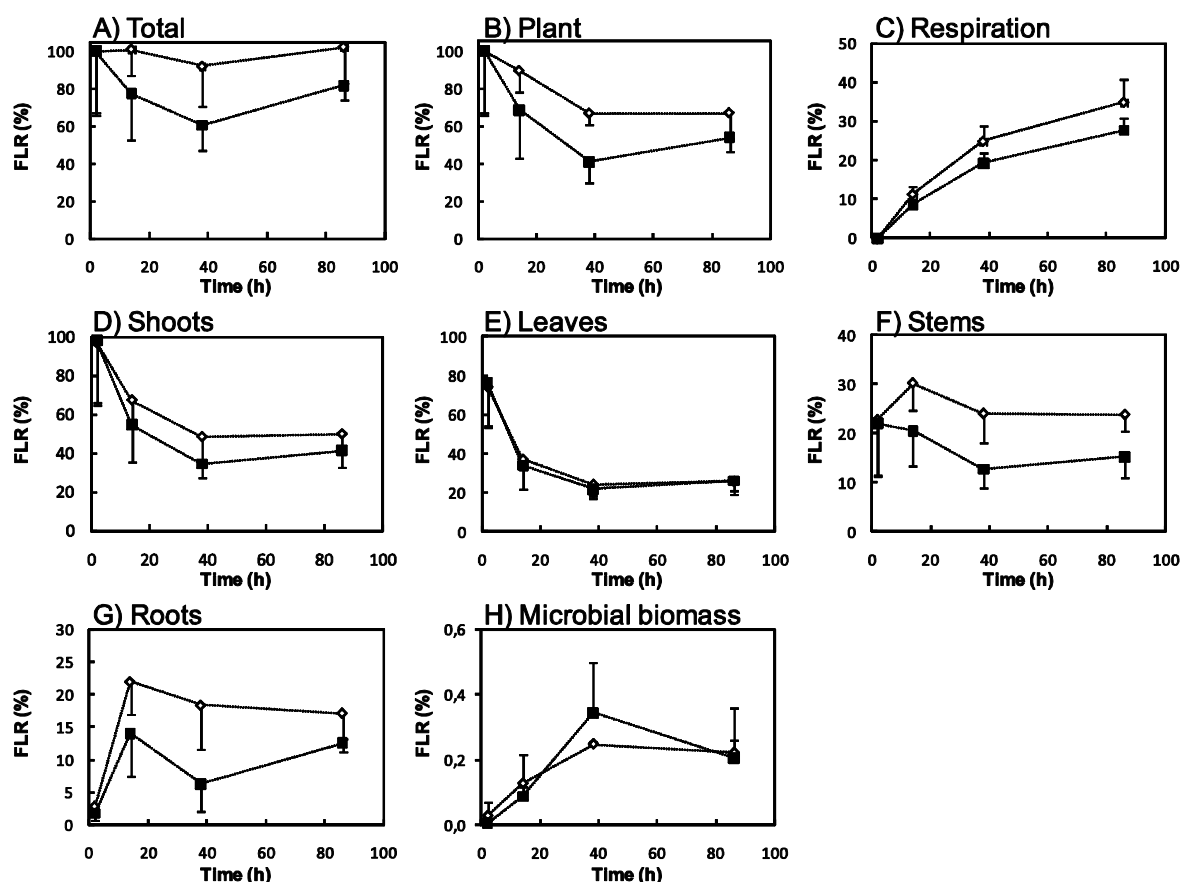


Figure 6-1 : Kinetics of the fraction of ^{13}C label recovered (FLR, %) in the total plant-soil system (A) , plant (B), respiration (C), shoots (D), leaves (E), stems (F), roots (G) and microbial biomass (H) after 1 month of exposure to atmospheric PHE (polluted, closed squares ■) and to ambient air (control, open diamonds ◇). Data are expressed in percentage of ^{13}C label recovered in each compartment at each harvest-time according to the total ^{13}C recovery in the soil-plant system at T0. Each point represent the mean \pm standard deviation ($n=3$). T0 (2h), T1 (14h), T2 (38h) and T3 (86h).

Tableau 6-5 : Results of the linear mixed effect (lme) models to test for overall differences between treatments (control and polluted), time and their interaction for the fraction of ^{13}C label (FLR, %) recovered in the total plant, shoots, leaves, stems, roots, microbial biomass (MB) and in cumulative respiration (respi). Significant values ($P < 0.05$) are shown in bold.

	FLR total		FLR plant		FLR respi		FLR shoots		FLR leaves		FLR stems		FLR roots		FLR MB	
	F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value
Treatment	9.13	0.014	7.33	0.024	10.48	0.006	1.18	0.297	0.03	0.864	7.20	0.019	12.86	0.003	0.005	0.943
Time	1.35	0.306	4.20	0.051	128.49	<0.0001	10.67	<0.001	22.73	<0.0001	1.11	0.379	14.31	<0.001	12.47	<0.001
Treatment \times Time	0.16	0.854	0.26	0.777	1.75	0.205	0.19	0.901	0.05	0.984	0.65	0.598	1.71	0.213	0.86	0.486

6. Effets du phénanthrène atmosphérique sur l'écophysiologie du trèfle violet

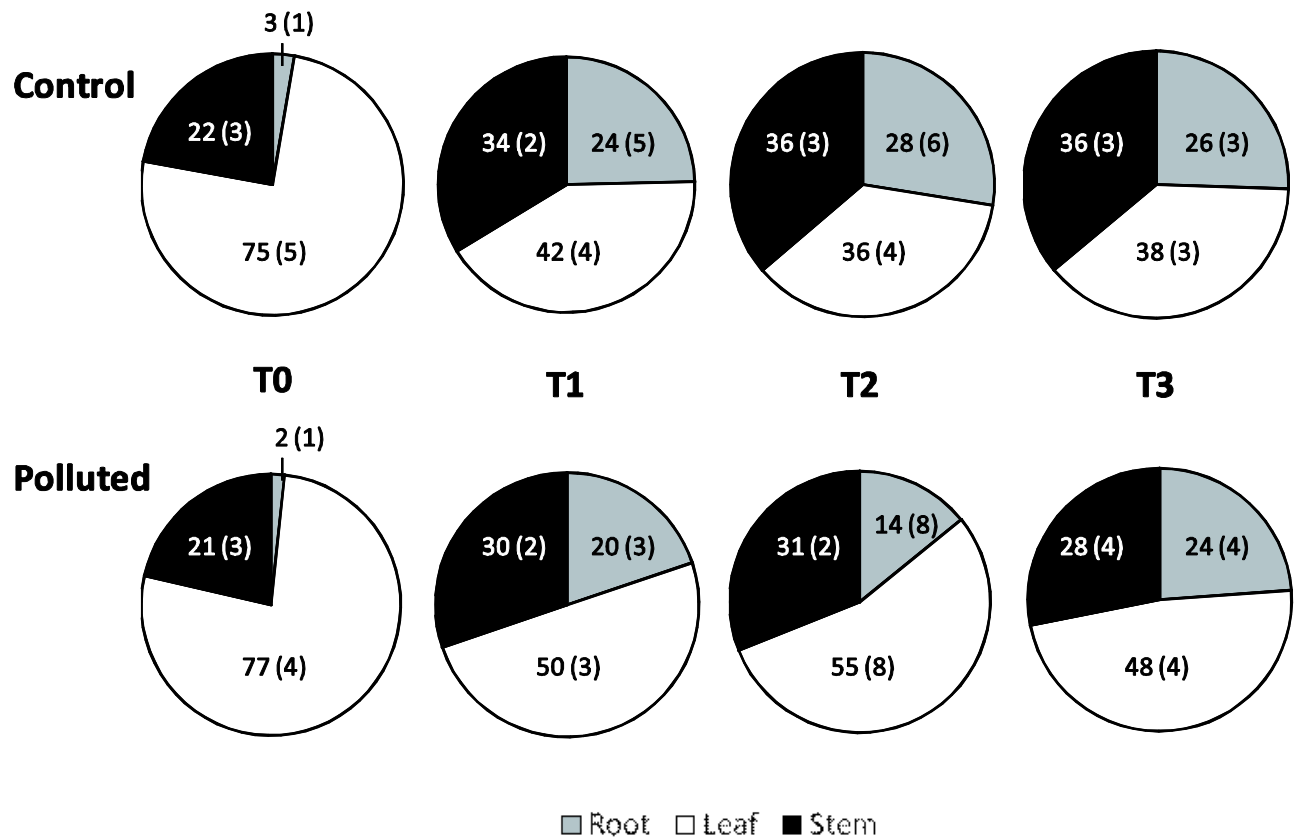


Figure 6-2 : Partitioning of ^{13}C (PLR, %) among plant organs (leaves, stems and roots) after 1 month of exposure to atmospheric PHE (polluted) and to ambient air (control). Each fraction of the pie represent the mean percentage of ^{13}C recovery ($n=3$) in leaves, stems, and roots according to the total ^{13}C recovery in the soil-plant system at the respective harvesting time. Data represent the means ($n=3$) and standard deviations are indicated in parentheses. T0 (2h), T1 (14h), T2 (38h) and T3 (86h)

In terms of ^{13}C partitioning ($\text{PLR}_{i,t}$) among plant organs at each harvest-time, the recent ^{13}C was preferentially retained in the above-ground organs in both polluted and control system (Fig. 2). The same partitioning was observed at T1, T2 and T3 (ANOVA; n.s.). Exposure to PHE had a significant overall effect on the carbon partitioning among the clover organs (Table 6; $P<0.05$), more ^{13}C being retained in the leaves (51% versus 39% on average in polluted and control plant soil system, respectively) at the expense of the other plant sinks (roots and stems). Moreover, the significant time \times treatment interaction in leaves implied an effect of PHE exposure on the ^{13}C kinetics in leaves (Table 6).

6. Effets du phénanthrène atmosphérique sur l'écophysiologie du trèfle violet

Tableau 6-6 : Results of the linear mixed effect (lme) models to test for overall differences between treatments (control and polluted), time and their interaction for the ^{13}C label partitioning (PLR, %) among plant organs (leaves, stems, roots). Significant values ($P < 0.05$) are shown in bold.

	PLR leaves		PLR stems		PLR roots	
	F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value
Treatment	28.62	0.0001	33.38	0.0001	7.33	0.018
Time	76.13	<0.0001	54.12	<0.0001	28.77	<0.0001
Treatment \times Time	3.53	0.0454	2.98	0.07	2.18	0.139

6.2.4 Discussion

The study of the transfer of organic pollutants in realistic concentrations is a fundamental requirement for the evaluation of their phytotoxicity. In the present investigation, the $160 \mu\text{g m}^{-3}$ PHE exposure corresponded to atmospheric PHE concentrations selected in the few atmospheric exposure studies (from 50 to $330 \mu\text{g m}^{-3}$) performed under controlled conditions (Lin et al., 2006; Wild et al., 2006). Ambient PHE concentrations are highly variable in the environment. Values are expressed in orders of magnitude ranging from pg m^{-3} in rural areas (Gioia et al., 2006) and ng m^{-3} in urban areas (Prevedouros et al., 2004), to $\mu\text{g m}^{-3}$ near emission point sources, e.g. near aluminum smelters and heavy traffic roads (Hafner et al., 2005).

An effective transfer of gaseous PHE from the air to all compartments of the plant soil system was noted. Leaves were the most contaminated organs, followed by stems and roots. Exposure to atmospheric PHE provoked a significant diminution in clover biomass directly related to the significant 25 %-decrease in shoot biomass. Such result confirmed the PHE effect on clover biomass previously observed at similar exposure concentration (Desalme et al., 2011) and thus clearly called to elucidate the physiological processes involved. Moreover, PHE concentrations found in soils were low (40 ng g^{-1} dry soil) and corresponded to realistic diffuse exposure. For example, PAH concentrations in soils from several North China sites far from industrial areas, roadsides and any other pollution source ranged from 31 to 1475 ng g^{-1} dry soil (Wang et al., 2010).

Plant growth analysis which enabled the separation of the different components of plant growth demonstrated a concomitant lower RGR and NAR values in polluted clover, indicating that net carbon assimilation was impaired by PHE exposure. Photosynthetic machinery was indeed affected in polluted clover. Lower chlorophyll contents quantified in leaves exposed to atmospheric PHE suggested that chloroplasts were exposed to PHE damages and involved in the observed decrease in C assimilation. A decrease in NAR could also be explained by an increase in C losses, either through respiration, exudation or volatilization (Farrar and Jones, 2000). The fraction of ^{13}C allocated to respiration was significantly lower in polluted clover whilst respiration rate remained unaffected.

6. Effets du phénanthrène atmosphérique sur l'écophysiologie du trèfle violet

Diminution of NAR was therefore not only explained by the sole diminution of C assimilation rate but also by an increase in C losses by another process than the respiration.

The other main consequence of PHE exposure on the plant growth was an increase in the R:S allometric coefficient, highlighting a perturbation in carbon allocation. In general, higher values of R:S are considered to be more advantageous to plants under stress conditions – for example under salt stress (Katsuhara et al., 2003). An R:S increase was observed in *Phragmite australis* grown on petroleum-polluted soils and was explained by an enhanced allocation of photoassimilates to roots and microbial biomass (Nie et al., 2010). However, ^{13}C -labelling underlined a diminution of the label recovered in roots in terms of both fraction of assimilated ^{13}C (FLR) and partitioning (PLR). The fraction of assimilated ^{13}C recovered in leaves was not affected by PHE exposure while the ^{13}C partitioning to leaves was enhanced.

The opposite trends in biomass partitioning and ^{13}C allocation suggested that the ^{13}C that was retained in the leaf and that was not delivered to the root was non-structural C. A shift in biosynthesis pathways in leaves could have occurred, such as the induction of antioxidant compound metabolism. Such an induction was recorded in response to PHE in the aquatic *Riccia fluitans* (Burritt, 2008) and in tea plant grown on PHE-polluted soil (Mei et al., 2009). Thus, an enhanced C allocation to the secondary metabolism should be further investigated.

