

N° d'ordre : 2438

THESE

présentée

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : Transfert, Dynamique des Fluides, Energétique et Procédés

Spécialité : Science des Agroressources

Par

Mireille VILA

Utilisation de plantes agronomiques et lacustres dans la dépollution des sols contaminés par le RDX et le TNT : approches en laboratoire

Soutenue le 15 décembre 2006 devant le jury composé de :

Pinelli E. Professeur ENSA, Toulouse	Président
Laurent F. Chargé de recherche INRA, Toulouse	Directeur de thèse
Gullner G. Directeur de recherche Plant Protection Institute, Budapest	Rapporteur
Mougin C. Directeur de recherche INRA, Versailles	Rapporteur
Bouniols A. Directrice de recherche INRA, Toulouse	Membre
Denaix L. Chargée de recherche INRA, Bordeaux	Membre

N° d'ordre : 2438

THESE

présentée

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : Transfert, Dynamique des Fluides, Energétique et Procédés

Spécialité : Science des Agroressources

Par

Mireille VILA

Utilisation de plantes agronomiques et lacustres dans la dépollution des sols contaminés par le RDX et le TNT : approches en laboratoire

Soutenue le 15 décembre 2006 devant le jury composé de :

Pinelli E. Professeur ENSA, Toulouse	Président
Laurent F. Chargé de recherche INRA, Toulouse	Directeur de thèse
Gullner G. Directeur de recherche Plant Protection Institute, Budapest	Rapporteur
Mougin C. Directeur de recherche INRA, Versailles	Rapporteur
Bouniols A. Directrice de recherche INRA, Toulouse	Membre
Denaix L. Chargée de recherche INRA, Bordeaux	Membre

"Une mauvaise herbe est une plante dont on n'a pas encore trouvé les vertus."

Ralph Waldo Emerson

à Laurent,

à ma famille.

REMERCIEMENTS

Je remercie très sincèrement Monsieur Jacques Tulliez et Monsieur Jean-Pierre Cravedi de m'avoir accueillie dans le laboratoire des Xénobiotiques ainsi que pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ce travail.

J'adresse ma profonde gratitude à l'ensemble des membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail,

Monsieur Christian Mougin et Monsieur Gábor Gullner pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail,

Madame Andrée Bouniols, Madame Laurence Denaix, Monsieur François Laurent et Monsieur Eric Pinelli pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je remercie la Délégation Générale de l'Armement pour avoir financé cette étude ainsi que la SNPE pour leur participation aux études sur le terrain.

Il me faut aussi remercier Monsieur François Laurent, pour la confiance qu'il m'a témoignée en me proposant ce sujet de thèse et en me laissant une grande autonomie dans le travail.

Je remercie également Madame Sophie Lorber pour sa bonne humeur et son soutien quotidien ainsi que Monsieur Alain Paris pour ses précieux conseils pour la rédaction.

Un grand merci à Cécile Canlet pour son amitié mais aussi pour m'avoir initiée à la RMN et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée dans la réalisation de ce travail.

Je remercie profondément Estelle Rathahao, Flore Darrieux, Sabrina Despoux et Laurent Debrauwer pour leur gentillesse et pour la persévérance dont ils ont fait preuve pour l'identification des métabolites du TNT et pour le dosage des explosifs dans les plantes.

Je tiens également à remercier vivement les personnes m'entourant au laboratoire qui m'ont permis de passer des moments très agréables et très enrichissants : Delphine pour ses encouragements et ses lectures avisées, Roselyne pour sa gentillesse et son aide précieuse pour les cultures cellulaires et la mise en forme de ce travail, Jérôme et Florence B. pour nos discussions enflammées, Florence V. pour sa sympathie et l'intérêt dont elle a fait preuve pour la suite et enfin Jean-Philippe pour son humour particulier et ses conseils de professionnel en écotoxicologie. Je tiens aussi à remercier Séverine Mehier pour sa collaboration dans les tests de phytotoxicité et mes nouveaux collègues de bureau, Georges et Sylvie, pour leur sympathie et leur soutien. Enfin, je n'oublie pas toutes les autres personnes qui par leur disponibilité, leur amitié et leur joie de vivre m'ont soutenue durant ces années. L'ambiance sympathique qu'ils ont su créer a participé au bon déroulement de cette thèse.

Enfin, j'adresse mes plus profonds remerciements à Laurent, mes parents, mes frères et mes grands-parents pour m'avoir toujours soutenue et encouragée.

PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES A COMITE DE LECTURE

Vila M, Pascal-Lorber S, Rathahao E, Debrauwer L, Canlet C, and Laurent F (2005) Metabolism of [¹⁴C]-2,4,6-trinitrotoluene in tobacco cell suspension cultures. *Environmental Science and Technology* 39, 663-672.

Vila M, Mehier S, Pascal-Lorber S and Laurent F. Phytotoxicity to and uptake of RDX by rice. *Environmental Pollution*, sous presse.

Vila M, Pascal-Lorber S and Laurent F. Fate of RDX and TNT in agronomic plants. *Environmental Pollution*, acceptée.

Vila M, Pascal-Lorber S and Laurent F. Phytotoxicity to and uptake of TNT by rice. *Environmental Geochemistry and Health*, soumise.

POSTERS PRESENTES DANS DES COLLOQUES INTERNATIONAUX

29 août-1^{er} septembre 2004, Bordeaux

M. Vila, S. Pascal-Lorber, E. Rathahao, L. Debrauwer, C. Canlet, and F. Laurent.

Conférence du FECS (Federation of European Chemical Societies) et de la SFC (Société Française de Chimie) sur "Behaviour of Chemicals in the environment".

"Metabolism of [¹⁴C]-2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in tobacco cell suspension cultures and uptake in various crops."

27-29 Octobre 2005, Pulawy (Pologne)

M. Vila, S. Mehier, S. Pascal-Lorber and F. Laurent.

International Workshop "Current developments in remediation of contaminated lands".

"RDX phytotoxicity to and uptake by rice."

11 au 13 septembre 2006, Séville (Espagne)

M. Vila, S. Pascal-Lorber and F. Laurent.

4th International Workshop "Bioavailability of Pollutants and Soil Remediation".

"Phytoremediation of explosives using crop plants."

