

LES AGENTS DE LA BIOREMÉDIATION DES SOLS POLLUÉS PAR LES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES

Anthony Verdin, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui* & Roger Durand

Laboratoire de mycologie/phytopathologie/environnement (M.P.E.) - Calais

Université du Littoral (U.L.C.O.) - Côte d'Opale

Parmi les techniques de dépollution et de réhabilitation des sols (physiques, chimiques et biologiques), la bioremédiation (détoxification ou minéralisation d'un polluant par les organismes vivants) des sols *in situ* semble être une méthode d'intérêt d'un point de vue économique et écologique. Contrairement aux autres procédés (incinération, lessivage du sol...) où les polluants sont souvent transférés et non détruits, la biodégradation peut permettre la minéralisation du xénobiotique, et donc sa disparition. De plus, cette technique est particulièrement adaptée pour le traitement des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPAs), contaminants comptant parmi les plus récalcitrants et les plus toxiques (pouvoirs cancérigène et mutagène). Il a été démontré que de nombreux organismes, procaryotes ou eucaryotes (algues, bactéries, champignons, plantes), possèdent la capacité à dégrader les HPAs. La présente revue a pour but de faire le point sur l'état actuel des connaissances concernant les organismes utilisés en tant qu'agents biologiques efficaces de dépollution des sols contaminés par les HPAs. Les systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation des HPAs chez ces différents systèmes biologiques seront décrits.

Soil PAHs contamination is now becoming of great concern. This pollution has a negative impact on activities directly or indirectly related to the soil, but it has also potential consequences for human health and the quality of the ecosystem. Indeed, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) represent an important class of environmental pollutants, of which some are known to be mutagenic and carcinogenic. Consequently, the US Environmental Protection Agency (EPA) has listed some PAHs among the priority pollutants to be monitored in aquatic and terrestrial ecosystems.

Bioremediation, the use of organisms for the treatment of soil pollution, have received considerable interest in recent years because of its ecological aspect and because of potential cost savings compared to conventional non biological techniques.

The objective of this paper is to review findings concerning the potential of the organisms used for bioremediation of soils polluted with PAHs. At present,

numerous organisms (bacteria, fungi, algae and plants) are reported to metabolise PAHs. The several enzymatic mechanisms known to be involved in the PAHs degradation by the different biological systems will be underlined.

INTRODUCTION

Les sols sont, avec les milieux aquatiques et l'atmosphère, une des trois composantes majeures de la biosphère. À ce titre, ils ont joué et jouent en permanence un rôle déterminant dans l'apparition et le maintien de l'activité biologique et de la biodiversité à la surface de la planète. La contamination des sols due aux activités agricole, industrielle et urbaine devient aujourd'hui un problème préoccupant. En effet, cela se traduit par des impacts négatifs sur les activités dépendant directement ou indirectement de la terre, mais aussi sur la santé humaine et les écosystèmes. Un recensement national des sites pollués réalisé en 1994 par le ministère de l'Environnement a répertorié 669 sites contaminés dont 400 sont pollués par les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPAs).

Les HPAs sont des polluants organiques très nocifs aussi bien pour l'Homme que pour l'environnement. En effet, certains d'entre eux peuvent présenter une grande toxicité du fait de leurs pouvoirs mutagènes et/ou cancérigènes. En 1976, ils ont été inscrits dans la liste des polluants prioritaires établie par l'agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (Environmental Protection Agency). La prise de conscience de l'impact sur l'environnement des pollutions générées par le déversement de ces produits dans les eaux et les sols est de plus en plus vive. La résorption des pollutions des nappes phréatiques et la réhabilitation des sols pollués sont devenus, au moins dans les pays développés, une priorité environnementale. Il subsiste cependant de grandes disparités tant dans les prises de conscience que dans les actions entreprises ou envisagées.

Les technologies de traitement biologique des sols pol-

lués sont en plein essor. Le développement de nouveaux procédés impliquant des organismes vivants représente une solution alternative écologique, mais également moins coûteuse que les procédés chimiques ou thermiques actuellement utilisés. De plus ces méthodes, appelées bio-dépollution ou bioremédiation, sont particulièrement adaptées au traitement de volumes de sols importants et à l'assainissement *in situ*. La bioremédiation est basée sur les capacités épuratrices des systèmes biologiques présents dans la nature: microorganismes (bactéries, champignons, algues) ou organismes supérieurs (végétaux). Dans la nature, se développent spontanément des processus de dégradation ou de transformation de composés organiques ou minéraux. Ces organismes vivants, en transformant les déchets, jouent un rôle essentiel dans les cycles biochimiques vitaux. Mais ces réactions se produisent avec des cinétiques trop lentes pour avoir une application. Les procédés de bioremédiation visent donc, par intervention de l'Homme, à augmenter les capacités de dégradation des microorganismes du sol pour accélérer les phénomènes naturels, afin de ramener les quantités de polluants extractibles en dessous des normes établies dans une durée limitant les risques de dispersion ou de contamination plus larges. La présente revue a pour objectif de donner un aperçu général sur l'état actuel des connaissances concernant

les organismes utilisés en tant qu'agents biologiques efficaces de dépollution des sols contaminés par les HPAs. Les mécanismes enzymatiques intervenant dans la dégradation des HPAs chez ces différents systèmes biologiques seront décrits.

Il a été démontré que de nombreux organismes, procaroyotes ou eucaryotes, possèdent la capacité de dégrader les HPAs. Parmi ceux-ci, les bactéries et les champignons sont les plus étudiés et semblent les plus efficaces. En effet, ils sont capables de métaboliser une large gamme d'HPAs, les transformant partiellement en métabolites (de nombreux et divers intermédiaires métaboliques ont été décelés) ou en les minéralisant. En fonction du bagage enzymatique de l'organisme considéré, plusieurs voies peuvent être empruntées pour la métabolisation des HPAs. La figure 1 résume les différentes réactions responsables de l'attaque des HPAs [Cerniglia, 1993].