The diminution of C allocation to roots could result from both the availability of, and the need for, assimilates that accounted for the determination of the C fluxes to any compartments of a soil-plant system (Farrar and Jones, 2000). The photosynthetic source strength could have declined with damage to the photosynthetic apparatus or through retention of photoassimilates in leaves to support repair metabolism as in Pell et al. (1994). The lower allocation to roots could also be explained by a decreased carbohydrate export, as supported by the diminution of allocation to stems. Phloem loading could have been impaired by PHE, as it was recorded in beech trees under drought (Ruehr et al., 2009), and cotton exposed to ozone (Grantz, 2003) by metabolic feedback control. In addition to the availability of assimilates, the demand also account for the allocation of the C fluxes to any compartment of a plant-soil system. Carbon allocated to root provides root growth, respiration and exudation. Root exudation is the primary carbon source for most of the microbial activity in the rhizosphere (McCrary and Andersen, 2000). According to the strong diminution in C_{MIC} of soils exposed to PHE, exudation could decrease in polluted system and could therefore explain a diminution in root demand. In parallel, a decreased C allocation to root symbionts could also be involved. Our results supported such a hypothesis because a significant decrease in N content was noticed in roots. Moreover, in a previous work (Desalme et al., 2011), the percentage of active nodules significantly dropped from 80 to 70 % after one month of exposure to similar atmospheric PHE. Thus, the expensive C allocation to nodules could have been regulated by the host-plant in a way to save C.

6. Effets du phénanthrène atmosphérique sur l'écophysiologie du trèfle violet

The increased ^{13}C partitioning to leaves might also be the consequence of the decrease in shoot biomass rather than its cause. Indeed, either plant response was recent and allocation of photosynthates in leaves would permit to recover from PHE damages, or plant response was older but was not sufficient for the plant to succeed in recovering. Nevertheless, it cannot be concluded about the chronology of the response.

An increase in C losses - such as respiration, exudation or volatilization - was suggested by the NAR diminution. However, neither exudation nor respiration did increase in the polluted plant-soil system. Thus, the significant lower total ^{13}C recovered in the complete polluted system highlighted that, in addition to respiration and exudation, the plants lost ^{13}C through an additional process that we did not account for in our carbon budget. This could originate from the emergence of an original C sink, such as the emission of biogenic volatile organic compounds (BVOCs). An enhanced production of ethylene and ethane (by 11%) was demonstrated in *Pisum sativum* exposed to 5 mg L^{-1} of fluoranthene in test tubes (Kummerova et al., 2010). Recent studies demonstrated that PAHs could induce a phytotoxic response through hormone and defense pathways (Kummerova et al., 2010; Weisman et al., 2010). The involvement of ethylene in the response of plants to PHE has been recently reported in *Arabidopsis thaliana* using mutant experiments in Petri dishes and microarrays (Weisman et al., 2010). Further investigations are required to clearly demonstrate emission of BVOCs in red clover exposed to atmospheric PHE.

This work provides new evidence about the phytotoxic effects of atmospheric phenanthrene on biomass partitioning and C allocation in clover. Our results emphasized perturbations in RGR, NAR and R:S allometric coefficient and led to the conclusion that plant growth as well as biomass partitioning were impaired. Moreover, atmospheric PHE exposure disturbed the photosynthesis process, and changed the distribution of assimilation products among organs and metabolic functions. We propose that such environmental perturbation probably decreased C allocation to microbial biomass through exudation or direct transfer to symbiotic microbes and also led to the emergence of another C sink in addition to plant growth, respiration and exudation. Thus, this work advances our understanding on the physiological response of plants under atmospheric PAH pollution measured in heavily polluted areas.

Acknowledgments

This work was supported by the Pays de Montbéliard Agglomération (PMA). The authors would like to thank Dr R. Cherrier (Chambre d'Agriculture de Lorraine, France) for providing the soil samples used in the experiment, V. Jassey and J. Novaes for their help during the harvest, and C. Antoine for her help with soil microbial biomass extraction. They also thank D. Johnson for its English edits and the two anonymous referees for their valuable review of this work.

7 DISCUSSION

Les différentes études menées au cours de cette thèse ont permis de caractériser plus précisément le devenir et les effets de la contamination atmosphérique par des polluants organiques comme les HAP dans le système sol-plante-microorganismes.

Cette synthèse générale a pour objectif de discuter des résultats les plus significatifs, de mettre en évidence les mécanismes communs aux différentes études, et de proposer des pistes de réflexions pour les recherches futures. Dans la première partie, un bilan sur le dispositif expérimental de pollution atmosphérique sera proposé en accentuant plus particulièrement sur la représentativité environnementale de ce système. La deuxième partie présentera un bilan sur le devenir et les effets d'une pollution atmosphérique par les HAP dans le système sol-plante-microorganismes. Enfin, dans une troisième partie, les effets biologiques de la pollution atmosphérique par le PHE atmosphérique sur le trèfle violet seront discutés.

7.1 Le dispositif de pollution atmosphérique

7.1.1 Méthode de calibration et applications possibles

La recherche bibliographique avait permis de mettre en évidence le manque de dispositifs expérimentaux spécifiquement dédiés à l'étude du devenir et des effets biologiques des HAP atmosphériques dans les écosystèmes terrestres. Pour aborder correctement cette problématique, le système de contamination devait être suffisamment fiable et reproductible. La mise au point et la validation d'une méthode de calibration du dispositif (Chapitre 3) étaient donc des étapes indispensables avant de pouvoir étudier la réponse de microsystèmes sol-plante-microorganismes. Les flux de polluant atmosphérique ont été caractérisés dans les enceintes et des échantillonneurs passifs ont été mis au point pour suivre les concentrations atmosphériques pendant toute la durée des expositions. Cette validation originale couplant l'expérimental à la simulation mathématique, bien qu'appliquée spécifiquement au phénanthrène, est sans aucun doute adaptable à d'autres substances volatiles, HAP ou autre COV.

La lumière est un facteur environnemental qui influence le transfert phloémien des photo-assimilats et module les effets biologiques des HAP par photo-induction. Lors de toutes les expérimentations, les microsystèmes ont toujours été exposés dans les mêmes conditions de luminosité (135 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR) et de photopériode (12h/12h). Cette luminosité correspond à celle d'une journée de novembre et pourrait être augmentée par l'ajout des lampes supplémentaires dans de futures investigations.

La lumière peut également dissiper les HAP dans l'atmosphère. Une expérience complémentaire a ainsi été effectuée pour observer les effets de la lumière sur des solutions de PHE à différentes concentrations. Pour cela, des piluliers contenant les solutions de PHE ont été exposés dans les enceintes dans les mêmes conditions que les microsystemes. Aucune modification de concentration n'a été mesurée, suggérant que les effets de la lumière sur le PHE en solution seraient limités. Dans le même sens, Wild et al. (2005b) avait constaté que le PHE était peu sujet à la photodégradation.

7.1.2 Représentativité environnementale

Ce dispositif expérimental devait constituer un outil pour étudier les mécanismes fondamentaux régissant le devenir des HAP atmosphériques dans différents compartiments environnementaux. Si la simplification des phénomènes existants *in situ* est inévitable en conditions contrôlées, elle reste nécessaire pour distinguer précisément les effets de l'exposition aux HAP atmosphériques sur le sol et la végétation. Ce dispositif a permis de réaliser des études ayant une véritable représentativité environnementale à la fois en termes de concentrations et de mode d'exposition.

Les concentrations atmosphériques en HAP mesurées *in situ* varient beaucoup en fonction de la localisation géographique, mais aussi de la méthode d'échantillonnage choisie. Les concentrations sont exprimées en pg m^{-3} dans les zones reculées et rurales (Gioia *et al.*, 2006), en ng m^{-3} dans les zones urbaines (Prevedouros *et al.*, 2004) et en $\mu\text{g m}^{-3}$ dans les centres urbains denses et près des sources comme des fonderies d'aluminium et des routes ayant un trafic important (Hafner *et al.*, 2005). Dans les enceintes mises en place, la pollution atmosphérique a été générée à partir de la poudre pure de PHE sans ajout supplémentaire de solvant, ce qui limite la génération d'autres composés et les réactions chimiques possibles. Le pastillage de la poudre de PHE a permis de générer des concentrations de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g m}^{-3}$ (Chapitre 3). Ces concentrations, même si elles étaient élevées, restaient réalistes puisqu'elles correspondaient aux concentrations retrouvées à proximité de sources d'émissions comme des usines de production d'aluminium. De plus, les différentes expériences ont montré que les concentrations en PHE générées dans les enceintes d'exposition pouvaient être modulées par la quantité de PHE introduite dans l'évaporateur en début d'expérience. Cette propriété constitue un atout important car il est possible de sélectionner le niveau d'exposition auquel on veut soumettre les microsystemes et de tester l'impact de différentes concentrations atmosphériques en PHE.

Pour exposer les microsystemes sol-plante-microorganismes (Chapitres 4,5 et 6), nous avons choisi des concentrations plus élevées que celles testées pour la mise au point du dispositif. Ce choix a été motivé par le fait que nos expériences constituaient une toute première approche pour évaluer la possibilité d'un transfert et les effets de la pollution atmosphérique par les HAP en laboratoire.

Ce choix s'est finalement révélé judicieux puisque les concentrations retrouvées dans les sols au bout de 2 semaines (Chapitre 4) ou de 1 mois (Chapitres 5 et 6) d'exposition correspondent en surface à celles retrouvées *in situ* aux abords de routes (Tuhackova *et al.*, 2001) et en profondeur, aux valeurs bruit de fond (Achazi & Van Gestel, 2003). Le transfert et les effets observés sur le potentiel mycorhizien et la croissance précoce de plants de poireaux (Chapitre 4) sont donc représentatifs de situations réalistes de pollution atmosphérique.

7.2 Transfert du PHE atmosphérique dans le sol et les végétaux

7.2.1 Distribution des concentrations dans les compartiments

Le dispositif expérimental a permis d'étudier le transfert et les effets biologiques des HAP d'origine atmosphérique dans des microsystemes sol-plante-microorganismes. Les différentes expériences d'exposition au PHE atmosphérique ont montré qu'il pouvait être transféré dans les différents compartiments des microsystemes, incluant le sol et la plante.

7.2.1.1 Transfert dans le sol

Dans le sol, la contamination reste majoritairement confinée dans le 1^{er} cm (*top soil*) où les concentrations sont corrélées à celles mesurées dans l'air (Chapitre 3). Les concentrations retrouvées dans ce 1^{er} cm de sol dépendent également du type de sol (Chapitre 4). Un lien a été démontré entre la concentration en PHE mesurée dans le 1^{er} centimètre de sol et le taux de carbone organique et le pourcentage d'argile respectifs dans le sol de La Bouzule et de Maconcourt. Ces 2 facteurs qui sont liés à la séquestration et à la dissipation des HAP dans les sols pollués (Chung & Alexander, 2002; Amellal *et al.*, 2006b; Chiapusio *et al.*, 2007), pourraient ici expliquer les concentrations finales retrouvées dans les sols après 2 semaines d'exposition aux dépôts atmosphériques de PHE. Enfin, les concentrations retrouvées dans le 1^{er} cm de sol dépendent de la présence d'un couvert végétal (Chapitre 5) qui diminue significativement (facteur 10) la contamination du sol végétalisé par rapport à celle du même sol nu (Fig. 7-1).

La diffusion du polluant en profondeur (*deep soil*), même si elle est faible, est significative qu'il y ait des plantes ou non. De plus, cette diffusion en profondeur serait indépendante de la contamination du sol de surface puisqu'il n'y a pas de facteur de proportionnalité entre les concentrations retrouvées en surface et en profondeur dans le sol. Les concentrations en profondeur restent similaires (env 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ MS) même si les concentrations mesurées en surface sont 10 fois plus élevées (Fig. 7-1).

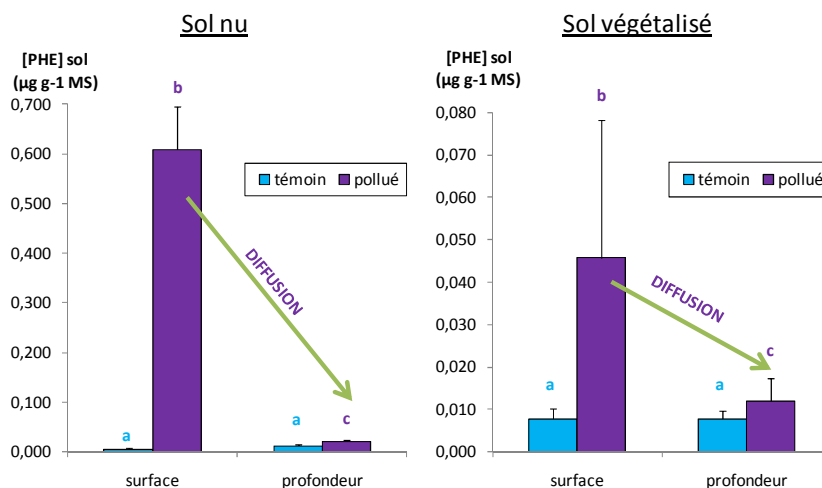


Figure 7-1 : Concentrations en PHE mesurées dans le sol nu ou avec des trèfles après exposition à un air enrichi en PHE (pollué) ou à l'air ambiant (témoin). Test Mann Whitney (témoin/pollué), test Wilcoxon (surface/profondeur) ; $P < 0.05$

7.2.1.2 Transfert dans les végétaux

Dans les végétaux, les feuilles constituent l'organe puit où les concentrations en PHE atteignent respectivement $170 \mu\text{g g}^{-1} \text{MS}$ et $68 \mu\text{g g}^{-1} \text{MS}$ pour le trèfle et le ray-grass (Fig. 7-2). C'est probablement l'interception du PHE atmosphérique par les parties aériennes des végétaux qui a contribué à largement limiter la contamination du sol végétalisé par rapport au sol nu. Il faut cependant noter que les concentrations retrouvées dans le sol sont similaires qu'il soit planté avec du trèfle et du ray-grass alors que les concentrations dosées dans les feuilles des 2 espèces sont significativement différentes.