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
<hr/>	
I/ Rappels bibliographiques	6
<hr/>	
I.1 La phyto-dépollution des polluants organiques	6
I.1.1 Contamination des sols par les polluants organiques et méthodes de dépollution	6
I.1.2 La phyto-dépollution	9
I.1.2.1 Principes de la phyto-dépollution	9
I.1.2.2 Mécanismes de phyto-dépollution	10
I.1.2.3 Facteurs affectant la phyto-dépollution	16
I.1.2.4 Avantages et inconvénients de la phyto-dépollution	23
I.1.2.5 Conclusions économiques de la phyto-dépollution	25
I.2 Cas du RDX et du TNT	27
I.2.1 Le RDX, le TNT et origine de leur pollution	27
I.2.2 Toxicité des explosifs	31
I.2.2.1 Le RDX	32
I.2.2.2 Le TNT	35
I.2.3 Bio-dépollution des explosifs	37
I.2.3.1 Procédés de bio-dépollution	37
I.2.3.2 Biodégradation du RDX	38
I.2.3.3 Biodégradation du TNT	40
I.2.4 Phyto-dépollution des explosifs	42
I.2.4.1 Absorption, transfert et métabolisme du RDX	43
I.2.4.2 Absorption, transfert et métabolisme du TNT	47
I.2.4.3 Utilisation de plantes transgéniques	52

II/ Absorption et transfert des explosifs chez les plantes agronomiques	53
II.1 Phytotoxicité et transfert du RDX et du TNT chez le riz	53
II.2 Absorption et transfert des explosifs chez des plantes agronomiques	56
II.3 Discussion	57
Publication 1 : Vila M, Mehier S, Pascal-Lorber S and Laurent F. Phytotoxicity to and uptake of RDX by rice. <i>Environmental Pollution</i> , sous presse	
Publication 2 : Vila M, Pascal-Lorber S and Laurent F. Phytotoxicity to and uptake of TNT by rice. <i>Environmental Geochemistry and Health</i> , soumise	
Publication 3 : Vila M, Pascal-Lorber S and Laurent F. Fate of RDX and TNT in agronomic plants. <i>Environmental Pollution</i> , acceptée.	
III/ Absorption et transfert des explosifs chez les plantes hélophytes	61
III.1 Absorption du RDX par les plantes lacustres	61
III.1.1 Méthodes et conditions de culture	62
III.1.2 Résultats et discussion	62
III.2 Cinétique d'absorption et de transfert des explosifs chez les plantes lacustres	65
III.2.1 Protocole expérimental	65
III.2.2 Cinétique d'absorption du RDX	66
III.2.3 Cinétique d'absorption du TNT	67
III.2.4 Discussion	68
III.3 Cinétique d'absorption du RDX chez la canne de Provence	69
III.3.1 Protocole expérimental	70
III.3.2 Résultats et discussion	70
III.4 Optimisation de l'absorption du RDX par le riz en fonction du stade de croissance	72
III.4.1 Protocole expérimental	72
III.4.2 Résultats et discussion	73
III.5 Discussion	75

IV/ Métabolisme des explosifs par des cultures cellulaires végétales	77
IV.1 Métabolisme du TNT chez les cellules de tabac	78
IV.1.1 Identification des métabolites principaux	78
IV.1.2 Inactivation des métabolites primaires du TNT dans les cellules de tabac	80
IV.2 Métabolisme du RDX chez les cellules de tabac	83
IV.3 Discussion	86
Publication 4 : Vila M, Pascal-Lorber S, Rathahao E, Debrauwer L, Canlet C, and Laurent F (2005) Metabolism of [¹⁴ C]-2,4,6-trinitrotoluene in tobacco cell suspension cultures. <i>Environmental Science and Technology</i> 39, 663-672	
V/ Cas d'un site pollué	89
V.1 Observations du site	90
V.2 Dosage du TNT et du RDX retrouvés dans les plantes récoltées sur le site	92
V.2.1 Protocole d'extraction et de purification des échantillons récoltés sur le site	93
V.2.2 Méthode de dosage en LC/MS-MS	93
V.2.3 Dosage des échantillons récoltés sur le site	96
V.3 Expérimentations en laboratoire avec des sédiments recueillis sur le site	98
V.3.1 Dosage des explosifs présents dans les sédiments	99
V.3.2 Biodisponibilité des explosifs dans les sédiments	100
V.3.3 Test de phytotoxicité des sédiments	101
V.4 Discussion	103
Discussion générale	104
Conclusion et perspectives	107
Références	111

LISTE DES FIGURES

Chapitre I – Rappels bibliographiques

Figure I.1. Principaux mécanismes de phyto-dépollution : phyto-extraction, phyto-dégradation, phyto-stabilisation et rhizo-dégradation.

Figure I.2. Métabolisme des xénobiotiques chez la plante : concept du "green liver" (d'après Sandermann, 1992).

Figure I.3. Dynamique des xénobiotiques dans le système sol-plante, influence des différents facteurs.

Figure I.4. Prédications du devenir des composés organiques en fonction de la loi de Briggs *et al.* (1982).

Figure I.5. Relation entre l'absorption racinaire après 24 h en solution hydroponique (exprimée par le RCF) et le log K_{ow} de différents composés : o, *O*-methylcarbamoyloximes et x, phenylurées substituées (d'après Briggs *et al.*, 1982).

Figure I.6. Schéma d'une coupe transversale de racine de blé montrant les voies possibles de mouvement des composés solubles (d'après Mc Farlane, 1995).

Figure I.7. Relation entre le log K_{ow} et la translocation des composés chimiques chez le persil (exprimée par le TSCF) : o, *O*-methylcarbamoyloximes et x, phénylurées substituées (d'après Bromilow and Chamberlain, 1995).

Figure I.8. Structure chimique des explosifs.

Figure I.9. Synthèse de TNT par nitration du toluène (d'après Humphrey and Smoak, 1960).

Figure I.10. Principales voies de biodégradation du RDX en conditions anaérobies (d'après Hawari *et al.*, 2000).

Figure I.11. Principales voies de biodégradation du TNT en conditions aérobies (d'après Esteve-Núñez *et al.*, 2001).

Figure I.12. Formation du TNB et du DNA par transformation par photolyse puis réduction biologique (d'après Rivera *et al.*, 1998).