Les algues et les cyanobactéries

Quelques études ont démontré l'aptitude des algues vertes, rouges et brunes ainsi que des cyanobactéries à dégrader les HPAs. Il semble cependant que cette capacité se limite aux HPAs de faible poids moléculaire [Juhasz et Naidu, 2000], même si quelques travaux ont prouvé la capacité d'une algue verte (*Selanastum capricornutum*) à dégrader le benzo[a]pyrène [Lindquist et Warshawsky, 1985]. La voie métabolique généralement

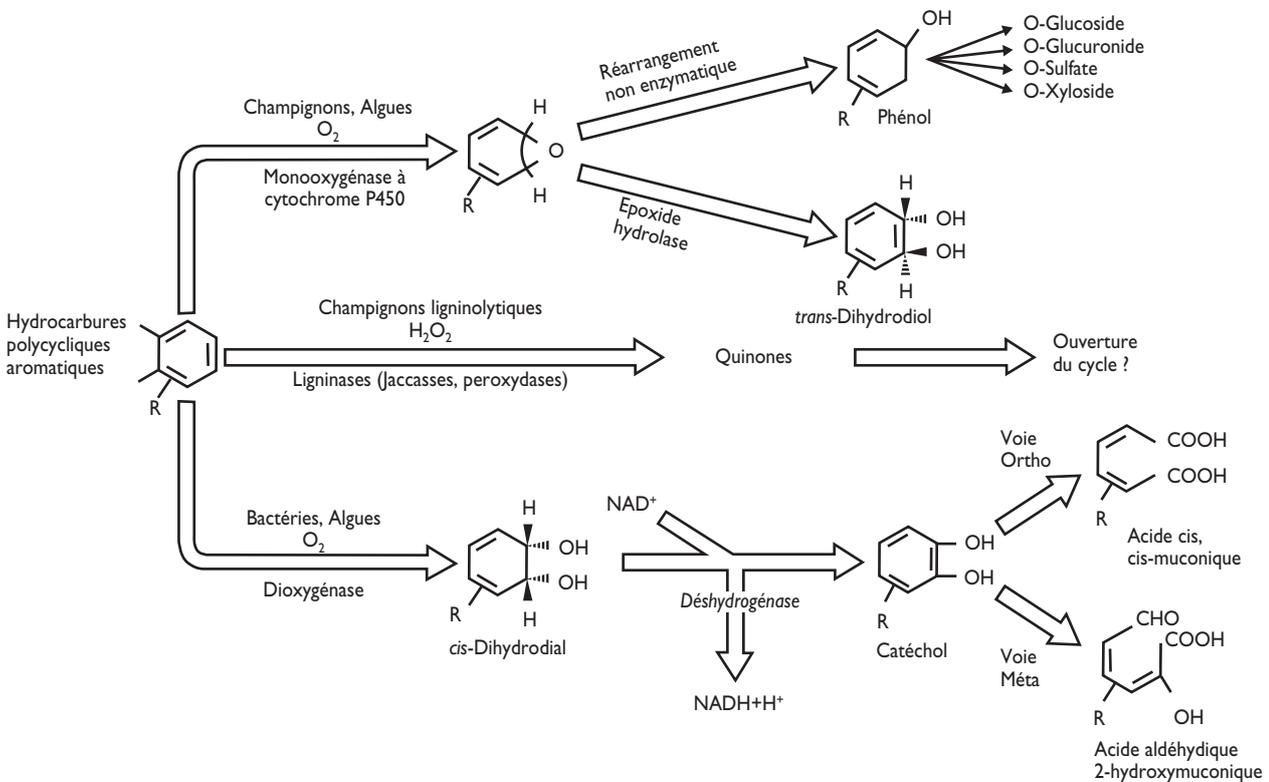


Figure 1 : Étapes initiales de l'oxydation des hydrocarbures polycycliques aromatiques par les microorganismes [Cerniglia, 1993].

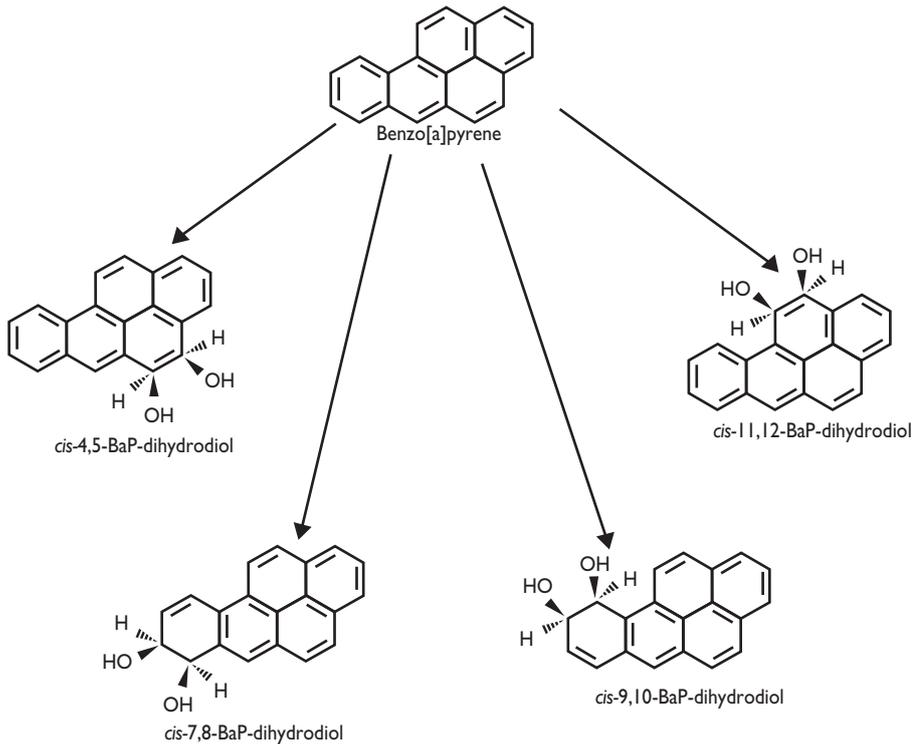


Figure 2: Produits d'oxydation du benzo[a]pyrène par les algues [Juhasz et Naidu, 2000].

empruntée conduit à la formation de cis-dihydrodiols ou plus rarement de trans-dihydrodiols (figure 2) [Juhash et Naidu, 2000].