Les feuilles de trèfle contiennent 2 fois plus de PHE que celles de ray-grass alors que leur surface foliaire est comparable. Il est donc probable que cette différence soit due à l'architecture des deux plantes. En effet, les feuilles de ray-grass sont connues pour leur capacité à s'enrouler (Ringelmann *et al.*, 2009) ce qui a pu limiter la quantité totale de PHE transférée. La structure et la composition de la cuticule ont également pu conditionner l'adsorption du PHE sur les feuilles.

7. Discussion

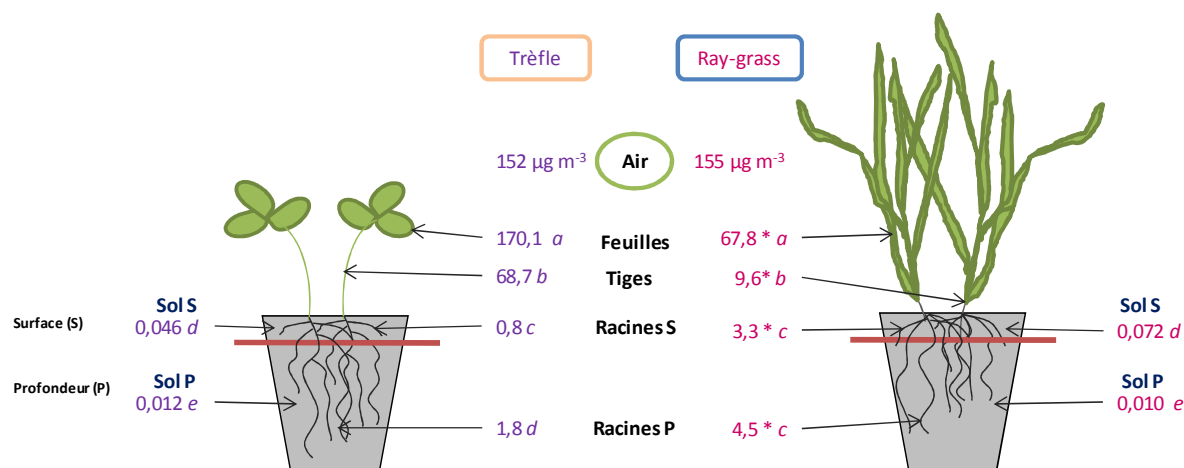


Figure 7-2 : Concentrations en PHE retrouvées dans l'air, les tissus des plantes et le sol dans les 2 système sol-plante-microorganismes étudiés après 1 mois d'exposition au PHE atmosphérique. Les lettres différentes indiquent une différence significative de concentrations entre les différents compartiments du même microsystème (test de Wilcoxon, $P < 0,05$). Les astérisques indiquent une différence significative de concentration entre les 2 microsystèmes (test de Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Enfin, dans toutes les expériences d'exposition atmosphérique menées indépendamment et dans les différentes espèces végétales testées, les concentrations en PHE retrouvées dans les racines ont augmenté. De plus, les concentrations en PHE mesurées dans les racines profondes sont plus élevées que celles des mesurées dans les racines de surface, inversement à ce qui a été retrouvé dans le sol. Deux voies de transfert sont possibles pour expliquer l'origine du PHE retrouvé dans les racines : soit un transfert air-sol-racines, soit un transfert air-feuilles-racines par l'intermédiaire de la circulation phloémienne. Les résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche ayant permis de distinguer les concentrations dans le sol de surface et dans le sol profond nous permettent de privilégier l'hypothèse d'un transfert phloémien. De plus, il est également possible de conclure que ce transfert feuilles-racines est plus important chez le ray-grass que chez le trèfle mais nos résultats ne permettent pas d'expliquer si cette différence est liée ou pas à l'espèce ou à d'autres paramètres (état physiologique, âge des plantes).

7.2.2 Application à la recherche de bio-indicateurs de pollution atmosphérique par le phénanthrène

Les différentes expériences d'expositions nous ont permis de tester la réponse de différents organismes aux dépôts atmosphériques. Plus précisément, nous avons testé l'utilisation potentielle des champignons mycorhiziens (Chapitre 4) et des amibes à thèques (Meyer *et al*, in preparation) en tant que bio-indicateurs de l'exposition aux dépôts atmosphériques de PHE.

7.2.2.1 Le potentiel mycorhizien

Les champignons mycorhiziens à arbuscules et vésicules (AMF) peuvent constituer de bons bio-indicateurs de la qualité biologique du sol. En effet, ils sont ubiquistes, s'associent dans le milieu naturel à la majorité des végétaux supérieurs, et ont un rôle clé dans les différents cycles d'éléments (C, N, P) et de nutriments dans les écosystèmes terrestres (Harley & Smith, 1983; Barea *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2009). Le potentiel mycorhizien a été régulièrement utilisé pour évaluer la qualité du sol après différentes perturbations, liées aux pratiques agricoles (Hamel *et al.*, 1996; Duponnois *et al.*, 2001; Ouahmane *et al.*, 2006) et aux dépôts atmosphériques d'éléments traces métalliques (Mozafar *et al.*, 2002). Toutefois, les AMF n'avaient jusqu'à présent jamais été testés pour évaluer l'impact d'une contamination atmosphérique de HAP sur la qualité d'un sol. Le protocole général de l'expérience menée dans le cadre de cette thèse a permis d'évaluer l'effet des dépôts atmosphériques de PHE sur le potentiel mycorhizien qui s'est révélé plus sensible que la plante aux dépôts atmosphériques récents et constituerait donc un indicateur précoce d'impact des contaminations atmosphériques par le PHE.

7.2.2.2 Les amibes à thèques

Les amibes à thèques sont des microorganismes retrouvées dans une grande variété d'habitats, que ce soit des milieux aquatiques, du sol, ou des bryophytes. Leur thèque est espèce-spécifique et reste identifiable même après leur mort. De plus, ce sont des organismes prédateurs qui représentent le niveau trophique le plus intégrateur de la boucle microbienne du sol. Les amibes à thèques ont déjà été utilisées en tant que bio-indicateurs de pollution atmosphérique, en l'occurrence pour le NO₂, les PM₁₀ et certains éléments traces métalliques (ETM) (Nguyen-Viet *et al.*, 2007; Nguyen-Viet *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2010a; Meyer *et al.*, 2010b). En revanche, aucune étude n'avait jamais été menée sur la sensibilité des amibes à thèques à un HAP. Des travaux seront publiés prochainement (Meyer *et al.*, in preparation) sur la sensibilité de ces microorganismes au PHE atmosphérique.

7.2.2.3 Perspective de recherche

Nos travaux ont permis de tester l'intérêt potentiel d'utiliser certains microorganismes comme bio-indicateurs de la pollution atmosphérique par les HAP. Cependant, il pourrait aussi être intéressant d'étudier en complément la réponse des communautés microbiennes (pour l'essentiel des bactéries) de la phyllosphère (surface des feuilles) qui pourraient réagir plus spécifiquement à l'exposition des plantes aux HAP atmosphériques. Des études récentes montrent par exemple l'implication des communautés de la phyllosphère dans le devenir global des HAP dans le système sol-plante

(Yutthammo *et al.*, 2010). En particulier, plusieurs espèces de bactéries seraient capables d'utiliser le PHE comme substrat de croissance et de diminuer les quantités de polluants présent à la surface des feuilles (Waight *et al.*, 2007). Elles pourraient donc constituer des candidats pertinents car spécifiques pour la bio-indication de la pollution atmosphérique par les HAP.

7.3 Effets biologiques du PHE atmosphérique sur le microsystème sol-plante-microorganismes

7.3.1 Effets sur la biomasse de la plante

Nos travaux ont montré que des effets délétères du PHE pouvaient être observés chez le trèfle dont la biomasse totale, la biomasse aérienne et la surface foliaire totale ont significativement diminué de 30% (Chapitre 5) ou de 25% (Chapitre 6) tandis que la biomasse racinaire est restée constante. La différence de sensibilité entre les espèces végétales est à mettre en relation avec leur potentiel d'accumulation respectif du PHE, lui-même lié à leurs propriétés morphologiques, biochimiques et métaboliques intrinsèques. Le devenir des HAP dans les tissus végétaux conditionne à la fois leur devenir dans la chaîne alimentaire et la probabilité d'expression d'effets biologiques sur la plante. C'est pourquoi nous avons cherché à distinguer :

- Au niveau des feuilles, la fraction de PHE adsorbée sur les cires épicuticulaires de la fraction absorbée dans la cuticule au niveau de la cutine ou dans les tissus internes.
- Au niveau des différents organes, le PHE difficilement extractible (lié aux membranes et aux parois) du PHE facilement extrait.

Après 1 mois d'exposition au PHE atmosphérique, la fraction de PHE adsorbée représentait 8 % et 27 % de la quantité totale de PHE dosée respectivement dans les feuilles de trèfle et de ray-grass. La fraction adsorbée, quelque soit son expression (% ou quantité absolue), était plus importante chez le ray-grass. La différence de proportion ad/ab-sorbée entre les 2 espèces pourrait être liée à la composition respective de leur cuticule. En effet, la cuticule du trèfle a la même composition sur les 2 faces de la feuille même si son épaisseur est plus conséquente sur la face adaxiale (Zoric *et al.*, 2009) ; en revanche, la cuticule du ray-grass présente une composition différente sur les 2 faces de la feuille, une face étant fortement hydrophobe tandis que l'autre est plus hydrophile (Ringelmann *et al.*, 2009). Par ailleurs, les mécanismes d'adsorption aux cires cuticulaires sont des mécanismes complexes qui dépendent des propriétés individuelles des polluants mais aussi des caractéristiques de la plante, il est donc possible que d'autres mécanismes puissent expliquer les différences observées.

Les effets délétères d'un polluant peuvent aussi être liés à sa mobilité dans les tissus, selon qu'il se lie aux parois, aux membranes ou à des molécules intracellulaires, ou qu'il reste en solution dans le

7. Discussion

cytoplasme ou dans la vacuole (Verjeik). La majorité du PHE d'origine atmosphérique était faiblement lié à l'intérieur des cellules des différents tissus (feuilles, tiges et racines), et ce pour les 2 espèces végétales, car les rendements de première extraction étaient supérieurs à 95%. En effet, lors de rendements d'extraction plus faibles, une attaque acide et une seconde extraction ASE (accelerated solvent extraction) permettent de distinguer 2 formes biochimiques de PHE dans les tissus des végétaux : une forme liée aux parois et une forme libre dans les tissus. Cette technique est décrite en détail pour le transfert du PHE dans le trèfle et le ray-grass à partir d'un sol pollué à $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Chiapusio *et al.*, 2011). Ce résultat implique que le PHE serait mobile et pourrait avoir des effets néfastes dans les cellules végétales.

7.3.2 Effet sur les symbiotes

Les microorganismes symbiotiques ont un rôle essentiel dans la nutrition de la plante. Leur rôle est d'autant plus important lorsque la plante est soumise à un stress (cas du trèfle), car ils peuvent lui permettre de résister ou au contraire amplifier son impact en détournant trop de photosynthétats (en devenant trop coûteux en énergie).

7.3.2.1 Rhizobium

Les nodules formés entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les racines de trèfle ont été dénombrés et classés comme « actif » et « inactif » au moment du dépotage (Chapitre 5). Alors que le nombre total de nodules a augmenté dans les plantes polluées, une diminution du pourcentage de nodules actifs a été observée dans les racines de surface. Ce phénomène est le résultat soit d'une toxicité directe du PHE dans le sol de surface qui affecte les bactéries *Rhizobium* ou la symbiose, soit d'une toxicité indirecte *via* le stress de la plante qui en conséquence diminue ses apports de C vers les symbiotes. Concernant la toxicité directe, Johnson *et al.* (2004) n'ont pas détecté d'effet négatif du chrysène sur des populations de *Rhizobium* tandis que Chiapusio *et al.* (2007) ont montré une stimulation des populations de *Rhizobium* dans le cas d'une forte pollution de sol en PHE. Le contrôle du nombre de nodules actifs pourrait donc constituer une stratégie de la plante pour limiter ses dépenses énergétiques au détriment de l'aide que lui apporte le symbiote pour améliorer sa nutrition azotée. En général, dans le cas de la symbiose tripartite plante-mycorhizes-*Rhizobium*, la mycorhize est le symbiote privilégié parce qu'il a la capacité de prélever le phosphore (P) (Mortimer *et al.*, 2008). Or, P est l'élément le moins biodisponible dans les sols pour les plantes. En cas de stress, les nodules deviennent trop coûteux en carbone (C) et n'apportent plus suffisamment de bénéfices aux deux autres partenaires de la symbiose.

7. Discussion

Nous avons émis l'hypothèse que cette diminution du pourcentage de nodules actifs en surface pouvait avoir des conséquences sur la nutrition azotée chez le trèfle. Or, l'étude du chapitre 6 a effectivement mis en évidence une diminution de la concentration en azote (N) dans les racines des trèfles. L'augmentation du C/N dans les racines, bien que significatif, reste toutefois assez faible, et surtout n'a eu aucun impact sur les taux de protéines dans les racines, les tiges ou les feuilles. Des expériences devront futures pourront permettre de déterminer si l'augmentation du C/N dans les racines a effectivement eu un impact sur le métabolisme azoté du trèfle.