Chapitre III – Absorption, transfert des explosifs chez les plantes héliophytes

Figure III.1. Absorption et transfert du RDX dans les parties aériennes et les racines de chaque plante cultivée durant 8 semaines sur des sols reconstitués contaminés à 500 mg/kg, (a) en concentrations de RDX (mg/g) ou (b) en quantités de RDX par plante (mg) et sur des sols contaminés à 1000 mg/kg, (c) en concentrations de RDX (mg/g) ou (d) en quantités de RDX par plante (mg). n=3

Figure III.2. Absorption du RDX et transfert vers les parties aériennes en fonction du temps de culture sur un sol contaminé à 1000 mg/kg. Concentration en équivalent RDX (a) chez la massette, (b) chez le scirpe lacustre et (c) chez l'iris d'eau.

Figure III.3. Absorption du TNT et transfert des résidus vers les parties aériennes en fonction du temps de culture sur un sol contaminé à 300 mg/kg. Concentrations équivalent TNT (mg/g), (a) chez la massette, (b) chez le scirpe lacustre et (c) chez l'iris d'eau.

Figure III.4. Analyse des cannes de Provence en séparant chaque feuille. (a) Photographie montrant la numérotation des feuilles d'une repousse de canne de Provence cultivée durant 8 semaines sur un sol contaminé au RDX. (b) Concentration en RDX (mg/g de poids sec) dans chaque feuille (moyenne sur les 4 temps de culture).

Figure III.5. Photographies du riz au temps 1 (gauche) et au temps 5 (droite).

Figure III.6. Absorption et transfert du RDX chez le riz en fonction du stade du repiquage dans le sol contaminé. Exprimé (a) en concentration de RDX (mg/g) et (b) en quantité de RDX pour 5 pieds (mg).

Chapitre IV – Métabolisme des explosifs par des cultures cellulaires végétales

Figure IV.1. Proposition de voies métaboliques de transformation du TNT dans les cultures cellulaires de tabac. (les hypothèses sont représentées en traits pointillés)

Figure IV.2. CLHP chromatogrammes obtenus après incubation des cellules durant 12 h avec du (a) 2-ADNT, du (b) 4-ADNT et du (c) 4-HADNT.

Figure IV.3. Voies métaboliques de transformation du TNT dans les cultures cellulaires de tabac.

Figure IV.4. CLHP Radiochromatogramme d'extrait de cellules de tabac incubées durant 5 jours avec du RDX radiomarqué.

Figure IV.5. Hypothèses d'incorporation du RDX dans les parois cellulaires.

Chapitre V – Cas d'un site pollué

Figure V.1. Vues générales de la lagune sud réalisées en juillet 2004 (gauche) et en janvier 2005 (droite), vues depuis l'émissaire.

Figure V.2. Localisation des zones A et B de prélèvement des roseaux récoltés sur le site en juillet 2005.

Figure V.3. Chromatogrammes d'ions obtenus en LC-MS/MS pour le RDX, le TNT, le 2-ADNT et le 4-ADNT. (a) Solution standard de Mix A à 0,75 ng/ μ l et (b) extrait purifié de feuille de roseau récoltée dans la zone A.

Figure V.4 Schéma représentant la lagune sud et la localisation des zones émergées et des prélèvements de sédiments (*). La numérotation des secteurs correspond à celle mise en place par LISEC pour les dosages préliminaires.

Figure V.5. Effet des différentes concentrations en sédiments sur la croissance durant 8 semaines après 1 semaine de prégermination sur sol non contaminé.

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I – Rappels bibliographiques

Tableau I.1. Principales caractéristiques physico-chimiques du RDX et du TNT (d'après Talmage et al. 1999).

Tableau I.2. Niveaux de contaminations d'explosifs retrouvés sur les installations militaires (d'après Talmage et al., 1999).

Chapitre V – Cas d'un site pollué

Tableau V.1. Fragments caractéristiques des composés étudiés en spectrométrie de masse.

Tableau V.2. Concentration en solutés calculée à partir de la courbe étalon sans matrice.

n.d. = non détectable

Tableau V.3. Dosage des solutés dans les échantillons récoltés sur le terrain.

n.d. = non détectable

LISTE DES ABREVIATIONS

2-ADNT : 2-amino-4,6-dinitrotoluène

2-HADNT : 2-hydroxylamino-4,6-dinitrotoluène

4-ADNT : 4-amino-2,6-dinitrotoluène

4-HADNT : 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluène

ADNT : aminodinitrotoluène

CL50 : concentration létale 50, concentration nécessaire pour causer la mort de 50% des individus

CLHP : chromatographie liquide haute performance

DANT : diamino-nitrotoluènes

DNA : 3,5-dinitroaniline

DNT : dinitrotoluène

DNX : hexahydro-1,3-dinitroso-5-nitro-1,3,5-triazine, dinitroso

EC50 : concentration qui produit 50% de l'effet maximal observé

HADNT : hydroxylaminodinitrotoluène

HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique

Hi : constante de la loi de Henry, définissant la volatilité d'un composé

HMX : High Melting eXplosive, octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine

K_{oc} : coefficient de partition du polluant dans la matière organique

K_d : coefficient de répartition entre le sol et l'eau

K_{ow} : coefficient de partage octanol eau

LC-MS/MS : spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide

LOEC : low observed effect concentration, la plus faible concentration induisant un effet

LOEL : low observed effect level, la plus faible dose induisant un effet

MNX : hexahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triazine, mononitroso

NOEC : no observed effect concentration, la plus forte concentration sans effet

NOEL : no observed effect level, la plus forte dose sans effet

NT : nitrotoluène

OGM : organisme génétiquement modifié

RCF : root concentration factor ou facteur de concentration racinaire

RDX : Royal Demolition eXplosive, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triamine

RMN : spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

TNB : 1,3,5-trinitrobenzène

TNT : 2,4,6-trinitrotoluène

TNX : hexahydro-1,3,5-trinitroso-1,3,5-triazine, trinitroso

TSCF : transpiration stream concentration factor ou facteur de concentration dans le courant de transpiration