Les bactéries

Les bactéries ont été le groupe de microorganismes le plus étudié, et leur aptitude à dégrader les hydrocarbures a été démontrée depuis plus de 50 ans. Les différents genres bactériens fréquemment décrits pour leur capacité à dégrader les HPAs sont: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Beijerinckia*, *Gordona*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* [Cerniglia, 1992; Juhash et Naidu, 2000].

La dégradation des HPAs par les bactéries se fait en plusieurs étapes afin d'obtenir des composés simples servant comme source de carbone (figure 3).

La première étape consiste en une attaque initiale des HPAs par l'intermédiaire d'une enzyme de type dioxygénase (addition dans le cycle benzénique de deux atomes d'oxygène en des positions bien précises en fonction de l'HPA considéré). Cette première étape conduit à la formation de cis-dihydrodiols qui sont métabolisés, dans un second temps, en catéchol ou acides gentisiques qui sont à leur tour dégradés selon deux voies, dites en méta et en ortho, en composés simples (pyruvate, succinate...) facilement utilisables par les microorga-

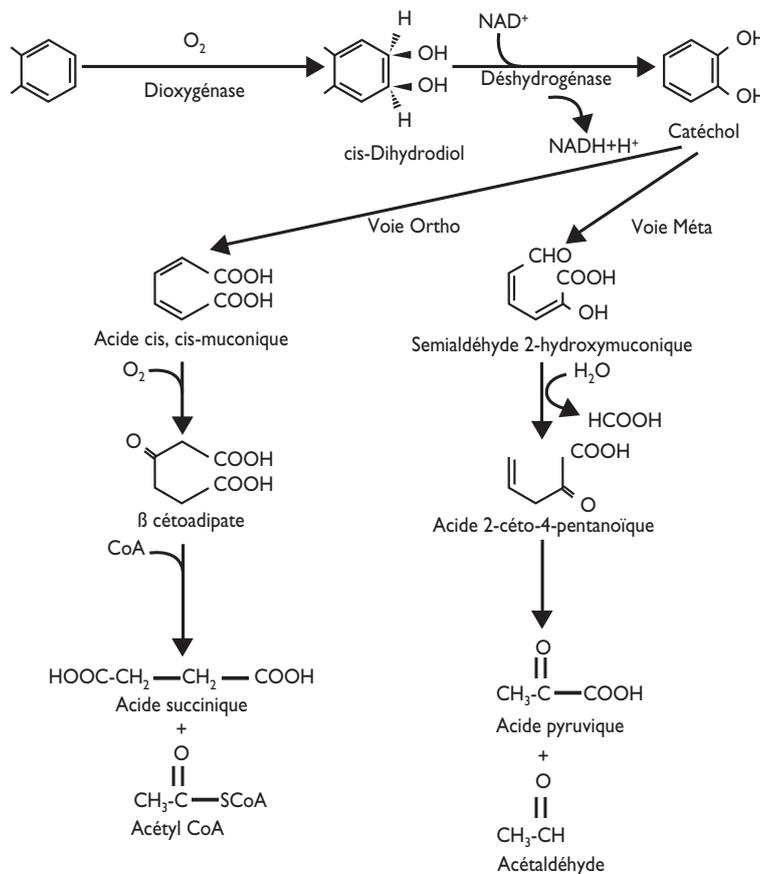


Figure 3: Métabolisme bactérien des hydrocarbures polycycliques aromatiques par clivage ortho et meta [Juhasz et Naidu, 2000].

nismes [Juhash et Naidu, 2000]. Cependant, parallèlement à cette voie majoritaire, des métabolites de type trans-dihydrodiols ont cependant été mis en évidence lors de la dégradation du naphthalène et du pyrène par *Mycobacterium sp.*, suggérant l'intervention de monooxygénases à cytochrome P450 [Kelley et al., 1991].

Alors que les exemples de dégradation des HPAs de faible poids moléculaire sont nombreux, les HPAs de hauts poids moléculaires, de 4 cycles et plus, semblent être plus réfractaires à la biodégradation bactérienne. De manière générale, les bactéries semblent dégrader plus efficacement et plus rapidement les composés à trois cycles par rapport aux composés plus lourds [Cerniglia, 1992; Juhash et Naidu, 2000]. La raison invoquée est que l'attaque des HPAs les plus lourds nécessite la présence d'une source de carbone supplémentaire: cette dégradation se ferait par cométabolisme [Heitkamp et al., 1988]. Des travaux ont cependant démontré l'aptitude de plusieurs souches bactériennes à dégrader de façon limitée des HPAs de haut poids moléculaire comme unique source de carbone et d'énergie [Juhasz et al., 1997].

Récemment, les techniques moléculaires (hybridation moléculaire, approche PCR, denaturing gradient gel electrophoresis) ont été mises à profit afin de pouvoir évaluer les potentialités dégradatives des souches autochtones d'un biotope. C'est ainsi que plusieurs souches bactériennes (*Gordona*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et deux *Pseudomonas*, *Xanthomonas*) capables de dégrader le naphthalène et les HPAs de haut poids moléculaire ont été isolées par Hamann et al. [1999] grâce à l'utilisation d'une sonde correspondant à un fragment du gène *ndoB* (codant pour l'ISP α (large iron sulfur protein)) de la naphthalène-dioxygénase de *Pseudomonas putida* (PaW736).