7.3.2.2 Mycorhizes

L'effet de la pollution atmosphérique par le de PHE a été étudié sur la symbiose mycorhizienne (Chapitre 5) et sur le potentiel mycorhizien d'un sol (Chapitre 4). Les résultats obtenus montrent que :

- Il n'existe aucun impact significatif de l'exposition au PHE atmosphérique sur la mycorhization du trèfle violet. Cela implique que cette plante, conserve ses symbioses mycorhiziennes même lorsqu'elle est stressé et alors même que comme en témoigne sa biomasse aérienne diminue.
- L'exposition de sols nus aux dépôts atmosphériques de PHE a mis en évidence un impact significatif des dépôts atmosphériques de PHE sur le potentiel mycorhizien du sol. L'analyse de facteurs multiples souligne que le potentiel mycorhizien dépend des mêmes facteurs qui modulent la contamination du sol, c'est-à-dire de la profondeur de sol considérée, du type de sol et des concentrations atmosphériques.

Les différences observées entre ces deux expériences sur la mycorhization du trèfle et sur le potentiel infectieux du sol s'expliquent déjà par les concentrations différentes en PHE entre les deux sols utilisés. Ainsi, les dépôts atmosphériques de PHE sur un sol nu entraînent une diminution du potentiel mycorhizien du sol, vraisemblablement par une action directe du polluant sur les propagules comme cela a été observé en boîte de pétri en réponse au BaP ou à l'anthracène (Verdin *et al.*, 2006; Debiane *et al.*, 2008). En revanche, une contamination du sol 10 fois plus faible (à cause de la présence d'un couvert végétal) n'a pas eu d'impact sur les symbioses mycorhiziennes. Enfin, la divergence entre ces deux résultats peut aussi être due à une plus forte sensibilité du champignon mycorhizien libre par rapport à celle de la symbiose.

Il semble donc que les sols nus soient donc plus vulnérables à des incidents de pollution atmosphériques, non seulement car la contamination est plus importante mais aussi parce qu'elle est suffisante pour diminuer le potentiel mycorhizien.

7.3.3 Comparaison entre la voie d'exposition foliaire et racinaire

Le devenir et les effets du PHE sur le système sol-plante-microorganismes avaient déjà été étudiés chez le trèfle et le ray-grass à partir du sol de Maconcourt pollué à $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Chiapusio *et al.*, 2007). Nous avons donc voulu confronter nos résultats obtenus par voie atmosphérique avec ceux obtenus en cas de pollution forte du sol.

Le PHE d'origine atmosphérique affecte en premier lieu la plante puis les microorganismes du sol, contrairement à ce qui a été observé dans le cas de la pollution du sol par le PHE où les symbioses racinaires sont plus affectées que la plante (Chiapusio *et al.*, 2007) (Fig. 7-3). Ces divergences sont probablement liées à la fois à la forme biochimique sous laquelle le PHE est retrouvé dans les tissus et à sa concentration. Dans le cas d'un prélèvement racinaire du PHE depuis le sol, le PHE a été retrouvé en forte concentration et sous une forme libre et dans les cellules des racines, ce qui a pu inhiber la mycorhization. Dans les feuilles, le PHE était présent en faible concentration ($1 \mu\text{g g}^{-1}$ MS) et sous 2 formes biochimiques : une forme liée aux parois (40 % de la quantité totale de PHE), et une forme libre dans les cellules (60 % de la quantité totale de PHE) (Chiapusio *et al.*, 2011). La faible translocation du PHE des racines vers les feuilles ainsi que sa liaison aux parois pourrait expliquer que le PHE originaire du sol n'ait eu aucun impact biologique sur la plante.

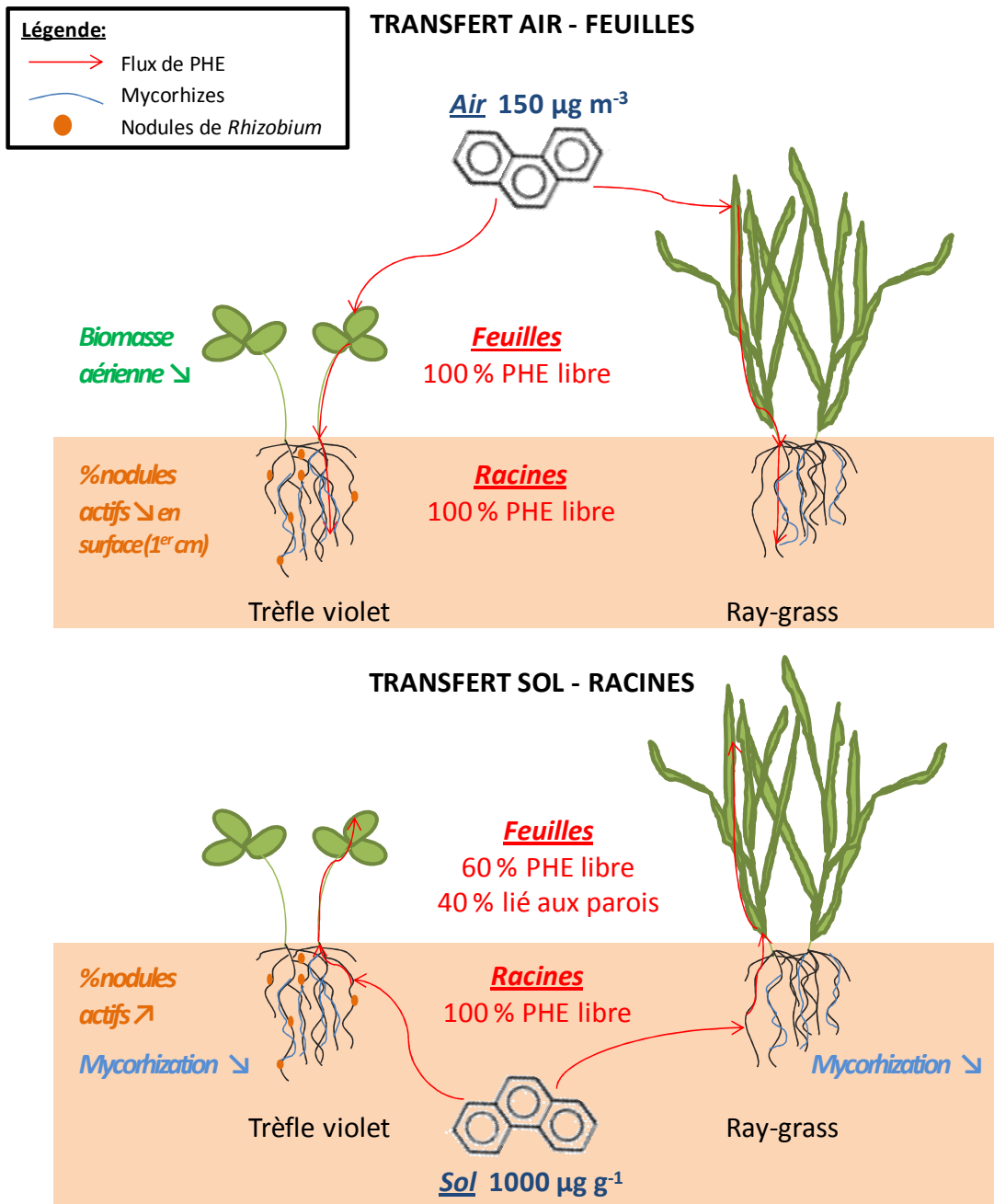


Figure 7-3 : Comparaison du devenir et des effets des HAP à partir du sol ou de l'air sur les systèmes sol-plante-microorganismes étudiés

7.4 Effet de la pollution atmosphérique par le PHE sur les paramètres écophysologiques de la plante

Les paramètres de croissance et l'allocation carbonée ont été étudiés dans le système sol-plante-microorganismes constitué du trèfle ayant été choisi car il avait subi une diminution significative de sa biomasse aérienne lors de nos précédentes expérimentations.

7.4.1 Effets sur la croissance

La diminution de la biomasse totale est liée à la diminution de l'assimilation nette du carbone (NAR). Cette assimilation nette représente le bilan entre l'assimilation de CO₂ et les pertes de C par la plante (Tableau 7-1). Une diminution de NAR implique donc soit une diminution d'assimilation de CO₂ par les feuilles, soit une augmentation des pertes de carbone. Or, ni l'assimilation ni la respiration n'ont été affectés par la pollution atmosphérique par le PHE. La diminution du NAR serait donc plutôt liée à une augmentation des pertes de C suite à l'augmentation soit de la respiration, de l'exsudation racinaire, de l'exportation vers les symbiotes racinaires, ou de l'induction de réactions de défense ou de mécanismes de réparation.

De plus, l'augmentation du coefficient allométrique racines/parties aériennes a mis en évidence l'altération de l'allocation de biomasse dans les trèfles en réponse à l'exposition au PHE atmosphérique.

Tableau 7-1 : Bilan de carbone dans la plante

Assimilation
Photosynthèse
Pertes
Respiration
Exsudation racinaire
Exportation vers les symbiotes racinaires
réactions de défense
mécanismes de réparation

7.4.2 Effets sur l'allocation du carbone dans le système sol plante microorganismes

L'allocation de carbone a été suivie dans le système grâce au marquage par du ¹³C-CO₂. Ce marquage a permis de mettre en évidence dans cette étude une différence au niveau du bilan de récupération du carbone qui est significativement plus faible chez les trèfles pollués. Cela suggère l'émergence d'un puits de C que nous n'avons pas pris en compte dans notre bilan carboné et qui pourrait être attribué à l'émission de BVOCs. En effet, des études récentes en boîtes de Pétri ou en tubes à essai ont montré l'implication de telles émissions dans la réponse au stress induit par les HAP par voie racinaire (Kummerova *et al.*, 2010; Weisman *et al.*, 2010).

7. Discussion

Les résultats obtenus pour l'allocation carbonée semblent aller à l'inverse des effets observés sur la biomasse (Fig. 7-4). En réalité, les 2 manières d'exprimer les résultats sont complémentaires :

- La dynamique renseigne sur le transfert du carbone effectivement absorbé par rapport au ^{13}C total mesuré dans le système à T0. Elle ne prend en compte ni la biomasse de chaque compartiment, ni les pertes potentielles en C du système.
- L'allocation renseigne sur la répartition du C restant dans le système. Cette mesure s'affranchit donc des pertes potentielles en C du système.

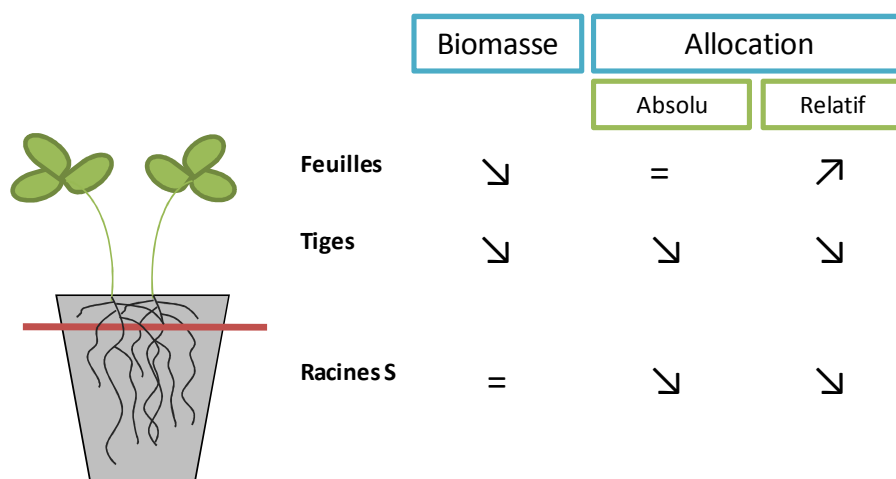


Figure 7-4 : bilan biomasse et allocation du C

La diminution de l'allocation de C dans les racines implique probablement une diminution de l'exsudation et / ou de l'export vers les symbiontes puisque ni la croissance ni la respiration n'ont été affectés. Cette diminution d'allocation dans les racines est à mettre en relation avec les observations faites sur les symbiontes et les microorganismes libres du sol. En effet, une diminution de l'exsudation racinaire pourrait avoir limité la nutrition carbonée des microorganismes du sol, ce qui expliquerait la diminution drastique de la biomasse microbienne du sol. La biomasse microbienne du sol, mesurée en considérant le carbone labile après fumigation au chloroforme, a été significativement affectée (-30%) dans les deux compartiments du sol. Elle pourrait avoir été affectée de manière précoce (comme les AMF) par la diffusion du polluant en profondeur. Cependant, les quantités de polluants mises en jeu ici sont largement inférieures à celles quantifiées dans le cas du potentiel mycorhizien du sol (facteur 10 : sol nu /sol végétalisé). Dans le cas présent, la plante pourrait aussi être impliquée dans la diminution de la biomasse microbienne en raison de la diminution de son exsudation qui nourrit les microorganismes de la rhizosphère. Cette dernière hypothèse est en outre confortée par la diminution du carbone microbien dans les deux compartiments du sol (*top/deep*)

7. Discussion

L'augmentation de l'allocation de C dans les feuilles pourrait être liée à l'induction des métabolismes de réparation cellulaire et/ou de défense, ce qui expliquerait par ailleurs la diminution du NAR. Ainsi, au cours d'investigations futures, il pourrait être intéressant d'identifier les dommages cellulaires subits au niveau des feuilles. Nous avons d'ores et déjà observé une diminution des teneurs en chlorophylles a et b dans les feuilles qui pourrait avoir affecté l'interception de la lumière par les antennes collectrices. Toutefois, le processus photosynthétique ne semble pas fondamentalement perturbé et ne seraient donc pas la première cible des effets des HAP atmosphériques. En effet, le taux de fixation du CO₂ n'a pas été affecté, ce qui suggère que l'incorporation du CO₂ par la RuBisCO n'a pas été perturbée. Des mesures de fluorimétrie PAM (pulse amplitude modulation) effectuées sur les 2 espèces végétales ont montré que ni la fluorescence initiale (F₀), ni l'efficacité photosynthétique du photosystème II (F_V/F_{MAX}) n'avaient été affecté par l'exposition au PHE atmosphérique, suggérant que la phase photochimique de la photosynthèse reste fonctionnelle et que la conversion de l'énergie lumineuse en pouvoir réducteur et en ATP était assurée. Les dommages cellulaires induits par les HAP atmosphériques pourraient être en rapport avec l'induction d'un stress oxydatif dans les cellules. L'induction d'un stress oxydatif pourrait avoir endommagé les structures membranaires, notamment par la peroxydation des lipides membranaires. L'altération des membranes chloroplastiques pourrait en outre être à l'origine de la diminution des teneurs en chlorophylles. Cette piste sera étudiée lors de futures expériences afin de déterminer l'existence de dommages au niveau des membranes.