US EPA : US Environmental Protection Agency

INTRODUCTION

Deux siècles d'industrialisation souvent incontrôlée, d'agriculture intensive et d'activité urbaine ont apporté quantités de friches industrielles, de dépôts de déchets, de décharges et de sols pollués dans la plupart des pays industrialisés. Les sites ayant utilisé, produit ou généré des produits dangereux ou toxiques constituent autant de lieux potentiellement pollués. Les principales catégories de polluants incluent les solvants industriels, les produits pétroliers, les métaux lourds et les pesticides. En France, un premier recensement national des sites pollués réalisé en 1994 par le ministère de l'Environnement a répertorié 669 sites contaminés. Ces sites se répartissent en trois grandes catégories : *les anciennes décharges*, qui ont été utilisées sans respecter les règles techniques actuelles et dont le sous-sol inadapté a conduit à une pollution des eaux, *les dépôts de déchets*, occasionnés par des faillites d'entreprises ou des pratiques frauduleuses d'importation ou d'élimination de déchets et, enfin, *les sols pollués* par des retombées, des infiltrations ou des déversements de substances polluantes, liés à l'exploitation d'une installation industrielle ou à un accident de transport. Le dernier recensement réalisé en 2001 fait état de 2963 sites pollués appelant une action des pouvoirs publics à titre préventif ou curatif dont environ 200 se trouvent dans la région Midi-Pyrénées. Pourtant, les professionnels de la dépollution des sols estiment à plus de 200 000 le nombre de sites potentiellement pollués en France. Les accidents, les fuites, le stockage inadapté des déchets et le traitement du matériel dangereux ont produit 217 000 sites contaminés à travers les Etats-Unis. Il existe une distinction entre la contamination du sol provenant de sources diffuses (retombées atmosphériques, pratiques agricoles) et celle causée par des sources clairement confinées (contamination locale ou ponctuelle liée à un site industriel ou un accident).

Le problème lié aux sites pollués réside dans leur impact potentiel sur l'écosystème et les organismes vivants (homme, faune, flore). Le contact avec l'homme peut se faire soit directement par ingestion d'eau soit indirectement par ingestion de végétaux ayant poussé sur des sols pollués ou ayant été irrigués par des eaux polluées. L'ingestion directe de sols contaminés peut aussi avoir lieu avec des jeunes enfants. Au-delà des atteintes sur la santé humaine, les sites pollués peuvent également perturber certaines fonctions du sol. En effet, le sol peut servir de support à l'activité humaine ou au patrimoine culturel (usage récréatif), de support économique à la production agricole ou de support à la biodiversité des écosystèmes terrestres. De plus, il est important de contrôler ces pollutions car les contaminants peuvent se disséminer et atteindre l'eau de surface par ruissellement, l'eau souterraine par infiltration et l'air par volatilisation.

Dans le droit français, il n'existe pas de loi concernant spécifiquement les sites et sols pollués. Toutefois, des textes qui peuvent s'appliquer à la pollution des sols d'origine industrielle, précisent les 3 points suivants : la politique générale de réhabilitation des sites, le principe du pollueur-payeur et la politique d'évaluation des risques. Depuis 1993, une politique spécifique de prise en compte et de traitement des sites pollués a été développée selon les principes suivants : pour les activités industrielles en cours, il faut prévenir les pollutions potentielles et pour les activités industrielles du passé, localiser et garder en mémoire des pollutions potentielles, diffuser l'information et agir pour en diminuer les risques. En 2000, les industriels représentaient 50 % à 55% des donneurs d'ordre acteurs de la dépollution. Les opérations de dépollution engagées concernaient des sites présentant un risque pour la santé humaine et pour l'environnement, des projets de reconversion en construction immobilière, des cessations d'activité ou des accidents. En cas de défaillance du responsable du site (insolvabilité prouvée), le ministère de l'Ecologie et du Développement durable peut alors charger l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) de mettre en œuvre les actions nécessaires pour la mise en sécurité et/ou la dépollution du site.

Le choix du procédé de traitement de la pollution résulte d'une combinaison de critères : le lieu du traitement (*in-situ*, *ex-situ*), l'action à conduire (stabilisation, extraction ou dégradation) et la technique à mettre en œuvre pour y parvenir (mécanique, chimique ou biologique). Ces trois paramètres sont extrêmement liés à la nature de la reconversion du site. En effet, les niveaux de dépollution exigés ne seront pas les mêmes si le site est pressenti par exemple pour être transformé en parking ou en zone résidentielle avec dans ce cas une activité humaine potentiellement en contact avec le sol.

De nombreuses méthodes de dépollution sont à la disposition des professionnels. Les méthodes physico-chimiques comme l'incinération, l'extraction ou la photo-oxydation, sont très coûteuses, nécessitent souvent un traitement *ex-situ* des sols et peuvent produire de nouveaux déchets ou bien des gaz à effet de serre. L'excavation du sol, souvent préalable à ces traitements, est une étape limitante car elle déstructure les sols et augmente l'érosion. De plus, elle limite l'implantation ultérieure d'une activité biologique en raison de la suppression de la terre arable qui contient les éléments nutritifs essentiels aux végétaux. Les alternatives récentes aux méthodes classiques de dépollution des sols font appel à des processus biologiques. En effet, les micro-organismes et les plantes sont envisagés pour décontaminer de nombreux types de pollution.

L'utilisation des micro-organismes serait efficace pour dégrader les polluants organiques mais la mise en œuvre de la dépollution nécessite des moyens techniques importants. De la même façon que pour les méthodes physico-chimiques, la mise en place de ces méthodes de bio-dépollution nécessite l'excavation des sols et leur traitement dans des bioréacteurs ou dans des aires de compostage. La dépollution par bioréacteurs est plus adaptée aux sols hautement contaminés nécessitant une action rapide. Le compostage des sols s'avère efficace pour de plus grandes quantités de sols mais il est difficile à mettre en œuvre car il nécessite une aération régulière des sols. Dans cet effort pour diminuer les coûts de la dépollution et les impacts négatifs sur l'environnement, les traitements *in-situ* semblent être une option plus adaptée que celles présentées précédemment. Il est, en effet, possible de stimuler les micro-organismes déjà présents sur le site ou d'implanter des végétaux directement sur le site. Néanmoins, la stimulation des micro-organismes nécessite de conduire de nombreuses études préalables à cause de l'hétérogénéité de la pollution, de la répartition des micro-organismes dans le sol et de la compétition entre micro-organismes pour les différents substrats.

Les plantes peuvent aussi être utilisées pour dépolluer des sols, des étendues d'eau et des nappes phréatiques (par pompage et arrosage des plantes) contaminés par des produits organiques, des métaux lourds et des radionucléides. En effet, les plantes sont capables d'agir directement ou indirectement sur les polluants en les absorbant, en les dégradant, en améliorant leur dégradation par les micro-organismes ou encore en limitant leur dispersion dans l'environnement. De plus, la revégétalisation de sites a un impact sur l'environnement perçu positivement par l'opinion publique.