Les champignons

Les avantages principaux des champignons par rapport aux bactéries sont leur capacité à se propager dans les sols grâce à leur mycélium et à produire des enzymes extracellulaires à large spécificité de substrats. De nombreuses études en sols ont démontré l'utilité et l'efficacité des champignons pour la bioremédiation des sols pollués par les HPAs [Haemmerli et al., 1986, Sutherland et al., 1991; Eggen et Majcherczyk, 1998; Bogan et al., 1999]. Cependant, alors que les voies de dégradation des HPAs par les bactéries ont été clairement démontrées, les connaissances sur la dégradation des HPAs par les champignons sont beaucoup plus limitées. Les champignons semblent dégrader les HPAs principalement en présence d'une autre source de carbone: les HPAs n'interviendraient pas dans la croissance mais cette attaque servirait uniquement à réduire les proprié-

tés toxiques, mutagéniques et cancérigènes de ces composés [Cerniglia et al., 1985].

Deux voies principales ont été avancées comme pouvant intervenir dans le métabolisme des HPAs par les champignons: la voie des enzymes ligninolytiques et celle des enzymes de type monooxygénase à cytochrome P450.

- la voie des enzymes ligninolytiques.

Elle concerne les champignons ligninolytiques (c'est-à-dire ayant l'aptitude à dégrader la lignine) qui appartiennent à la classe des Basidiomycètes, encore appelés « champignons de la pourriture blanche » (ou « white-rot-fungi »), en raison de l'aspect blanchâtre du résidu de dégradation de la lignine suite à leur attaque. Les genres plus couramment étudiés sont *Phanerochaete* (qui constitue le modèle pour les champignons ligninolytiques), *Pleurotus*, *Trametes* et *Bjerkandera*.

Ces champignons ont la particularité de produire, souvent en abondance, l'une et/ou l'autre de ces enzymes extracellulaires: laccase et peroxydases (dont les principaux types sont les lignine peroxydase et manganèse-dépendante peroxydase). Ces enzymes étant peu spécifiques, elles peuvent dégrader d'autres composés organiques présentant des analogies de structure avec la lignine ce qui est le cas des HPAs, tous deux possédant des cycles aromatiques dans leur structure. Dans le cas des études menées en sols, il a été prouvé que leurs activités enzymatiques extracellulaires leur confèrent un avantage certain sur les bactéries en ce qui concerne la dégradation de HPAs, ceux-ci étant peu ou pas biodisponibles puisque fortement adsorbés aux particules du sol [Field et al., 1993].

Cette voie d'oxydation, qualifiée de non spécifique, conduit à la formation de métabolites de type quinones (figure 4) [Sutherland et al., 1995].

- la voie des monooxygénases à cytochrome P450

Cette voie a souvent été attribuée aux champignons dits non ligninolytiques. Chez ces champignons, l'oxydation des HPAs fait appel à un système enzymatique intracellulaire impliquant une monooxygénase à cytochrome P 450, système connu chez les mammifères et l'Homme pour intervenir dans la dégradation des xénobiotiques [Cerniglia, 1992]. L'intervention des cytochromes a de nombreuses fois été suggérée mais de façon indirecte (utilisation d'inhibiteurs, dosage de la cytochrome P450 réductase (CPR), dosage du NADPH, détection de l'in-

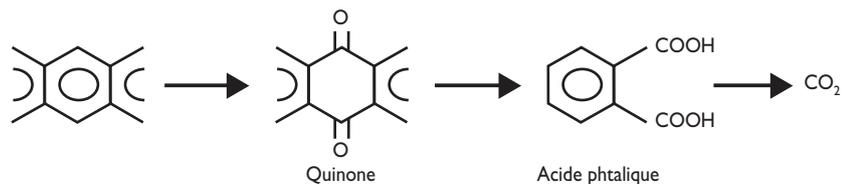


Figure 4: Oxydation des hydrocarbures polycycliques aromatiques par la voie des enzymes extracellulaires [Sutherland et al., 1995].

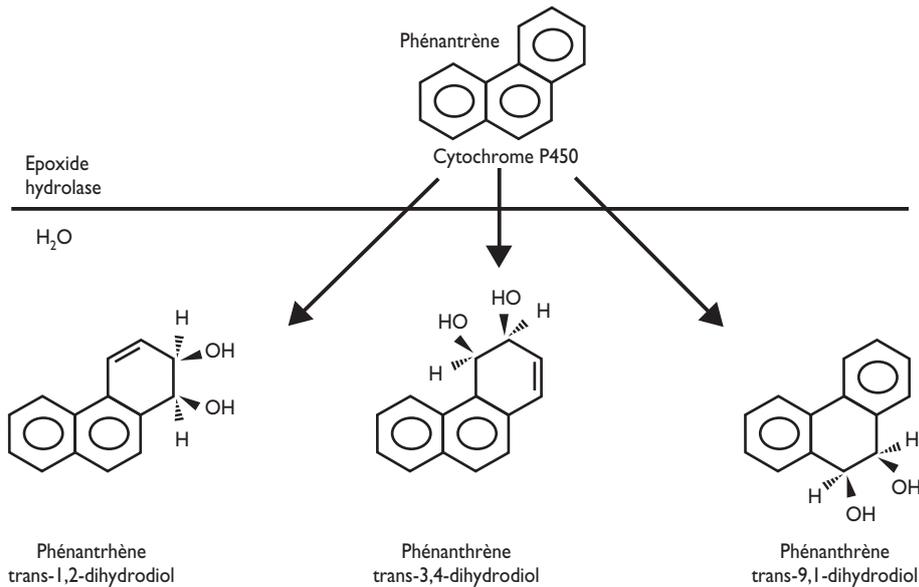


Figure 5 : Oxydation des hydrocarbures polycycliques aromatiques par la voie des monoxygénase à cytochrome P450 chez les champignons [Sutherland et al., 1995].