8 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La mise en évidence de l'absorption et de la migration des HAP atmosphériques dans les plantes et le sol est une étape nécessaire pour comprendre leur devenir et leurs effets biologiques dans et sur les écosystèmes terrestres.

Les différentes expériences réalisées au cours de cette thèse ont démontré que, dans le trèfle comme dans le ray-grass, le PHE d'origine atmosphérique se dépose sur les feuilles et pénètre dans les tissus internes où il s'accumule préférentiellement.

Le PHE prélevé par les feuilles semble alors capable de migrer vers les racines comme en témoigne l'augmentation des concentrations racinaires de PHE dans les différentes plantes testées. Ces résultats suggèrent fortement l'existence d'un transfert phloémien. Une confirmation par des expériences utilisant des molécules marquées serait nécessaire pour valider l'existence de ce transfert.

Dans les deux espèces végétales étudiées, le PHE d'origine atmosphérique retrouvé dans les tissus des feuilles, des tiges, et des racines serait majoritairement présent sous une forme biochimique libre dans les cellules. L'expression des effets délétères des polluants chez les végétaux est liée à leur capacité à modifier la mobilité du polluant en fonction de sa forme biochimique. L'exposition au PHE atmosphérique a considérablement diminué la production de biomasse aérienne chez le trèfle (- 20%) mais n'a pas affecté le ray-grass. Il existe une large variabilité de mécanismes de tolérance et de défense en réponse aux polluants organiques parmi les différentes espèces végétales. Nos résultats suggèrent une distinction entre les Angiospermes monocotylédones et dicotylédones concernant le devenir et les effets des HAP atmosphériques mais des expériences complémentaires avec d'autres espèces végétales devraient être entreprises pour pouvoir confirmer cette tendance.

Cette diminution de biomasse est tout d'abord liée à une diminution de l'assimilation nette du carbone, mais aussi à des modifications d'allocation de biomasse et du carbone. L'expérience de marquage au ^{13}C -CO₂ a mis en évidence une rétention du carbone dans les feuilles et une diminution de l'exportation vers les racines. L'hypothèse retenue pour expliquer ce phénomène serait l'induction du métabolisme de réparation ou de défense dans les feuilles. Les recherches futures devront déterminer si la plante investit effectivement dans le métabolisme de réparation cellulaire et/ou de défense.

Dans un premier temps, il faudrait déterminer les processus impliqués dans l'apparition des dommages cellulaires dans les feuilles. Pour commencer, différents marqueurs de stress pourraient

8. Conclusions et perspectives

être mesurés comme par exemple la proline qui est un marqueur de stress relativement générique ou le malonedialdéhyde (MDA) qui est spécifiquement exprimé lors de dommages membranaires car c'est un produit de l'oxydation des lipides. L'induction d'un stress oxydatif dans les cellules pourrait en effet être responsable des phénomènes observés dans les feuilles *via* l'altération des membranes cellulaires.

Dans un deuxième temps, la plante réagirait aux perturbations subies en induisant des mécanismes de défense. Ceux-ci impliqueraient la promotion du métabolisme secondaire et la formation de molécules anti-oxydantes de la famille des polyphénols. Les expériences futures s'appliqueront à déterminer l'effet des HAP atmosphérique sur les teneurs en polyphénols dans les feuilles.

Le transfert du phénanthrène atmosphérique dans le sol et les plantes a eu un impact biologique important sur la qualité des sols et sur la physiologie du végétal. Cette altération des processus de fertilité du sol et de la croissance chez la plante dépend de l'espèce végétale. Chez le trèfle violet, la modification de l'allocation carbonée a eu un impact sur la croissance et la fonctionnalité des symbiontes et des microorganismes du sol, ce qui signifie que la pollution atmosphérique par les HAP pourrait altérer le fonctionnement d'une prairie mais également d'autres écosystèmes.

Enfin, le transfert de tels contaminants dans la chaîne alimentaire pose un problème sanitaire et/ou environnemental. Chez les deux espèces végétales étudiées, le PHE a été transféré ce qui soulève le problème du transfert et de la bioaccumulation potentielle de telles molécules dans les écosystèmes terrestres.

Le transfert des HAP peut avoir lieu directement dans la chaîne alimentaire par ingestion des végétaux contaminés par les animaux et transfert dans les produits animaux. Par exemple chez les ruminants laitiers, les HAP sont stockés dans les graisses, le foie et les reins, métabolisés, et/ou excrétés sous forme hydroxylée, plus hydrophile donc plus mobile et donc plus toxique, dans les urines mais aussi dans le lait. Dans ce cas, le consommateur est exposé aux risques *via* l'ingestion de viande ou de lait. Le transfert des HAP peut également se faire indirectement *via* la contamination du sol par exemple par la pratique du compostage, de plus en plus répandue. L'utilisation du compost pour amender les sols soulève la question du transfert des HAP dans le cas du compostage de végétaux particulièrement soumis aux dépôts atmosphériques de HAP. La prise en compte des mécanismes de transfert de telles molécules dans les différents compartiments des écosystèmes en relation avec les pratiques humaines reste une étape essentielle dans l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux associés à ces polluants.

9 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Articles scientifiques

A

- Achazi RK, Van Gestel CAM 2003.** Uptake and Accumulation of PAHs by Terrestrial Invertebrates. In: P. E. T. Douben ed. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective* Chichester, England.
- Adrian RJ. 1991.** Particle-Imaging Techniques for Experimental Fluid-Mechanics. *Annual Review of Fluid Mechanics* **23**: 261-304.
- Aina R, Palin L, Citterio S. 2006.** Molecular Evidence for Benzo[a]Pyrene and Naphthalene Genotoxicity in *Trifolium Repens* L. *Chemosphere* **65**(4): 666-673.
- Akcha F, Burgeot T, Narbonne F, Garrigues P 2003.** Metabolic Activation of Pahs: Role of DNA Adduct Formation in Induced Carcinogenesis. In: P. E. T. Douben ed. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective* Chichester, England.
- Alcayde G, Beraud JF, Costes JM, Gatellier C 2000.** Mécanismes et Phénomènes de Transport et d'évolution des Hydrocarbures et des Solvants Chlorés dans le milieu Souterrain. In: F. Colin ed. *Rapports De L'académie Des Sciences N°44 : Pollution Localisée des Sols et des Sous-Sols par les Hydrocarbures et par les Solvants Chlorés.* Paris, 81-117.
- Alexander M. 2000.** Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. *Environmental Science & Technology* **34**(20): 4259-4265.
- Amellal S, Boivin A, Ganier CP, Schiavon M. 2006a.** Effect of Ageing on Mobility and Sequestration of Phenanthrene in an Agricultural Soil. *Agronomy for Sustainable Development* **26**(4): 269-275.
- Amellal S, Boivin A, Ganier CP, Schiavon M. 2006b.** High Sorption of Phenanthrene in Agricultural Soils. *Agronomy for Sustainable Development* **26**(2): 99-106.
- Andreoni V, Gianfreda L. 2007.** Bioremediation and Monitoring of Aromatic-Polluted Habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**(2): 287-308.
- Arey J, Atkinson R 2003.** Photochemical Reactions in the Atmosphere. In: P. E. T. Douben ed. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective* Chichester, England.
- Arnon D. 1949.** Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts: Polyphenoloxylase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiology* **24**: 1-15.
- Atkinson R, Arey J 1994.** Atmospheric Chemistry of Gas-Phase Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons - Formation of Atmospheric Mutagens In. *Symposium on Risk Assessment of Urban Air: Emissions, Exposure, Risk Identification and Risk Quantitation.* Stockholm, Sweden. 117-126.

B

- Bakker MI, Casado B, Koerselman JW, Tolls J, Kolloffel C. 2000.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil and Plant Samples from the Vicinity of an Oil Refinery. *Science of the Total Environment* **263**(1-3): 91-100.
- Bakker MI, Vorenhout M, Sijm D, Kolloffel C. 1999.** Dry Deposition of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Three Plantago Species. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(10): 2289-2294.

- Barber JL, Thomas GO, Kerstiens G, Jones KC. 2004.** Current Issues and Uncertainties in the Measurement and Modelling of Air-Vegetation Exchange and within-Plant Processing of Pops. *Environmental Pollution* **128**(1-2): 99-138.
- Barea JM, Azcon R, Azcon-Aguilar C. 2002.** Mycorrhizosphere Interactions to Improve Plant Fitness and Soil Quality. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**(1-4): 343-351.
- Bastida F, Zsolnay A, Hernandez T, Garcia C. 2008.** Past, Present and Future of Soil Quality Indices: A Biological Perspective. *Geoderma* **147**(3-4): 159-171.
- Begerow J, Jermann E, Keles T, Ranft U, Dunemann L. 1995.** Passive Sampling for Volatile Organic Compounds (VOCs) in Air at Environmentally Relevant Concentration Levels. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **351**(6): 549-554.
- Belitsky GA, Yakubovskaya MG. 2008.** Genetic Polymorphism and Variability of Chemical Carcinogenesis. *Biochemistry-Moscow* **73**(5): 543-554.
- Bernard NL, Gerber MJ, Astre CM, Saintot MJ. 1999.** Ozone Measurement with Passive Samplers: Validation and Use for Ozone Pollution Assessment in Montpellier, France. *Environmental Science & Technology* **33**(2): 217-222.
- Binet P, Portal JM, Leyval C. 2000.** Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pah) in the Rhizosphere and Mycorrhizosphere of Ryegrass. *Plant and Soil* **227**(1-2): 207-213.
- Binet P, Portal JM, Leyval C. 2001.** Application of Gc-Ms to the Study of Anthracene Disappearance in the Rhizosphere of Ryegrass. *Organic Geochemistry* **32**(2): 217-222.
- Bjorseth A. 1979.** *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Third International Symposium on Chemistry and Biology-Carcinogenesis and Mutagenesis*. Batelle Memorial Institute Columbus Laboratories: Ann Arbor Sciences.
- Bonjoch NP, Tamayo PR 2001.** Protein Content Quantification by Bradford Method. In: M. J. Reigosa Roger ed. *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*: Kluwer Academic Publishers, 283-295.
- Bourdeau B. 1998.** *Évolution du Parc Automobile Français entre 1970 et 2020*. PhD thesis. Université De Savoie Chambéry.
- Bradford MM. 1976.** Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2): 248-254.
- Brandt HCA, Watson WP. 2003.** Monitoring Human Occupational and Environmental Exposures to Polycyclic Aromatic Compounds. *Annals of Occupational Hygiene* **47**(5): 349-378.
- Breivik K, Vestreng V, Rozovskaya O, Pacyna JM. 2006.** Atmospheric Emissions of Some Pops in Europe: A Discussion of Existing Inventories and Data Needs. *Environmental Science & Policy* **9**(7-8): 663-674.
- Breure AM, Mulder C, Rombke J, Ruf A. 2005.** Ecological Classification and Assessment Concepts in Soil Protection. *Ecotoxicology and environmental safety* **62**(2): 211-229.
- Burritt DJ. 2008.** The Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Phenanthrene Causes Oxidative Stress and Alters Polyamine Metabolism in the Aquatic Liverwort *Riccia Fluitans* L. *Plant, Cell & Environment* **31**(10): 1416-1431.

C

- Cabello MN. 1997.** Hydrocarbon Pollution: Its Effect on Native Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Amf). *FEMS Microbiology Ecology* **22**(3): 233-236.
- Chiapusio G, Desalme D, Pujol S, Trang Bui Q, Bernard N, Toussaint ML, Binet P. 2011.** Two Biochemical Forms of Phenanthrene Recovered in Grassland

- Plants (*Lolium Perenne* L. And *Trifolium Pratense* L.) Grown in 3 Spiked Soils. *Plant and Soil*.
- Chiapusio G, Pujol S, Toussaint ML, Badot PM, 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**(1-2): 103-112.
- Child R, Miller CD, Liang Y, Narasimham G, Chatterton J, Harrison P, Sims RC, Britt D, Anderson AJ. 2007.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Mycobacterium Isolates: Their Association with Plant Roots. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**(3): 655-663.
- Chung N, Alexander M. 2002.** Effect of Soil Properties on Bioavailability and Extractability of Phenanthrene and Atrazine Sequestered in Soil. *Chemosphere* **48**(1): 109-115.
- CITEPA 2010.** Emissions Dans L'air En France Métropolitaine: Polluants Organiques Persistants. In. *Rapport d'inventaire national : inventaire des émissions de polluants atmosphériques en France - séries sectorielles et analyses étendues*. Paris: Centre Interprofessionnel d'Etudes de la Pollution Atmosphérique.
- Clausen PA, Liu Z, Xu Y, Kofoed-Sorensen V, Little JC. 2010.** Influence of Air Flow Rate on Emission of Dehp from Vinyl Flooring in the Emission Cell Flec: Measurements and Cfd Simulation. *Atmospheric Environment* **44**(23): 2760-2766.
- Cocco P, Moore PS, Ennas MG, Tocco MG, Ibba A, Mattuzzi S, Meloni M, Monne M, Piras G, Collu S, Satta G, Zucca M, Scarpa A, Flore C. 2007.** Effect of Urban Traffic, Individual Habits, and Genetic Polymorphisms on Background Urinary 1-Hydroxypyrene Excretion. *Annals of Epidemiology* **17**(1): 1-8.
- Collins C, Fryer M, Grosso A. 2005.** Plant Uptake of Non-Ionic Organic Chemicals. *Environmental Science & Technology* **40**(1): 45-52.
- Collins CD, Finnegan E. 2010.** Modeling the Plant Uptake of Organic Chemicals, Including the Soil Air Plant Pathway. *Environmental Science & Technology* **44**(3): 998-1003.
- Corgie SC, Joner EJ, Leyval C. 2003.** Rhizospheric Degradation of Phenanthrene Is a Function of Proximity to Roots. *Plant and Soil* **257**(1): 143-150.
- Crepineau C, Rychen G, Feidt C, Le Roux Y, Lichtfouse E, Laurent F. 2003.** Contamination of Pastures by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Vicinity of a Highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(16): 4841-4845.