Les mécanismes biologiques impliqués dans la dépollution réalisée par les plantes, encore appelée phyto-dépollution, des différents composés organiques et de nombreux métaux lourds sont très différents. C'est la raison pour laquelle nous avons restreint notre étude aux mécanismes impliqués dans la phyto-dépollution des polluants organiques. Pour en permettre l'étude plus précise, nous avons considéré deux explosifs nitrés : l'hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) et le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT).

La production, le stockage et l'utilisation de ces explosifs à des fins militaires mais aussi civiles, ont généré une contamination des sols par les explosifs eux-mêmes mais aussi par les co-produits de fabrication ou les résidus d'explosion. De nombreux efforts sont fournis pour en contrôler la

dispersion et accélérer leur destruction en recourant à des techniques de dépollution adaptées financièrement et à faible impact sur l'environnement. Le département américain de la défense a estimé le coût de la dépollution des sites américains par des méthodes classiques entre 8 et 21 milliards de dollars. Ce coût prohibitif lié à la difficulté de mise en œuvre de ces techniques de dépollution qui entraîne en outre une quasi complète déstructuration des sols montre bien toute l'importance qu'il y a d'explorer de nouvelles voies de dépollution. L'utilisation des plantes pour dépolluer les sites contaminés par des explosifs est une technique qui présenterait de nombreux atouts, tant au plan économique qu'environnemental. Diverses études ont déjà permis d'explorer la capacité des plantes à accumuler les explosifs, à les dégrader ou même à dépolluer des sites contaminés. En revanche, elles n'ont pas encore permis d'identifier clairement les mécanismes mis en œuvre.

L'objectif général du travail présenté ci-après est d'identifier certains des mécanismes de phyto-dépollution des sols qui ont été contaminés par des explosifs nitrés (TNT et RDX) ainsi que d'optimiser le choix des plantes à utiliser. Les critères pour mesurer l'efficacité d'une plante à dépolluer des sols contaminés sont sa capacité à croître sur le sol contaminé et sa capacité à absorber de grandes quantités de polluants, voire à les dégrader. La diversité des sites pollués allant de terrains d'essai d'explosifs à des zones lagunaires en sortie d'usine, il est alors nécessaire de disposer de plantes adaptées à chaque type de sol. Nous avons donc étudié deux sortes de plantes : des plantes cultivées et des plantes adaptées aux zones lagunaires. Les premières ont l'avantage d'avoir une croissance rapide et une production de biomasse importante, elles seront a priori plus adaptées aux grandes surfaces peu polluées. Les plantes de type aquatique sont privilégiées dans les zones lagunaires. Parmi ces plantes, le riz a été retenu car c'est une des rares plantes cultivée adaptée aux sols de type lagunaire. Si les expérimentations visant à tester la phytotoxicité des explosifs n'ont été réalisées que sur le riz, celles consistant à mesurer l'efficacité d'absorption et de transfert des explosifs ont été conduites chez toutes les plantes considérées dans cette étude (plantes cultivées et lacustres).

L'étude du métabolisme permettant de déterminer le devenir d'un polluant chez les plantes a été menée de façon approfondie. En effet, certains polluants peuvent rester inchangés dans la plante ou bien être transformés en produits plus ou moins toxiques et stockés. Ils sont dans la plupart

des cas biodisponibles pour les animaux ou les consommateurs qui les ingèrent. En cas de mort de la plante, ils peuvent également représenter un risque environnemental important. L'étude du devenir des polluants après absorption par la plante reste donc une étape cruciale pour la mise en place et le contrôle de la phyto-dépollution sur des sites contaminés dans le but d'éviter une dispersion dans l'environnement et une contamination des chaînes alimentaires. La connaissance précise de la nature des résidus dans la plante (produit parent, résidus solubles ou résidus liés à la paroi) est également un élément déterminant d'appréciation de l'efficacité d'un système de phyto-dépollution. A titre de modèle, nous avons utilisé des cultures de cellules de tabac en suspension pour étudier le métabolisme de ces deux explosifs et connaître leurs voies de biotransformations.

Enfin, nous avons réalisé une étude sur un site contaminé par des explosifs. Une première étape a permis d'observer la végétation du site ainsi que son implantation. Nous avons récolté des plantes dans différentes zones et à différentes périodes de l'année afin de doser, en spectrométrie de masse, les explosifs et les métabolites majeurs présents dans les différentes parties de ces plantes. Dans une seconde étape, nous avons analysé les sédiments recueillis sur le site pour déterminer les quantités d'explosifs encore présents puis des tests ont été réalisés afin d'évaluer la toxicité de ces sédiments sur des cultures de riz.

CHAPITRE I

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1 La phyto-dépollution des polluants organiques

I.1.1 Contamination des sols par les polluants organiques et méthodes de dépollution

En France, en 2001, 2963 sites ont été répertoriés comme nécessitant une action de dépollution (Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable : www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr). Aux Etats-Unis, 217 000 sites étaient contaminés à travers le pays en 1996 (USEPA). Un site pollué est un site qui, du fait d'anciens dépôts de déchets ou l'infiltration de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pour les personnes ou l'environnement. Cette pollution peut être liée à des composés organiques, minéraux ou à des radionucléides. La présence dans l'environnement de composés organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les explosifs, les pesticides ou les produits pharmaceutiques peut avoir plusieurs origines. Cette pollution est principalement due à des activités humaines telles que les activités agricoles : fertilisants, engrais, produits phytosanitaires, lisiers ; et les activités industrielles : rejets atmosphériques, accidents industriels, dépôts illégaux de déchets ou de produits chimiques, déchets industriels. Il est difficile de quantifier ce type de pollution car ces produits peuvent être présents sur de nombreux sites. D'autre part, cette pollution est différente en fonction de son origine, elle peut être ponctuelle dans le cas d'un rejet contrôlé de déchets industriels ou bien diffuse comme dans le cas d'une utilisation excessive de pesticides dans l'agriculture. La présence indue de ces composés peut générer un risque pour l'environnement et/ou pour l'homme. Pour évaluer ce risque, il faut prendre en compte i) le danger que représentent les polluants environnementaux, c'est à dire leur toxicité ou leur écotoxicité et ii) l'exposition, correspondant à la probabilité pour cet agent polluant de contaminer un organisme ou un écosystème. Les sources principales de contamination pour l'homme sont l'ingestion d'eau ou de particules de sol polluées, l'inhalation de poussières et l'ingestion de végétaux contaminés. Il est donc indispensable de prendre en compte cette notion d'utilisation future du site pollué dans la gestion des pollutions. Si le site doit être transformé en jardin d'enfants ou en supermarché, le seuil de dépollution légal requis ne sera pas le même, il devra être très bas dans le premier cas pour limiter notamment les risques liés à l'ingestion de terre.