corporation d'oxygène marqué dans le substrat...) [Dutta et al., 1983; Ghosh et al., 1983; Rafin et al., 2000; Verdin et al., 2004a]. Des exemples de purification et de caractérisation de cytochrome P 450 n'ont été que très peu rapportés en raison de la forte instabilité et de la faible expression de cette enzyme [van den Brink, 1998]. Cette voie de dégradation régio- et stéréosélective conduit à la formation de métabolites de type trans-dihydrodiols, phénols et quinones (figure 5) [Sutherland et al., 1995].

Peu de souches fongiques autres que les champignons de la pourriture blanche ont été décrites comme capables de métaboliser les HPAs. Le champignon *Cunninghamella elegans*, appartenant à la classe des Zygomycètes, constitue le modèle d'étude pour les champignons non ligninolytiques. *Fusarium solani*, autre champignon n'appartenant pas aux « white-rot-fungi », isolé au laboratoire MPE (ULCO) à partir d'un sol pollué, a fait l'objet d'études approfondies et il a été démontré que cette souche est capable de dégrader une large gamme d'HPAs [Rafin et al., 2000; Veignie et al., 2002; Verdin et al., 2004a, 2004b].

Cependant, des zones d'ombre persistent et nécessitent d'être clarifiées :

Existe-t-il réellement un cloisonnement strict des voies de dégradation en fonction de l'organisme considéré ?

Il a été clairement démontré, *in vitro* et *in vivo* (en milieu de culture), que les enzymes ligninolytiques ont la capacité d'attaquer les HPAs. Ce système enzymatique a souvent été attribué comme unique voie de dégradation des HPAs pour les champignons ligninolytiques. Ceci a été remis en cause par Sutherland et al. [1991] et Hammel et al. [1992] qui ont démontré que dans le cas d'une étude de dégradation du phénanthrène par

Phanerochaete chrysosporium en conditions non ligninolytiques, les métabolites obtenus étaient analogues à ceux formés par les champignons du modèle *Cunninghamella elegans* (trans-dihydrodiols et phénols). Réciproquement, des champignons non-ligninolytiques produisent des cétones et quinones sans que les voies de formation ne soient élucidées [Launen, 1995]. Les travaux de Bezalel et al. [1996] et Masaphy et al. [1995, 1996] ont montré l'implication, à la fois, des enzymes ligninolytiques et des monoxygénases à cytochrome P450 dans la dégradation des

HPAs chez le champignon ligninolytique *Pleurotus* sp. Enfin, une nouvelle voie alternative de dégradation qui mettrait en jeu des formes activées de l'oxygène lorsque sont inhibées les voies classiques d'utilisation de l' H_2O_2 (peroxydases et cytochrome P450) a été décrite récemment chez *F. solani* [Veignie et al., 2004].

Intérêt des consortiums champignon-bactéries

Il est connu que les HPAs deviennent dangereux par « activation » lors de leur métabolisme : c'est-à-dire que des composés hautement réactifs, transitoires ou non, sont produits au cours de leur dégradation. Le danger est donc que la dégradation soit incomplète et aboutisse à l'accumulation de métabolites intermédiaires qui se révéleraient bien plus toxiques pour l'Homme et son environnement que le composé parent. Bien que plusieurs exemples de minéralisation des HPAs par les champignons aient été décrits, Fan et Krishnamurthy [1995] considèrent que la dégradation des HPAs par les champignons serait généralement incomplète, et une association avec des bactéries serait nécessaire pour une minéralisation totale. En effet, Field et al [1992], ont démontré que certains champignons minéralisaient l'antracène alors que d'autres accumulaient des intermédiaires de dégradation (anthraquinone) dans le milieu culture. Plusieurs travaux ont démontré l'intérêt des consortiums pour obtenir une minéralisation des polluants comme c'est le cas pour des substances polyaromatiques naturelles (ex : lignine) [Tuomela et al., 2000]. Il semblerait qu'il existe une synergie entre champignons et bactéries pour la dégradation des HPAs (l'activité extracellulaire des champignons permettant l'oxydation de l'HPA en quinones correspondantes solubles et accessibles pour les bactéries qui les minéralisent) [Field et al., 1992; Cerniglia, 1997; Kotterman et al., 1998].

Les plantes

La phytoremédiation semble également être une approche prometteuse pour la bioremédiation des sols pollués par les HPAs [Macek *et al.*, 2000; Jeffries *et al.*, 2003]. En effet, plusieurs aspects caractérisent l'intérêt des plantes pour la décontamination des sols pollués : la phytostabilisation (les polluants seraient directement immobilisés par les végétaux ou indirectement par leur présence, en limitant la dispersion de la pollution par le vent ou par l'érosion du sol [Losi *et al.*, 1994]), la phyto-dégradation (capacités dégradatives vis-à-vis de divers polluants [Reilley *et al.*, 1996]) et la phytoextraction (mise en évidence par les propriétés hyper-accumulatrices des plantes vis-à-vis des métaux lourds [Brooks, 1997]). En outre, les plantes ont l'avantage, par rapport aux microorganismes, de présenter une meilleure acceptation par l'opinion publique lors de leur utilisation pour le traitement d'un sol pollué [Macek *et al.*, 2000]. Plusieurs travaux ont montré l'effet phytotoxique des polluants organiques tels que les HPAs [Reilley *et al.*, 1996; Chaîneau *et al.*, 1997; Leyval et Binet, 1998]. Ils peuvent entraîner des diminutions du pourcentage de germination, des retards de croissance et des chutes de rendement [Leyval et Binet, 1998; Kummerova et Kmentova, 2004].