D

- Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Grandmougin-Ferjani A, Shirali P, Sahraoui ALH. 2008.** In Vitro Evaluation of the Oxidative Stress and Genotoxic Potentials of Anthracene on Mycorrhizal Chicory Roots. *Environmental and Experimental Botany* **64**(2): 120-127.
- Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2009.** Mycorrhization Alleviates Benzo[a]Pyrene-Induced Oxidative Stress in an in Vitro Chicory Root Model. *Phytochemistry* **70**(11-12): 1421-1427.
- Desalme D, Binet P, Bernard N, Gilbert D, Toussaint M-L, Chiapusio G. 2011.** Atmospheric Phenanthrene Transfer and Effects on Two Grassland Species and Their Root Symbionts: A Microcosm Study. *Environmental and Experimental Botany* **71**(2): 146-151.
- Duponnois R, Plenchette C, Thioulouse J, Cadet P. 2001.** The Mycorrhizal Soil Infectivity and Arbuscular Mycorrhizal Fungal Spore Communities in Soils of Different Aged Fallows in Senegal. *Applied Soil Ecology* **17**(3): 239-251.

Dusserre G, Cabridenc R, Le Cloirec P 1998. Ecotoxicologie Des Cov. In: P. Le Cloirec ed. *Les Composés Organiques Volatils (COV) Dans L'environnement* Lavoisier tec et doc.

E

Edwards NT. 1983. Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons (PAHs) in the Terrestrial Environment - a Review. *Journal of Environmental Quality* **12**(4): 427-441.

EPAQS 1999. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In F. R. A. Department for Environment. *Expert Panel On Air Quality Standards*. London: The Stationnery Office.

Escofier B, Pages J. 1994. Multiple Factor-Analysis (Afmult Package) *Computational Statistics & Data Analysis* **18**(1): 121-140.

F

Fan S, Li P, Gong Z, Ren W, He N. 2008. Promotion of Pyrene Degradation in Rhizosphere of Alfalfa (*Medicago Sativa* L.). *Chemosphere* **71**(8): 1593-1598.

Farrar JF, Jones DL. 2000. The Control of Carbon Acquisition by Roots. *New Phytologist* **147**(1): 43-53.

Fluent I 2009. Fluent V12 User's Guide.

Fortin JA, Plenchette C, Piché Y. 2008. *Mycorrhizas the New Green Revolution* Québec.

G

Gao Y, Collins CD. 2009. Uptake Pathways of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in White Clover. *Environmental Science & Technology* **43**(16): 6190-6195.

Gao Y, Zhu L. 2004. Plant Uptake, Accumulation and Translocation of Phenanthrene and Pyrene in Soils. *Chemosphere* **55**(9): 1169-1178.

Gao YZ, Cheng ZX, Ling WT, Huang J. 2010. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Hyphae Contribute to the Uptake of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Plant Roots. *Bioresource Technology* **101**(18): 6895-6901.

Gao YZ, Ling WT 2006. Comparison for Plant Uptake of Phenanthrene and Pyrene from Soil and Water. In. *4th International Symposium on Interactions of Soil Minerals with Organic Components and Microorganisms*. Wuhan, Peoples R China. 387-394.

Gioia R, Steinnes E, Thomas GO, Mejier SN, Jones KC. 2006. Persistent Organic Pollutants in European Background Air: Derivation of Temporal and Latitudinal Trends. *Journal of Environmental Monitoring* **8**(7): 700-710.

Gorecki T, Namiesnik J. 2002. Passive Sampling. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **21**(4): 276-291.

Grantz DA. 2003. Ozone Impacts on Cotton: Towards an Integrated Mechanism. *Environmental Pollution* **126**(3): 331-344.

Greenberg BM 2003. PAH Interactions with Plants: Uptake, Toxicity and Phytoremediation. In: P. E. T. Douben ed. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective* Chichester, England.

H

- Hafner WD, Carlson DL, Hites RA. 2005.** Influence of Local Human Population on Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Concentrations. *Environmental Science & Technology* **39**(19): 7374-7379.
- Hamel C, Dalpe Y, Lapierre C, Simard RR, Smith DL. 1996.** Endomycorrhizae in a Newly Cultivated Acidic Meadow: Effects of Three Years of Barley Cropping, Tillage, Lime, and Phosphorus on Root Colonization and Soil Infectivity. *Biology and Fertility of Soils* **21**(3): 160-165.
- Harley JL, Smith SE. 1983.** *Mycorrhizal Symbiosis*. New York: Academic press.
- Hatzinger PB, Alexander M. 1995.** Effect of Aging of Chemicals in Soil on Their Biodegradability and Extractability. *Environmental Science & Technology* **29**(2): 537-545.
- Howsam M, Jones KC, Ineson P. 2000.** PAHs Associated with the Leaves of Three Deciduous Tree Species. I - Concentrations and Profiles. *Environmental Pollution* **108**(3): 413-424.
- Huang XD, Zeiler LF, Dixon DG, Greenberg BM. 1996.** Photoinduced Toxicity of Pahas to the Foliar Regions of *Brassica Napus* (Canola) and *Cucumis Sativus* (Cucumber) in Simulated Solar Radiation. *Ecotoxicology and environmental safety* **35**(2): 190-197.
- Hunt R, Causton DR, Shipley B, Askew AP. 2002.** A Modern Tool for Classical Plant Growth Analysis. *Annals of Botany* **90**(4): 485-488.

I

- IARC. 1983.** Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data. In: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. **vol. 32, International Agency for Research on Cancer, Lyon.**
- INERIS 2002.** Données Technico-Économiques Sur Les Substances Chimiques En France: Les HAP. In J.-M. BrignonS. Soleille. *INERIS DRC/AIRE- ELe n°804*. Paris: INERIS. 45p.

J

- Jansa J, Oberholzer HR, Egli S. 2009.** Environmental Determinants of the Arbuscular Mycorrhizal Fungal Infectivity of Swiss Agricultural Soils. *European Journal of Soil Biology* **45**(5-6): 400-408.
- Jiao XC, Xu FL, Dawson R, Chen SH, Tao S. 2007.** Adsorption and Absorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Rice Roots. *Environmental Pollution* **148**(1): 230-235.
- Johnson DL, Maguire KL, Anderson DR, McGrath SP. 2004.** Enhanced Dissipation of Chrysene in Planted Soil: The Impact of a Rhizobial Inoculum. *Soil biology and biochemistry* **36**(1): 33-38.
- Joner EJ, Hirmann D, Szolar OHJ, Todorovic D, Leyval C, Loibner AP. 2004.** Priming Effects on PAH Degradation and Ecotoxicity During a Phytoremediation Experiment. *Environmental Pollution* **128**(3): 429-435.
- Joner EJ, Leyval C. 2003a.** Phytoremediation of Organic Pollutants Using Mycorrhizal Plants: A New Aspect of Rhizosphere Interactions. *Agronomie* **23**(5-6): 495-502.

Joner EJ, Leyval C. 2003b. Rhizosphere Gradients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Dissipation in Two Industrial Soils and the Impact of Arbuscular Mycorrhiza. *Environmental Science & Technology* **37**(11): 2371-2375.

K

Katsuhara M, Koshio K, Shibasaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K. 2003. Over-Expression of a Barley Aquaporin Increased the Shoot/Root Ratio and Raised Salt Sensitivity in Transgenic Rice Plants. *Plant and Cell Physiology* **44**(12): 1378-1383.

Kaupp H, Blumenstock M, McLachlan MS. 2000. Retention and Mobility of Atmospheric Particle-Associated Organic Pollutant PCDD/Fs and PAHs in Maize Leaves. *New Phytologist* **148**(3): 473-480.

Keeling CD. 1958. The Concentration and Isotopic Abundances of Atmospheric Carbon Dioxide in Rural Areas. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **13**(4): 322-334.

Kipopoulou AM, Manoli E, Samara C, Smith KEC, Thomas GO, Jones KC, Simonich SL, Hites RA. 1999. Bioconcentration of PAHs in Vegetables Grown in an Industrial Area. *Environmental Pollution* **106**: 369-380.

Kobayashi R, Cahill TM, Okamoto RA, Maddalena RL, Kado NY. 2007. Controlled Exposure Chamber Study of Uptake and Clearance of Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Wheat Grain. *Environmental Science & Technology* **41**(22): 7934-7940.

Koske RE, Gemma JN. 1989. A Modified Procedure for Staining Roots to Detect Vamycorrhizas *Mycological Research* **92**: 486-505.

Krupa SV, Legge AH. 2000. Passive Sampling of Ambient, Gaseous Air Pollutants: An Assessment from an Ecological Perspective. *Environmental Pollution* **107**(1): 31-45.

Kummerova M, Bartak M, Dubova J, Triska J, Zubrova E, Zezulka S. 2006a. Inhibitory Effect of Fluoranthene on Photosynthetic Processes in Lichens Detected by Chlorophyll Fluorescence. *Ecotoxicology* **15**(2): 121-131.

Kummerova M, Krulova J, Zezulka S, Triska J. 2006b. Evaluation of Fluoranthene Phytotoxicity in Pea Plants by Hill Reaction and Chlorophyll Fluorescence. *Chemosphere* **65**(3): 489-496.

Kummerova M, Vanova L, Fiserova H, Klems M, Zezulka S, Krulova J. 2010. Understanding the Effect of Organic Pollutant Fluoranthene on Pea in Vitro Using Cytokinins, Ethylene, Ethane and Carbon Dioxide as Indicators. *Plant Growth Regulation* **61**(2): 161-174.

Kummerova M, Vanova L, Krulova J, Zezulka S. 2008. The Use of Physiological Characteristics for Comparison of Organic Compounds Phytotoxicity. *Chemosphere* **71**(11): 2050-2059.

L

Lee E, Feigley CE, Khan J. 2002. An Investigation of Air Inlet Velocity in Simulating the Dispersion of Indoor Contaminants Via Computational Fluid Dynamics. *Annals of Occupational Hygiene* **46**(8): 701-712.

Lehndorff E, Schwark L. 2004. Biomonitoring of Air Quality in the Cologne Conurbation Using Pine Needles as a Passive Sampler--Part II: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pah). *Atmospheric Environment* **38**(23): 3793-3808.

- Lehndorff E, Schwark L. 2009a.** Biomonitoring Airborne Parent and Alkylated Three-Ring PAHs in the Greater Cologne Conurbation I: Temporal Accumulation Patterns. *Environmental Pollution* **157**(4): 1323-1331.
- Lehndorff E, Schwark L. 2009b.** Biomonitoring Airborne Parent and Alkylated Three-Ring PAHs in the Greater Cologne Conurbation II: Regional Distribution Patterns. *Environmental Pollution* **157**(5): 1706-1713.
- Leyval C, Binet P. 1998.** Effect of Polyaromatic Hydrocarbons in Soil on Arbuscular Mycorrhizal Plants. *Journal of Environmental Quality* **27**(2): 402-407.
- Leyval C, Joner EJ, del Val C, Haselwandter K 2002.** Potential of Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Bioremediation. In: S. Gianinazzi, H. Schüepp, J. M. Barea, K. Haselwandter eds. *Mycorrhizal Technologies in Agriculture: From Genes to Bioproducts*. Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser, 175-186.
- Leyval C, Singh BR, Joner EJ. 1995.** Occurrence and Infectivity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Some Norwegian Soils Influenced by Heavy Metals and Soil Properties. *Water, Air, and Soil Pollution* **84**(3-4): 203-216.
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K. 1997.** Effect of Heavy Metal Pollution on Mycorrhizal Colonization and Function: Physiological, Ecological and Applied Aspects. *Mycorrhiza* **7**(3): 139-153.
- Lichtfouse E, Sappin Didier V, Denaix L, Caria G, Metzger L, Amellal Nassr N, Schmidt J. 2005.** A 25-Year Record of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils Amended with Sewage Sludges. *Environmental chemistry letters* **3**(3): 140-144.
- Lin D, Zhu L, He W, Tu Y. 2006.** Tea Plant Uptake and Translocation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Water and around Air. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(10): 3658-3662.
- Lin H, Tao S, Zuo Q, Coveney RM. 2007.** Uptake of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Maize Plants. *Environmental Pollution* **148**(2): 614-619.
- Liste HH, Prutz I. 2006.** Plant Performance, Dioxygenase-Expressing Rhizosphere Bacteria, and Biodegradation of Weathered Hydrocarbons in Contaminated Soil. *Chemosphere* **62**(9): 1411-1420.
- Liu H, Weisman D, Ye YB, Cui B, Huang YH, Colon-Carmona A, Wang ZH. 2009.** An Oxidative Stress Response to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure Is Rapid and Complex in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Science* **176**(3): 375-382.
- Liu SL, Luo YM, Cao ZH, Wu LH, Ding KQ, Christie P. 2004.** Degradation of Benzo[a]Pyrene in Soil with Arbuscular Mycorrhizal Alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health* **26**(2-3): 285-293.
- Lohmann R, Jones KC. 1998.** Dioxins and Furans in Air and Deposition: A Review of Levels, Behaviour and Processes. *Science of the Total Environment* **219**(1): 53-81.