En France, le nombre de sites considérés comme pollués est en hausse constante car le recensement est perpétuellement mis à jour à partir des données historiques sur les anciens sites

industrialisés. Les entreprises chargées de la dépollution des sites évaluent à 200 000 le nombre de sites potentiellement pollués. En fonction de la toxicité d'un polluant et du risque qu'il représente, la dépollution du site peut devenir un enjeu majeur pour nos sociétés actuelles. De nombreuses technologies ont été développées à cet effet. Le choix de la ou des méthodes envisagées sera orienté par le niveau de dépollution à atteindre, le lieu de traitement (*in situ* ou *ex-situ*), le ou les moyens mis en œuvre (mécanique, chimique ou biologique) et parfois les moyens financiers disponibles. Les traitements classiques de dépollution de sols contaminés par des composés organiques sont basés sur des méthodes physico-chimiques : la neutralisation chimique, l'incinération, l'adsorption sur charbon actif ou sur résines, la lixiviation des sols par des solvants ou encore la photo-oxydation (UV/O₃) (Oh *et al.*, 2004). Ces méthodes diminuent les concentrations en polluants mais leur principal défaut est qu'elles ne restaurent pas les sols. Elles ont aussi un effet néfaste sur l'activité biologique et la fertilité des sols. Par exemple, la technologie la plus utilisée pour l'élimination des explosifs présents dans les sols et de leurs dérivés est l'incinération. Cette méthode conduit à la libération de gaz à effet de serre comme le CO₂ et le NO_x. De plus, les cendres de l'incinération doivent ensuite être traitées comme des déchets dangereux. Ces méthodes sont lourdes à mettre en œuvre, très coûteuses et destructrices, elles sont donc réservées à des situations d'urgence. Elles sont envisagées pour des petites zones où la pression de réutilisation est très forte ou lorsque les risques de dispersion de la pollution sont trop importants.

Les récentes technologies envisagées pour la dépollution des sols sont basées sur l'utilisation de voies biologiques, comme les micro-organismes et/ou les plantes. Ces méthodes devraient réduire nettement les coûts et les dommages pour l'environnement. De plus, elles sont parfois plus simples à mettre en place même sur de grandes surfaces. Lors d'un processus de biodépollution, les micro-organismes utilisent le polluant comme source d'énergie. La biodépollution repose ainsi sur un ensemble de techniques consistant à augmenter la biodégradation d'un polluant dans un sol, appelée aussi biotransformation (Vidali, 2001). Pour cela, il est possible d'inoculer des micro-organismes spécifiques (bio-augmentation) ou de stimuler l'activité de populations microbiennes indigènes (bio-stimulation) par apport de nutriments ou par ajustement des conditions de milieu (pH, potentiel d'oxydoréduction, humidité). Elle peut aussi être réalisée dans des bioréacteurs en contrôlant les conditions mais cela nécessite une excavation des sols. Cette dernière est néfaste pour la réhabilitation des sites car elle déstructure le sol et

favorise l'érosion en supprimant la végétation et en limitant l'activité biologique. Les souches capables de transformer ou dégrader un polluant isolées en laboratoire ne peuvent pas forcément être inoculées *in situ* et avoir la même efficacité de dégradation. En effet, en conditions non contrôlées, les conditions de culture non maîtrisées et les compétitions entre micro-organismes pour les sources d'énergie peuvent nuire au développement du micro-organisme choisi. D'autre part, la dégradation par les micro-organismes peut être incomplète et aboutir dans ce cas à des produits intermédiaires qui peuvent être eux-mêmes toxiques non seulement pour les micro-organismes, mais aussi pour les plantes et les animaux, par conséquent pour l'environnement. Cette technologie permet une diminution de la quantité du polluant responsable à l'origine de la pollution mais pas du niveau de pollution du site à cause des nouveaux contaminants introduits sur le site. La mise en place de cette technologie nécessite alors un suivi important et les méthodes *ex situ* restent très onéreuses.

Une autre biotechnologie, la phyto-dépollution, utilise les plantes pour dégrader, assimiler, métaboliser ou détoxifier des polluants de natures diverses. Les plantes peuvent agir de façon directe en absorbant le polluant ou de façon indirecte en activant sa dégradation dans la rhizosphère. Cette technologie émergente et prometteuse peut être appliquée aux métaux, aux hydrocarbures, aux pesticides, aux composés nitroaromatiques et aux solvants chlorés (Susarla *et al.*, 2002). La recherche, le développement et l'application de la phyto-dépollution ont fortement augmenté à la fin des années 1980 à cause de son faible coût, de sa polyvalence et de son image positive auprès de l'opinion publique. Cette technologie fut d'abord utilisée pour décontaminer les sols des contaminants de l'agriculture tels que les engrais et les pesticides. L'agence américaine de protection de l'environnement, US Environmental Protection Agency (US EPA) estime qu'il y a actuellement plus de 100 sites dans le monde où est utilisée la phyto-dépollution pour dépolluer divers contaminants (minéraux ou organiques).

Dans le cas où les micro-organismes ne seraient pas capables d'agir directement sur le polluant, ils peuvent agir indirectement. En effet, ils peuvent parfois dégrader certains co-produits toxiques pour les plantes qui pourraient limiter l'implantation de la phyto-dépollution. Les micro-organismes diminuent ainsi la phytotoxicité des sols ce qui permet la mise en place d'un processus de phyto-dépollution. Cette dernière pouvant améliorer en retour la croissance des micro-organismes, ces deux méthodes peuvent, dans certains cas, être interdépendantes. La bio-

et la phyto-dépollution sont des technologies très prometteuses mais elles nécessitent toutefois des études préliminaires pour déterminer leur efficacité en laboratoire mais aussi *in situ*.