Il a cependant été démontré que la présence de plantes, et particulièrement des graminées, stimule la bioremédiation des sols : les plantes auraient d'une part un effet direct car elles ont la capacité d'accumuler dans les tissus riches lipides une large gamme de polluants organiques hydrophobes [Simmonich et Hites, 1994], et d'autre part, la dépollution serait un résultat indirect de la revégétalisation des sols contaminés [Aprill et Sims, 1990]. En effet, elle serait en grande partie due à la particularité des propriétés physico-chimiques de la rhizosphère (due à la présence des racines) et sa richesse en composés hydrosolubles (sucres, acides aminés, acides organiques, hormones, vitamines, enzymes...) exsudées par les racines qui lui permet d'accueillir un nombre de microorganismes bien plus important par rapport à un sol non rhizosphérique [Bazin *et al.*, 1990]. La présence de cette communauté fongique et bactérienne associée à la rhizosphère, bien plus importante que dans les sols nus, peut alors permettre la métabolisation des polluants de la rhizosphère [Macek *et al.*, 2000].

Parmi les microorganismes présents dans la rhizosphère, les champignons mycorhiziens procurent directement de nombreux avantages à la plante : ils lui assurent non seulement un meilleur apport nutritif, mais lui permettent également de mieux résister aux stress, qu'ils soient hydriques, nutritifs ou dus à la présence de pathogènes et de pollutions [Smith et Read, 1997]. Plusieurs travaux ont montré que les champignons mycorhiziens procurent aux plantes une tolérance vis à vis de nombreux polluants dont les HPAs [Leyval et Binet, 1998; Joner et Leyval, 2001]. Cette résistance accrue au stress

pourrait s'expliquer par l'atténuation du déficit en phosphore [Joner et Leyval, 2001], en eau [Sanchez-Diaz and Honrubia, 1994] ou encore en stimulant la production d'enzymes oxydatives telles que les peroxygénases, les peroxydases ou les cytochromes P450 [Salzer *et al.*, 1999, Criquet *et al.*, 2000].

De nombreux travaux ont montré la capacité des champignons ectomycorhiziens à dégrader les polluants organiques comme par exemple l'atrazine, le TNT, le 2,4-dichlorophénol, le trichloroéthylène [Donnelly *et al.*, 1993 et 1994; Meharg *et al.*, 1997a et 1997b] et les HPAs [Braun-Lulleman *et al.*, 1999]. Les données concernant la détoxification des HPAs par les plantes mycorhizées par des champignons endomycorhiziens sont moins nombreuses [Binet *et al.*, 2000 et 2001; Joner et Leyval, 2001].

La capacité des plantes mycorhizées à croître efficacement sur des sols pollués par les HPAs et à diminuer le stock de polluants a ainsi été avancée. Les associations mycorhiziennes contribuent activement à la diminution de la concentration des HPAs dans la rhizosphère, vraisemblablement en stimulant la microflore associée [Binet *et al.*, 2000; Cunningham *et al.*, 1996; Günther *et al.*, 1996; Joner et Leyval, 2001; Macek *et al.*, 2000]. Il faut cependant noter que les résultats obtenus indiquent que le phénomène n'est pas généralisable à toutes les plantes et tous les champignons mycorhiziens, et dépend également du type de polluant [Jeffries *et al.*, 2003; Macek *et al.*, 2000]. Les mécanismes impliqués et les rôles exacts des microorganismes restent encore à approfondir. La compréhension des relations sol-plantes-microorganismes ainsi que l'étude des mécanismes enzymatiques impliqués dans la transformation et/ou la dégradation des HPAs devrait permettre d'optimiser les techniques de phytoremédiation.

CONCLUSION

La réussite de la méthode biologique de dépollution réside non seulement dans le choix de l'agent biologique mais également dans la maîtrise des conditions physico-chimiques du sol qui permettront son bon développement (tableau I).

La présence de l'accepteur d'électrons adéquat est nécessaire. En effet, les mécanismes entrant en jeu dans la dégradation des xénobiotiques sont de type oxydo-réduction (les molécules de polluants sont oxydées et libèrent des électrons qui doivent être récupérés par des accepteurs d'électrons), l'énergie issue de ces transferts électroniques permettant la croissance et la multiplication des organismes.

De plus, le pH doit être proche de 7, la température doit être optimale (proche de 25 °C), un taux d'humidité compris entre 25 à 85 % est requis, il ne doit pas y avoir de produits toxiques, le sol doit être suffisamment perméable (les sols peu perméables ne permettent pas une bonne répartition des produits injectés (nutriments,

Tableau I : Conditions environnementales affectant la dégradation des contaminants organiques dans les sols [Sims et al., 1990]

Paramètres	Conditions requises pour l'activité microbienne	Valeurs optimales pour la dégradation des HAPs
Humidité pH	25 à 90 % de la capacité de rétention en eau 5 à 9	30 à 90 % 7 - 8
Potentiel d'oxydoréduction	Aérobies et anaérobies facultatives > 50 mV Anaérobies < 50 mV	
Teneur en oxygène	En conditions aérobies: minimum de 10 % En conditions anaérobies: < 1% par volume	10 à 40 % O ₂
Teneur en nutriments	Azote et phosphore Carbone (C): Azote (N): Phosphore (P) 120: 10: 1	C: P: N 48000: 60: 1 Concentration en sel < 4%
Température	15 - 45 °C	De 20 à 30 °C

oxygène, eau...), et une perméabilité inférieure à 10⁻⁶ m/s devient critique). Par ailleurs, il faut être sûr qu'il n'y aura pas développement de micro-organismes antagonistes ou dangereux pour l'environnement.