M

- Mackay D, Shiu W, Ma K. 1992.** *Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Dioxins and Dibenzofurans*. Boca Raton, Florida: Lewis publisher.
- Maddalena RL, McKone TE, Kado NY. 2002.** Exposure Chamber Measurements of Mass Transfer and Partitioning at the Plant/Air Interface. *Environmental Science & Technology* **36**(16): 3577-3585.
- Malcolm MM, Shore RF 2003.** Effects of PAHs on Terrestrial and Freshwater Birds, Mammals and Amphibians. In: P. E. T. Douben ed. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective* Chichester, England.

- McCrary JK, Andersen CP. 2000.** The Effect of Ozone on Below-Ground Carbon Allocation in Wheat. *Environmental Pollution* **107**(3): 465-472.
- McKinney. 1941.** Absorption of Light by Chlorophyll Solutions. *Journal of Biological Chemistry* **140**: 315-332.
- McLachlan MS. 1999.** Framework for the Interpretation of Measurements of SOCs in Plants. *Environmental Science & Technology* **33**(11): 1799-1804.
- Mei X, Lin DH, Xu Y, Wu YY, Tu YY. 2009.** Effects of Phenanthrene on Chemical Composition and Enzyme Activity in Fresh Tea Leaves. *Food Chemistry* **115**(2): 569-573.
- Meyer C, Bernard N, Moskura M, Toussaint ML, Denayer F, Gilbert D. 2010a.** Effects of Urban Particulate Deposition on Microbial Communities Living in Bryophytes: An Experimental Study. *Ecotoxicology and environmental safety* **73**(7): 1776-1784.
- Meyer C, Desalme D, Bernard N, Toussaint ML, Gilbert D.** Atmospheric deposition of phenanthrene in soils and effects on testate amoebae community (in preparation)
- Meyer C, Gilbert D, Gaudry A, Franchi M, Nguyen-Viet H, Fabure J, Bernard N. 2010b.** Relationship of Atmospheric Pollution Characterized by Gas (NO₂) and Particles (PM10) to Microbial Communities Living in Bryophytes at Three Differently Polluted Sites (Rural, Urban, and Industrial). *Microbial Ecology* **59**(2): 324-334.
- Mortimer PE, Perez-Fernandez MA, Valentine AJ. 2008.** The Role of Arbuscular Mycorrhizal Colonization in the Carbon and Nutrient Economy of the Tripartite Symbiosis with Nodulated *Phaseolus Vulgaris*. *Soil Biology & Biochemistry* **40**(5): 1019-1027.
- Mostafa AR, Hegazi AH, El-Gayar MS, Andersson JT. 2008.** Source Characterization and the Environmental Impact of Urban Street Dusts from Egypt Based on Hydrocarbon Distributions. *Fuel*.
- Mozafar A, Ruh R, Klingel P, Gamper H, Egli S, Frossard E. 2002.** Effect of Heavy Metal Contaminated Shooting Range Soils on Mycorrhizal Colonization of Roots and Metal Uptake by Leek. *Environmental Monitoring and Assessment* **79**(2): 177-191.
- Murakami S, Kato S, Ito K, Zhu Q. 2003.** Modeling and CFD Prediction for Diffusion and Adsorption within Room with Various Adsorption Isotherms. *Indoor Air* **13**: 20-27.
- Murillo R, Garcia T, Aylon E, Callen MS, Navarro MV, Lopez JM, Mastral AM. 2004.** Adsorption of Phenanthrene on Activated Carbons: Breakthrough Curve Modeling. *Carbon* **42**(10): 2009-2017.

N

- Nam JJ, Thomas GO, Jaward FM, Steinnes E, Gustafsson O, Jones KC. 2008.** Pahs in Background Soils from Western Europe: Influence of Atmospheric Deposition and Soil Organic Matter. *Chemosphere* **70**(9): 1596-1602.
- Ngao J, Epron D, Brechet C, Granier A. 2005.** Estimating the Contribution of Leaf Litter Decomposition to Soil CO₂ Efflux in a Beech Forest Using C-13-Depleted Litter. *Global Change Biology* **11**(10): 1768-1776.
- Nguyen-Viet H, Bernard N, Mitchell EAD, Badot PM, Gilbert D. 2008.** Effect of Lead Pollution on Testate Amoebae Communities Living in Sphagnum Fallax: An Experimental Study. *Ecotoxicology and environmental safety* **69**(1): 130-138.
- Nguyen-Viet H, Bernard N, Mitchell EAD, Cortet J, Badot PM, Gilbert D. 2007.** Relationship between *Testate Amoeba* (Protist) Communities and Atmospheric Heavy Metals Accumulated in *Barbula Indica* (Bryophyta) in Vietnam. *Microbial Ecology* **53**(1): 53-65.

Nie M, Yang QA, Jiang LF, Fang CM, Chen JK, Li B. 2010. Do Plants Modulate Biomass Allocation in Response to Petroleum Pollution? *Biology Letters* **6**(6): 811-814.

O

Oguntimehin I, Eissa F, Sakugawa H. 2010. Negative Effects of Fluoranthene on the Ecophysiology of Tomato Plants (*Lycopersicon Esculentum* Mill): Fluoranthene Mists Negatively Affected Tomato Plants. *Chemosphere* **78**(7): 877-884.

Oguntimehin I, Nakatani N, Sakugawa H. 2008. Phytotoxicities of Fluoranthene and Phenanthrene Deposited on Needle Surfaces of the Evergreen Conifer, Japanese Red Pine (*Pinus Densiflora* Sieb. Et Zucc.). *Environmental Pollution* **154**(2): 264-271.

Olsson PA, Johnson NC. 2005. Tracking Carbon from the Atmosphere to the Rhizosphere. *Ecology Letters* **8**(12): 1264-1270.

Orecchio S. 2007. Pahs Associated with the Leaves of *Quercus Ilex* L.: Extraction, GC-MS Analysis, Distribution and Sources. Assessment of Air Quality in the Palermo (Italy) Area. *Atmospheric Environment* **41**(38): 8669-8680.

Ouahmane L, Hafidi M, Plenchette C, Kisa M, Bournezzough A, Thioulouse J, Duponnois R. 2006. Lavandula Species as Accompanying Plants in Cupressus Replanting Strategies: Effect on Plant Growth, Mycorrhizal Soil Infectivity and Soil Microbial Catabolic Diversity. *Applied Soil Ecology* **34**(2-3): 190-199.

Ouyang G, Pawliszyn J. 2007. Configurations and Calibration Methods for Passive Sampling Techniques. *Journal of Chromatography A* **1168**(1-2): 226-235.

P

Paskova V, Hilscherova K, Feldmannova M, Blaha L. 2006. Toxic Effects and Oxidative Stress in Higher Plants Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their N-Heterocyclic Derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**(12): 3238-3245.

Patankar SV. 1980. *Numerical Heat Transfer and Fluid Flow* Taylor and Francis.

Peck AM, Hornbuckle KC. 2003. Use of a Climate-Controlled Chamber to Investigate the Fate of Gas-Phase Anthracene. *Water Air and Soil Pollution* **145**(1): 17-34.

Pell EJ, Temple PJ, Friend AL, Mooney HA, Winner WE. 1994. Compensation as a Plant-Response to Ozone and Associated Stresses- an Analysis of Ropis Experiments. *Journal of Environmental Quality* **23**(3): 429-436.

Peltonen K, Kuljukka T. 1995. Air Sampling and Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Chromatography A* **710**(1): 93-108.

Piccardo MT, Pala M, Bonaccorso B, Stella A, Redaelli A, Paola G, Valerio F. 2005. *Pinus Nigra* and *Pinus Pinaster* Needles as Passive Samplers of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Pollution* **133**(2): 293-301.

Pignatello JJ, Xing BS. 1996. Mechanisms of Slow Sorption of Organic Chemicals to Natural Particles. *Environmental Science & Technology* **30**(1): 1-11.

Plain C, Gerant D, Maillard P, Dannoura M, Dong YW, Zeller B, Priault P, Parent F, Epron D. 2009. Tracing of Recently Assimilated Carbon in Respiration at High Temporal Resolution in the Field with a Tuneable Diode Laser Absorption Spectrometer after *in Situ* (CO₂)-C-13 Pulse Labelling of 20-Year-Old Beech Trees. *Tree Physiology* **29**(11): 1433-1445.

- Plenchette C, Perrin R, Duvert P. 1989.** The Concept of Soil Infectivity and a Method for Its Determination as Applied to Endomycorrhizas. *Canadian Journal of Botany* **67**(1): 112-115.
- Prajapati SK, Tripathi BD. 2008.** Biomonitoring Seasonal Variation of Urban Air Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) Using *Ficus Benghalensis* Leaves. *Environmental Pollution* **151**(3): 543-548.
- Prevedouros K, Brorstrom-Lunden E, Halsall CJ, Jones KC, Lee RGM, Sweetman AJ. 2004.** Seasonal and Long-Term Trends in Atmospheric Pah Concentrations: Evidence and Implications. *Environmental Pollution* **128**(1-2): 17-27.
- Purchase D, Miles RJ, Young TWK. 1997.** Cadmium Uptake and Nitrogen Fixing Ability in Heavy-Metal-Resistant Laboratory and Field Strains of *Rhizobium Leguminosarum* Biovar Trifolii. *Fems Microbiology Ecology* **22**(1): 85-93.

R

- Ramos-Zapata J, Guadarrama P, Navarro-Alberto J, Orellana R. 2011.** Arbuscular Mycorrhizal Propagules in Soils from a Tropical Forest and an Abandoned Cornfield in Quintana Roo, Mexico: Visual Comparison of Most-Probable-Number Estimates. *Mycorrhiza* **21**(2): 139-144.
- Reid BJ, Jones KC, Semple KT. 2000.** Bioavailability of Persistent Organic Pollutants in Soils and Sediments - a Perspective on Mechanisms, Consequences and Assessment. *Environmental Pollution* **108**(1): 103-112.
- Reynoso-Cuevas L, Gallegos-Martinez ME, Cruz-Sosa F, Gutierrez-Rojas M. 2008.** *In vitro* evaluation of germination and growth of five species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource Technology* **99** : 6379-6385
- Rey-Salgueiro L, Martinez-Carballo E, Garcia-Falcon MS, Simal-Gandara J. 2008.** Effects of a Chemical Company Fire on the Occurrence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Plant Foods. *Food Chemistry* **108**(1): 347-353.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C. 2009.** Acquisition of Phosphorus and Nitrogen in the Rhizosphere and Plant Growth Promotion by Microorganisms. *Plant and Soil* **321**(1-2): 305-339.
- Ringelmann A, Riedel M, Riederer M, Hildebrandt U. 2009.** Two Sides of a Leaf Blade: Blumeria Graminis Needs Chemical Cues in Cuticular Waxes of *Lolium Perenne* for Germination and Differentiation. *Planta* **230**(1): 95-105.
- Ruehr NK, Offermann CA, Gessler A, Winkler JB, Ferrio JP, Buchmann N, Barnard RL. 2009.** Drought Effects on Allocation of Recent Carbon: From Beech Leaves to Soil CO₂ Efflux. *New Phytologist* **184**(4): 950-961.

S

- Schwab AP, Al-Assi AA, Banks MK. 1998.** Adsorption of Naphthalene onto Plant Roots. *Journal of Environmental Quality* **27**(1): 220-224.
- Seo JS, Keum YS, Harada RM, Li QX. 2007.** Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Degrading Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Organophosphorus Pesticides from PAH-Contaminated Soil in Hilo, Hawaii. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(14): 5383-5389.
- Shann JR. 1995.** The Role of Plants and Plant/Microbial Systems in the Reduction of Exposure. *Environmental Health Perspectives* **103**: 13-15.

- Sharma AP, Tripathi BD. 2008.** Assessment of Atmospheric Pahs Profile through *Calotropis Gigantea* R.Br. Leaves in the Vicinity of an Indian Coal-Fired Power Plant. *Environmental Monitoring and Assessment*: 1-6.
- Shaw M, Muller JF 2004.** Preliminary Evaluation of the Occurrence of Herbicides and Pahs in the Wet Tropics Region of the Great Barrier Reef, Australia, Using Passive Samplers. In. *4th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology*. Hong Kong, Peoples R China. 876-881.
- Sieverding E. 1991.** *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems*. Eschborn, Germany: GTZ.
- Simonich SL, Hites RA. 1994.** Importance of Vegetation in Removing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from the Atmosphere. *Nature* **370**(6484): 49-51.
- Simonich SL, Hites RA. 1995.** Organic Pollutant Accumulation in Vegetation *Environmental Science & Technology* **29**(12): 2905-2914.
- Simonich SL, Hites, R.A. 1994.** Vegetation-Atmosphere Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science & Technology* **28**: 939-943.
- Smith KEC, Thomas GO, Jones KC. 2001.** Seasonal and Species Differences in the Air - Pasture Transfer of PAHs. *Environmental Science & Technology* **35**(11): 2156-2165.
- Soderstrom H, Hajslova J, Kocourek V, Siegmund B, Kocan A, Obiedzinski MW, Tysklind M, Bergqvist PA. 2005.** Pahs and Nitrated Pahs in Air of Five European Countries Determined Using SPMDs as Passive Samplers. *Atmospheric Environment* **39**(9): 1627-1640.
- Srogi K. 2007.** Monitoring of Environmental Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review. *Environmental Chemistry Letters* **5**(4): 169-195.
- Stamhuis EJ. 2006.** Basics and Principles of Particle Image Velocimetry (Piv) for Mapping Biogenic and Biologically Relevant Flows. *Aquatic Ecology* **40**(4): 463-479.
- Su YH, Zhu YG. 2008.** Uptake of Selected PAHs from Contaminated Soils by Rice Seedlings (*Oryza Sativa*) and Influence of Rhizosphere on PAH Distribution. *Environmental Pollution* **155**(2): 359-365.
- Sverdrup LE, Kelley AE, Krogh PH, Nielsen T, Jensen J, Scott-Fordsmand JJ, Stenersen J. 2001.** Effects of Eight Polycyclic Aromatic Compounds on the Survival and Reproduction of the Springtail *Folsomia Fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(6): 1332-1338.
- Sverdrup LE, Krogh PH, Nielsen T, Kjaer C, Stenersen J. 2003.** Toxicity of Eight Polycyclic Aromatic Compounds to Red Clover (*Trifolium Pratense*), Ryegrass (*Lolium Perenne*), and Mustard (*Sinapsis Alba*). *Chemosphere* **53**(8): 993-1003.
- Sverdrup LE, Krogh PH, Nielsen T, Stenersen J. 2002.** Relative Sensitivity of Three Terrestrial Invertebrate Tests to Polycyclic Aromatic Compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(9): 1927-1933.