I.1.2 La phyto-dépollution

I.1.2.1 Principes de la phyto-dépollution

La phyto-dépollution est une technologie de dépollution qui semble efficace pour un large spectre de polluants organiques et inorganiques. Elle peut être utilisée sur des substrats solides, liquides ou gazeux (Pilon-Smits, 2005). Les plantes peuvent être utilisées comme un filtre à air, en intérieur ou en extérieur, elles absorbent des polluants comme le NO_x, le SO₂, le CO₂, l'ozone, les mauvaises odeurs ou encore les hydrocarbures volatils halogénés (Jeffers *et al.*, 1998). Dans le cas des substrats solides ou liquides, la dépollution est envisagée pour des produits organiques (HAP, pesticides, explosifs, produits pharmaceutiques) mais aussi des métaux lourds (plomb, cuivre, zinc...) et des radionucléides.

Les végétaux ont un système racinaire très étendu qu'ils utilisent pour extraire l'eau et les minéraux du sol nécessaires à leur croissance. Lors de cette extraction, ils absorbent aussi d'autres composés dissous dans la phase aqueuse. Cette caractéristique est importante dans le processus de phyto-dépollution car les végétaux sont capables d'absorber de grandes quantités d'eau qu'ils puisent à des profondeurs de 2 à 5 mètres voire plus pour certaines plantes comme la luzerne ou les plantes phréatophytes (cf. paragraphe I.1.2.4).

Les organismes vivants sont sans cesse soumis à des contraintes environnementales. Dans le cas des végétaux, leur immobilité constitue un facteur important de pression dans leur adaptation au cours de l'évolution. Beaucoup de plantes ont développé des systèmes biochimiques pour l'adaptation aux conditions géochimiques locales mais aussi pour la modification de leur environnement direct. Elles sont capables par exemple de croître sur des sols pollués en les détoxifiant. A l'origine, cette toxicité était majoritairement due à des composés phytotoxiques synthétisés par d'autres organismes vivants, des micro-organismes ou des plantes. Les plantes ont donc utilisé leur équipement enzymatique classique pour dégrader ces composés et survivre dans ces milieux. Ces mécanismes sont aussi mis en œuvre pour les composés xénobiotiques présents dans l'environnement. Après absorption d'un polluant, les plantes peuvent soit le séquestrer dans

un compartiment cellulaire pour limiter son interaction avec le fonctionnement cellulaire normal, soit le dégrader pour le détoxiquer.

Les plantes étant des organismes photoautotrophiques, elles utilisent la photosynthèse pour fixer le dioxyde de carbone qui servira ensuite de source d'énergie et de carbone. Ainsi, elles ne dépendent pas de composés organiques pour leur survie. Elles ne possèdent sans doute pas un très large spectre d'enzymes spécialisées dans la dégradation de composés exogènes. Toutefois, lors de la détoxification des xénobiotiques, ces derniers remplacent les substrats naturels d'enzymes impliquées dans le métabolisme secondaire (Komoβα *et al.*, 1995). De rares plantes qui se développent sur des sols pauvres en nutriments semblent être capables d'utiliser des contaminants organiques en nutriments pour subsister (Meagher, 2001).

La phyto-dépollution exploite ces caractéristiques des végétaux pour diminuer la contamination du sol. Elle repose sur les capacités des plantes à extraire et transformer le contaminant du sol ou d'augmenter la participation des micro-organismes du sol dans le processus de dégradation du polluant.

I.1.2.2 Mécanismes de phyto-dépollution

Au cours d'un processus de phyto-dépollution, l'action des plantes sur le polluant intervient à différents niveaux. Les polluants peuvent être stabilisés ou dégradés dans la rhizosphère, séquestrés ou dégradés ou encore rendus volatiles et éliminés dans l'air environnant. Divers mécanismes sont mis en œuvre en fonction de la nature du polluant et de ses caractéristiques physico-chimiques. Ces mécanismes ont été largement décrits (McCutcheon et Schnoor, 2003 ; Pilon-Smits, 2005). Les classifications de ces mécanismes varient en fonction des auteurs, c'est pourquoi nous proposons un classement basé uniquement sur le devenir de la pollution. Quatre mécanismes principaux peuvent être retenus : la phyto-extraction, la phyto-transformation, la rhizo-dégradation et la phyto-stabilisation (Figure I.1). Cette classification permet de limiter la multiplication de terminologies définissant spécifiquement les différents mécanismes de la phyto-dépollution tels que la bioconcentration, la phyto-assimilation, la phyto-oxydation, la phyto-évaporation, la phyto-séquestration, la dendrorémediation (utilisation d'arbres pour la phyto-dépollution) (Schoenmuth et Pestemer, 2004) ou d'autres termes définissant plus précisément les processus comme la phytophotolyse (activation de la photolyse par l'absorption par la plante) (Just et Schnoor, 2004).