L'utilisation d'une méthode biologique demeure sans conteste avantageuse d'un point de vue économique mais possède certaines limites (valable pour des gros volumes de sol faiblement contaminé dont la rapidité de traitement n'est pas une priorité).

Les techniques de dépollutions peuvent être mises en œuvre, selon le lieu où doit s'effectuer la dépollution, soit *in situ*, c'est-à-dire sans excavation des sols (bioventing, biosparging), soit sur site après excavation et préparation d'une aire étanche de traitement ou mise en route d'unités de traitement mobile (andains, biopiles, landfarming), soit hors site, en raison d'un risque pour le voisinage ou d'un besoin immédiat du site, dans des unités de traitement ou de stockage de grande capacité (bioréacteur) [Lecomte, 1998]. Le traitement *in situ*, s'il est plus facile d'application puisqu'il ne nécessite pas de transport des sols et permet de traiter des zones difficilement accessibles, peut se révéler plus délicat en ce qui concerne le suivi de la dépollution et l'ajout de nutriments, d'oxygène ou de biomasse. Et très souvent, le couplage avec d'autres techniques physiques ou chimiques complète la biodégradation et permet d'atteindre un bon rendement de dépollution à des coûts et des délais modestes.

Anthony Verdin, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui* & Roger Durand

Laboratoire de mycologie/phytopathologie/environnement, Université du Littoral-Côte d'Opale - 17, avenue Blériot - BP 699 - 62228 Calais Cedex

*Correspondance Tél. : 03-21-34-81-95; Fax : 03-21-34-71-13; e-mail: lounes@univ-littoral.fr

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier la Région Nord-Pas de Calais qui a financé ce travail.

Bibliographie

Aprill W. et Sims R.C. (1990) *Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydro-*

carbon treatment in soil. Chemosphere 20, 253-265.

Bazin M.J., Markham P., Scott E.M. et Lynch J.-M. (1990) *Population dynamics and rhizosphere interactions* pp 99-127. In Lynch J.-M. (eds) *The rhizosphere*, Wiley-Interscience Publication, Chichester, England.

Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C.E. (1996) *Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white-rot fungus Pleurotus ostreatus.* Appl. Environ. Microbiol., 62, 292-295.

Binet P., Portal J.-M., Leyval C. (2000) *Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass.* Soil Bio. Biochem. 32, 2011-2017.

Binet P., Portal J.M., Leyval C. (2001) *Application of GC-MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass.* Organic Geochem. 32, 217-222.

Bogan B.W., Lamar R.T., Burgos W.D. et Tien M. (1999) *Extent of humification of anthracene, fluoranthene and benzo(a)pyrene by Phanerochaete chrysosporium during growth in PAH-contaminated soils.* Lett. in Appl. Microbiol. 28, 250-254.

Braun-Lülleman A., Hüttermann A. et Majcherzyk A. (1999) *Screening of ectomycorrhizal fungi for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 127-132.

Brooks R.R. (1997) *Plant hyperaccumulators of metals and their role in metal exploration, archaeology, and land reclamation.* In: Iskandar I.K., Adriano D.C. (eds) *Remediation of metal-contaminated soils.* Science Reviews Northwood, UK, pp 123-133.

Cerniglia C.E. (1992) *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.* Biodegradation 3, 351-368.

Cerniglia C.E. (1993) *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.* Curr. Opin. Biotechnol. 4, 331-338.

Cerniglia C.E. (1997) *Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation.* J. Indust. Microbiol. Biotechnol. 19, 324-333.

Cerniglia C.E., White G.L. et Heflich

R.H. (1985) *Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons.* Arch. Microbiol. 143, 105-110.

Chaîneau C.H., Morel J.-L. et Oudot J. (1997) *Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons.* J. Environ. Qual. 26, 1478-1483.

Criquet S., Joner E.J., Léglize P. et Leyval C. (2000) *Effects of anthracene and mycorrhiza on the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of Lucerne (Medicago sativa L.).* Biotechnol. Lett. 22, 1733-1737.

Cunningham S.D., Anderson T., Schwab A.P. and Hsu F.C. (1996) *Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants.* Adv. Agron. 56, 55-114.

Donnelly P.K., Entry J.A. et Crawford D.L. (1993) *Degradation of atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by mycorrhizal fungi at three nitrogen concentrations in vitro.* Appl. Environ. Microbiol. 59, 2642-2647.

Donnelly P.K. et Fletcher J.-S. (1994) *Potential use of mycorrhizal fungi as bioremediation agents.* In: *Bioremediation Through Rhizosphere Technology*, eds Anderson T.A. et Coats J.-R., pp 93-99, Washington DC: American Chemical Society.

Dutta D., Ghosh D.K., Mishra A.K. et Samanta T.B. (1983) *Induction of a benzo[a]pyrene hydroxylase in Aspergillus ochraceus TS: Evidence for multiple forms of cytochrome P450.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 692-699.

Eggen T. et Majcherzyk A. (1998) *Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils by the white-rot fungus Pleurotus ostreatus.* Int. Biodeter. Biodegr. 41, 111-117.

Fan C.Y. et Krishnamurthy S. (1995) *Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils: a brief review.* J. Air Waste Manag. Ass. 45, 453-460.

Field J.-M., de Jong E., Costa G. F et de Bont J.A.M. (1992) *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi.* Appl. Environ. Microbiol. 58, 2219-2236.

Field J.-M., de Jong E., Costa G. F et de Bont J.A.M. (1993) *Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics.* Tib. Tech. 11, 44-49.

Ghosh D.K., Dutta D., Samanta T.B. et Mishra A.K. (1983) *Microsomal benzo[a]pyrene hydroxylase in Aspergillus ochraceus TS: Assay and characterization of the enzyme system.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 113, 497-505.