T

- Tao S, Jiao XC, Chen SH, Xu FL, Li YJ, Liu FZ. 2006.** Uptake of Vapor and Particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Cabbage. *Environmental Pollution* **140**(1): 13-15.
- Tao S, Liu Y, Xu W, Lang C, Liu S, Dou H, Liu W. 2007.** Calibration of a Passive Sampler for Both Gaseous and Particulate Phase Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science & Technology* **41**(2): 568-573.
- Tao S, Liu YN, Lang C, Wang WT, Yuan HS, Zhang DY, Qiu WX, Liu JM, Liu ZG, Liu SZ, Yi R, Ji M, Liu XX. 2008.** A Directional Passive Air Sampler for Monitoring

- Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Air Mass. *Environmental Pollution* **156**(2): 435-441.
- Tao YQ, Zhang SZ, Zhu YG, Christie P. 2009.** Uptake and Acropetal Translocation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Grown in Field-Contaminated Soil. *Environmental Science & Technology* **43**(10): 3556-3560.
- Team RDC 2010.** R: A Language and Environment for Statistical Computing. In R. f. f. S. computing. Available at : .
- Tennant D. 1975.** Test of a Modified Line Intesect Method of Estimating Root Length *Journal of Ecology* **63**(3): 995-1001.
- Thomas J, Holsen TM, Dhaniyala S. 2006.** Computational Fluid Dynamic Modeling of Two Passive Samplers. *Environmental Pollution* **144**(2): 384-392.
- Tian ZF, Tu JY, Yeoh GH, Yuen RKK. 2006.** On the Numerical Study of Contaminant Particle Concentration in Indoor Airflow. *Building and Environment* **41**(11): 1504-1514.
- Trapp S, McFarlane C, Matthies M. 1994.** Model for Upatke of Xenobiotics into Plants - Valiadation with Bromacil Experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(3): 413-422.
- Tsapakis M, Stephanou EG. 2005.** Occurrence of Gaseous and Particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Urban Atmosphere: Study of Sources and Ambient Temperature Effect on the Gas/Particle Concentration and Distribution. *Environmental Pollution* **133**(1): 147-156.
- Tuhackova J, Cajthaml T, Novak K, Novotny C, Mertelik J, Sasek V. 2001.** Hydrocarbon Deposition and Soil Microflora as Affected by Highway Traffic. *Environmental Pollution* **113**(3): 255-262.

U

- Uffindell LA, Meharg AA. 2007.** The Fate of C-14-Naphthalene in Soil Microcosms Containing Scots Pine Seedlings and Enchytraelds. *Soil biology and biochemistry* **39**(2): 560-566.
- Uno S, Dalton TP, Derkenne S, Curran CP, Miller ML, Shertzer HG, Nebert DW. 2004.** Oral Exposure to Benzo[a] Pyrene in the Mouse: Detoxication by Inducible Cytochrome P450 Is More Important Than Metabolic Activation. *Molecular Pharmacology* **65**(5): 1225-1237.

V

- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS. 1987.** An Extraction Method for Measuring Soil Microbial Biomass-C. *Soil Biology & Biochemistry* **19**(6): 703-707.
- Verdin A, Sahraoui ALH, 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**(6): 397-405.
- Verkleij JAC, Golan-Goldhirsh A, Antosiewisz DM, Schwitzguebel JP, Schroder P. 2009.** Dualities in Plant Tolerance to Pollutants and Their Uptake and Translocation to the Upper Plant Parts. *Environmental and Experimental Botany* **67**(1): 10-22.
- Volkering F, Breure AM 2003.** Biodegradation and General Aspects of Bioavailability. In: P. E. T. Douben ed. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective* Chichester, England.

W

- Wagrowski DM, Hites RA. 1997a.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation in Urban, Suburban, and Rural Vegetation. *Environmental Science and Technology* **31**(1): 279-282.
- Wagrowski DM, Hites RA. 1997b.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation in Urban, Suburban, and Rural Vegetation. *Environmental Science & Technology* **31**(1): 279-282.
- Waight K, Pinyakong O, Luepromchai E. 2007.** Degradation of Phenanthrene on Plant Leaves by Phyllosphere Bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* **53**(5): 265-272.
- Wang WT, Simonich SLM, Xue MA, Zhao JY, Zhang N, Wang R, Cao J, Tao S. 2010.** Concentrations, Sources and Spatial Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils from Beijing, Tianjin and Surrounding Areas, North China. *Environmental Pollution* **158**(5): 1245-1251.
- Wang YQ, Tao S, Jiao XC, Coveney RM, Wu SP, Xing BS. 2008.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Leaf Cuticles and Inner Tissues of Six Species of Trees in Urban Beijing. *Environmental Pollution* **151**: 158-164.
- Wang Z, Chen JW, Yang P, Tian FL, Qiao XL, Bian HT, Ge LK. 2009.** Distribution of PAHs in Pine (*Pinus Thunbergii*) Needles and Soils Correlates with Their Gas-Particle Partitioning. *Environmental Science & Technology* **43**(5): 1336-1341.
- Weisman D, Alkio M, Colon-Carmona A. 2010.** Transcriptional Responses to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Stress in *Arabidopsis Thaliana* Reveal the Involvement of Hormone and Defense Signaling Pathways. *BMC Plant Biology* **10**.
- Weiss P. 2000.** Vegetation/Soil Distribution of Semivolatile Organic Compounds in Relation to Their Physicochemical Properties. *Environmental Science & Technology* **34**(9): 1707-1714.
- Wieczorek JK, Wieczorek ZJ. 2007.** Phytotoxicity and Accumulation of Anthracene Applied to the Foliage and Sandy Substrate in Lettuce and Radish Plants. *Ecotoxicology and environmental safety* **66**(3): 369-377.
- Wilcke W, Krauss M, Lilienfein J, Amelung W. 2004.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Storage in a Typical Cerrado of the Brazilian Savanna. *Journal of Environmental Quality* **33**(3): 946-955.
- Wild E, Dent J, Barber JL, Thomas GO, Jones KC. 2004.** A Novel Analytical Approach for Visualizing and Tracking Organic Chemicals in Plants. *Environmental Science & Technology* **38**(15): 4195-4199.
- Wild E, Dent J, Thomas GO, Jones KC. 2005a.** Direct Observation of Organic Contaminant Uptake, Storage, and Metabolism within Plant Roots. *Environmental Science & Technology* **39**(10): 3695-3702.
- Wild E, Dent J, Thomas GO, Jones KC. 2005b.** Real-Time Visualization and Quantification of PAH Photodegradation on and within Plant Leaves. *Environmental Science & Technology* **39**(1): 268-273.
- Wild E, Dent J, Thomas GO, Jones KC. 2006.** Visualizing the Air-to-Leaf Transfer and within-Leaf Movement and Distribution of Phenanthrene: Further Studies Utilizing Two-Photon Excitation Microscopy. *Environmental Science & Technology* **40**(3): 907-916.
- Wild E, Dent J, Thomas GO, Jones KC. 2007.** Use of Two-Photon Excitation Microscopy and Autofluorescence for Visualizing the Fate and Behavior of Semivolatile Organic

- Chemicals within Living Vegetation. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**(12): 2486-2493.
- Wild SR, Jones KC. 1995.** Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the United-Kingdom Environment - a Preliminary Source Inventory and Budget. *Environmental Pollution* **88**(1): 91-108.
- Wilson SC, Jones KC. 1993.** Bioremediation of Soil Contaminated with Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) - a Review *Environmental Pollution* **81**(3): 229-249.

Y

- Yang P, Chen J, Wang Z, Qiao X, Cai X, Tian F, Ge L. 2007.** Contributions of Deposited Particles to Pine Needle Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Environmental Monitoring* **9**(11): 1248-1253.
- Yang Z, Zhu L. 2007.** Performance of the Partition-Limited Model on Predicting Ryegrass Uptake of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chemosphere* **67**(2): 402-409.
- Yang ZY, Zhu LZ. 2006.** Prediction of Pahs Uptake by Ryegrass with a Partition-Limited Model. *Huanjing Kexue/Environmental Science* **27**(6): 1212-1216.
- Yutthammo C, Thongthammachat N, Pinphanichakarn P, Luepromchai E. 2010.** Diversity and Activity of PAH-Degrading Bacteria in the Phyllosphere of Ornamental Plants. *Microbial Ecology* **59**(2): 357-368.

Z

- Zhang ZH, Rengel Z, Meney K. 2010.** Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Differentially Influence Growth of Various Emergent Wetland Species. *Journal of Hazardous Materials* **182**(1-3): 689-695.
- Zhu YH, Zhang SZ, Zhu YG, Christie P, Shan XQ. 2007.** Improved Approaches for Modeling the Sorption of Phenanthrene by a Range of Plant Species. *Environmental Science & Technology* **41**(22): 7818-7823.
- Zoric L, Merkulov L, Lukovic J, Boza P, Polic D. 2009.** Leaf Epidermal Characteristics of Trifolium L. Species from Serbia and Montenegro. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **204**(3): 198-209.
- Zuo Q, Lin H, Zhang XL, Li QL, Liu SZ, Tao S. 2006.** A Two-Compartment Exposure Device for Foliar Uptake Study. *Environmental Pollution* **143**(1): 126-128.

Textes juridiques, protocoles et conventions

- Convention de Stockholm** sur les Polluants Organiques Persistants (POPs). 22 mai 2001, Stockholm, Suède
- JOCE 2004a.** Directive 2004/107/CE du Parlement Européen et du Conseil du 15 Décembre 2004 concernant l'arsenic, le Cadmium, le Mercure, le Nickel et les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans l'air ambiant. Paru dans le *Journal Officiel des Communautés Européennes*, 2005.
- JOCE 2004b.** Règlement CE N°850/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 Avril 2004 sur Les Polluants Organiques Persistants, modifiant La Directive 79/117/CEE. Paru dans le *Journal Officiel des Communautés Européenne*, 2004.

Références bibliographiques

- JORF 1996.** Loi sur L'Air et L'Utilisation Rationnelle de L'Energie (LAURE) du 30 Décembre 1996. Paru dans le *Journal officiel de la République française*, 1997.
- JORF 2001.** Décret N°2001-1220 Du 20 Décembre 2001. Paru dans le *Journal Officiel de la République Française*, 2001
- JOUE 2004.** Directive 2004/107/CE Du Parlement Européen Et Du Conseil Du 15 Décembre 2004 concernant l'arsenic, le cadmium, le mercure, le nickel et les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'air ambiant. Paru dans le *Journal Officiel de l'Union Européenne*, 2005
- JOUE 2006.** Règlement (CE) No 1881/2006 De La Commission Du 19 Décembre 2006 Portant Sur La Fixation De Teneurs Maximales Pour Certains Contaminants Dans Les Denrées Alimentaires. Paru dans le *Journal Officiel de l'Union Européenne*, 2006
- Protocole d'Aarhus** sur Les Polluants organiques persistants (POPs). 24 juin 1998, Aarhus, Danemark

RESUME

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des polluants organiques persistants potentiellement mutagènes et cancérigènes. Leur transfert de l'atmosphère vers les écosystèmes, notamment vers les plantes, conditionne leur entrée dans les chaînes alimentaires mais les modalités de ce transfert restent encore mal connues. L'objectif de ce travail était donc de caractériser le transfert et d'identifier les effets biologiques des HAP atmosphériques sur un système sol-plante-microorganismes symbiotiques.

Un dispositif expérimental a été conçu afin de recréer en laboratoire une pollution atmosphérique par les HAP avec comme HAP modèle le phénanthrène (PHE). Le dispositif a fait l'objet d'une validation et d'une calibration élaborée de manière originale par une double approche mêlant l'expérimental à la simulation mathématique. Les niveaux d'exposition en polluant ($150 \mu\text{g m}^{-3}$), contrôlés par des échantillonneurs passifs, se sont avérés pertinents par rapport aux conditions *in situ*. Ce dispositif a donc été utilisé pour exposer durant un mois des microsystèmes sol-plante-microorganismes au PHE par voie atmosphérique.

Les différentes études ont mis en évidence un transfert du PHE depuis l'atmosphère vers tous les compartiments du microsystème, avec une accumulation majeure vers les feuilles de trèfle ou de ray-grass (respectivement 170 et $70 \mu\text{g g}^{-1}$ MS) et un transfert phloémien vers les racines est suggéré. Chez le trèfle, la mycorhization n'a pas été affectée, tandis que le nombre de nodules actifs a diminué de manière significative. Contrairement aux racines, la biomasse aérienne du trèfle a été significativement affectée (environ - 25 %) par l'exposition au PHE atmosphérique, suggérant un impact sur le métabolisme carboné de la plante. Une expérience de marquage des trèfles au $^{13}\text{C-CO}_2$ a effectivement montré un impact négatif du PHE atmosphérique sur la croissance, l'allocation de biomasse et l'allocation carbonée.

Pour conclure, ces études ont permis non seulement de caractériser les effets biologiques et physiologiques des HAP atmosphériques sur les végétaux mais également de proposer l'utilisation du potentiel mycorhizien comme indicateur de pollution diffuse des sols.

Mots-clés : Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) atmosphériques, transfert, phytotoxicité, croissance, allocation carbonée, phénanthrène (PHE), trèfle violet (*Trifolium pratense* L.), ray-grass (*Lolium perenne* L.), mycorhizes, *Rhizobium*