Günther T., Dornberger U. et Fritsche W. (1996) *Effect of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil.* Chemosphere 33, 203-215.

Haemmerli S.D., Mattis S.A.L., Sanglard W., Fiechter A. (1986) *Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of Phanerochaete chrysosporium.* J. Biol. Chem. 261, 6900-6903.

- Hamman C., Hegemann J. et Hildebrandt A. (1999) Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 255-263.
- Hammel K.E., Gai W.Z. et Green B (1992) Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1832-1838.
- Heitkamp M.A., Franklin W. et Cerniglia C.E. (1988) Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2556-2565.
- Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K., Barea J.-M. (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi is sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fert. Soils* 37, 1-16.
- Joner E.J. et Leyval C. (2001) Arbuscular mycorrhizal influence on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* 10, 155-159.
- Juhasz A.L., Britz M.L. et Stanley G.A. (1997) Degradation of pyrene, benz(a)anthracene and dibenz(a,h)anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J. Appl. Microbiol.* 83, 189-198.
- Juhasz, A., Naidu, R., (2000) Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeter. Biodegr.* 45, 57-88.
- Kelley I., Freeman J.-P. et Cerniglia C.E. (1991) Identification of metabolites from the degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. *Biodegradation*. 1, 283-290.
- Kotterman M.J.J., Vis E.H. et Field J.A. (1998) Successive mineralization and detoxification of benzo(a)pyrene by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOSS5 and indigenous microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2853-2858.
- Kummerova M. et Kmentova E. (2004) Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. *Chemosphere* 56, 387-393.
- Launen L., Pinto L., Wiebe C., Kiehlmann E. et Moore M. (1995) The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. *Can. J. Microbiol.* 41, 477-488.
- Lecomte P. (1998) Les sites pollués: traitement des sols et des eaux souterraines, deuxième édition, Technique & Documentation, Lavoisier, Paris.
- Leyval C. et Binet P. (1998). Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular mycorrhizal plants. *J. Environ. Qual.* 27, 402-407.
- Lindquist B. et Warshawsky D. (1985) Identification of the 11, 12-dihydroxy-benzo(a)pyrene as a major metabolite produced by the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 130, 71-75.
- Losi M.E., Amrhein C., et Frankenberger W.T. (1994) Bioremediation of chromate contaminated groundwater by reduction and precipitation in surface soils. *J. Environ. Qual.* 23, 1141-1150.
- Macek T., Mackova M. et Kas J. (2000) Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol. Adv.* 18, 23-34.
- Masaphy S., Levanon D., Henis Y., Venkateswarlu K., Kelly S.L. (1995) Microsomal and cytosolic cytochrome P450 mediated benzo(a)pyrene hydroxylation in *Pleurotus pulmonaris*. *Biotechnol. Lett.* 9, 969-974.
- Masaphy S., Levanon D., Henis Y., Venkateswarlu K., Kelly S.L. (1996) Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo(a)pyrene hydroxylation in the white-rot-fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Lett.* 135, 51-55.
- Meharg A.A., Cairney J.W.G. et Maguire N. (1997a) Mineralization of 2,4-dichlorophenol by ectomycorrhizal fungi in axenic culture and in symbiosis with pine. *Chemosphere* 34, 2495-2504.
- Meharg A.A., Dennis G.R. et Cairney J.W.G. (1997b) Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by ectomycorrhizal basidiomycetes. *Chemosphere* 35, 513-521.
- Rafin C., Potin O., Veignie E., Lounès-Hadj-Sahraoui A., and Sancholle M. (2000) Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white-rot fungus *Fusarium solani*. *Polycyclic Aromatic Comp.* 21, 311-329.
- Reilly KA, Banks MK, Schwab AP. (1996) Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J. Environ. Qual.* 25, 212-219.
- Sanchez-Diaz M. et Honrubia M. (1994) Water relations and alleviation of drought stress in mycorrhizal plants. In: Gianinazzi S., Schüepp H. (eds) *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser, Basel, Switzerland, pp 167-178.
- Salzer P., Corbere H. et Bollet T. (1999) Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* 208, 319-325.
- Sims J.-L., Sims R.C. et Matthews J.E. (1990) Approach to remediation of contaminated soil. *Haz. Waste Haz. Mat.* 7: 117-149.
- Simmonich S.L. et Hites R.A. (1994) Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 28, 939-943
- Smith S.E. et Read D.J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. San Diego: Academic Press.
- Sutherland J.-B., Selby A.L., Freeman J.-P., Fu P.P., Evans F.E. et Cerniglia C.E. (1991) Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3310-3316.
- Sutherland J.B., Rafii F., Khan A.A. et Cerniglia C.E. (1995) Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation (pp 269-306) In *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals* Wiley-Liss, Inc.
- Tuomela M., Vikman M., Hatakka A. et Itävaara M. (2000) Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Biores. Technol.* 72, 169-183.
- Van den Brink N.J.M., vanGorcum R.F.M., Punt P.J. (1998) Cytochrome P450 enzyme in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 23, 1-17.
- Veignie E., Rafin C., Woisel P. et Cazier F. (2004) Preliminary evidence of the role of hydrogen peroxide in the degradation of benzo[a]pyrene by a non-white rot fungus *Fusarium solani*. *Environ Pollut* 129, 1-4.
- Veignie E., Rafin C., Woisel P., Lounès-Hadj-Sahraoui A. et Cazier F. (2002) Metabolization of the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene by a non-white rot fungus (*Fusarium solani*) in a batch reactor. *Polycyclic Aromatic Comp.* 22, 87-97.
- Verdin A., Lounès-Hadj-Sahraoui A., et Durand R. (2004a) Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int. Biodeter. Biodegr.* 53, 65-70.
- Verdin A., Lounès-Hadj-Sahraoui A., Newsam R., Robinson G. et Durand R. (2004b) Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environ. Pollut.*, sous-pression.