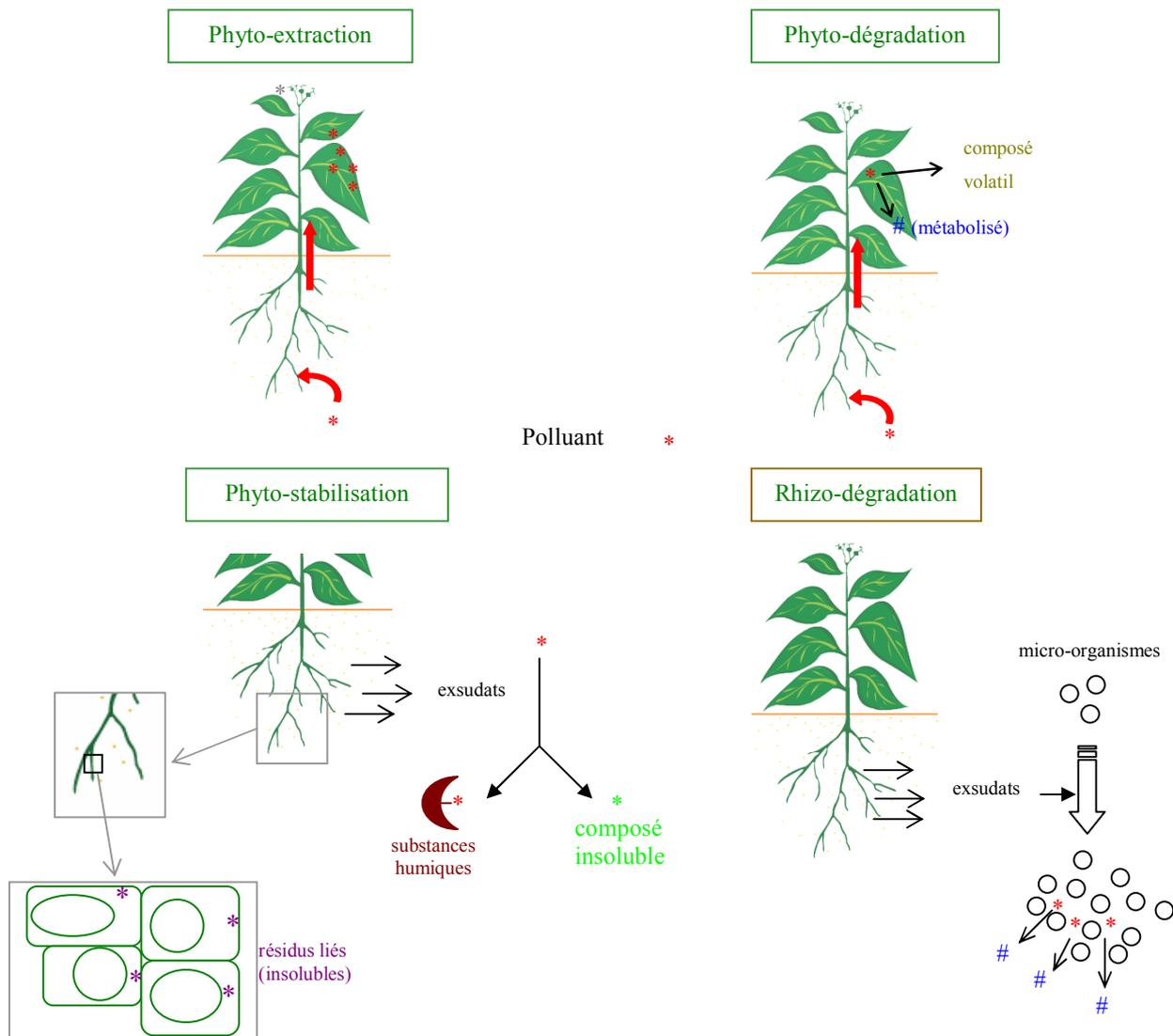


Figure I.1. Principaux mécanismes de phyto-dépollution : phyto-extraction, phyto-dégradation, phyto-stabilisation et rhizo-dégradation.

> Phyto-extraction ou phyto-accumulation ou phyto-filtration

Ce mécanisme est basé sur la capacité des plantes à extraire et accumuler des polluants présents dans les sols. Il en résulte une absorption et une accumulation des polluants dans les tissus aériens sans impliquer leur dégradation. A la fin de ce processus, il est alors nécessaire de récolter les parties aériennes des plantes. La destruction des polluants peut alors se faire par incinération mais aussi par compostage.

Ce mécanisme peut aussi entrer en jeu avec des plantes aquatiques ou semi-aquatiques dans des systèmes hydriques tels que des lagunes naturelles, des petits lacs, des sorties de station d'épuration, des bassins de décantation (lagunage). La phyto-filtration est basée sur l'absorption, la concentration et la précipitation du polluant par l'intermédiaire de plantes (Arthur *et al.*, 2005). La luzerne est ainsi capable d'absorber les nitrates en grande quantité mais il faut que le flux d'eau ne soit pas trop rapide pour optimiser cette absorption (Russelle *et al.*, 2001).

> Phyto-transformation ou phyto-dégradation

Après avoir absorbé un contaminant, certaines plantes peuvent être capables de le dégrader. Exposés à divers xénobiotiques, végétaux et animaux ont dû développer des systèmes de détoxification mais contrairement aux animaux, les plantes ne disposent pas de système d'excrétion permettant d'éliminer les composés toxiques. Pour les détoxifier, les végétaux sont donc capables de séquestrer ces composés dans des compartiments cellulaires. Chez les animaux, les xénobiotiques insolubles ou peu solubles sont transformés majoritairement dans le foie en composés solubles par deux phases successives. En fonction du composé, ces premières phases ne sont pas indispensables. Lors de la phase I, la molécule est biotransformée ce qui aboutit à l'apparition de groupements fonctionnels. Cette phase est principalement réalisée par des enzymes à cytochrome P-450. La phase II aboutit à la conjugaison de molécules endogènes à cette molécule. La molécule est rendue beaucoup plus polaire et inactive, elle sera ensuite excrétée, principalement par les urines ou la bile (Blaauboer, 1996 ; Timbrell, 1982). Chez les végétaux, le métabolisme des xénobiotiques peut être divisé en trois phases aboutissant à la neutralisation du polluant : la transformation ou phase I, la conjugaison ou phase II et la compartimentation ou phase III (Sandermann, 1992) (Figure I.2). Les deux premières phases sont similaires à celles mises en œuvre par les animaux. Les enzymes impliquées dans les deux premières phases ne sont pas spécifiques des xénobiotiques, ce sont des enzymes du métabolisme secondaire de la plante (Komořa *et al.*, 1995). Les enzymes de phase I transforment le composé par réduction, oxydation ou hydrolyse créant ainsi un ou plusieurs groupements fonctionnels sur la molécule (Komives et Gullner, 2005). Les réactions les plus rencontrées sont les oxydations réalisées par des monooxygénases à cytochrome P-450 ou par des peroxydases. D'autres enzymes telles que les carboxylesterases peuvent aussi agir. Les enzymes de phase II catalysent la fixation d'un ou plusieurs substituants endogènes sur des sites actifs existants ou formés au cours de la phase I. Les principales réactions incluent la conjugaison aux glucosides, au glutathion, aux

acides aminés ou à l'acide malonique. Les enzymes impliquées sont les *O*-glucosyltransférases, les *N*-glucosyltransférases, les glutathione *S*-transférases, les *O*-malonyltransférases ou encore les *N*-malonyltransférases. Lors de la phase III, les composés solubles sont soit stockés dans la vacuole, soit incorporés dans la lignine ou dans les autres constituants de la paroi cellulaire devenant ainsi non extractibles. De par sa similitude avec les mécanismes hépatiques de détoxification chez les animaux, le terme de "green liver" a été adopté pour le fonctionnement des cellules végétales vis-à-vis des xénobiotiques (Sandermann, 1994).

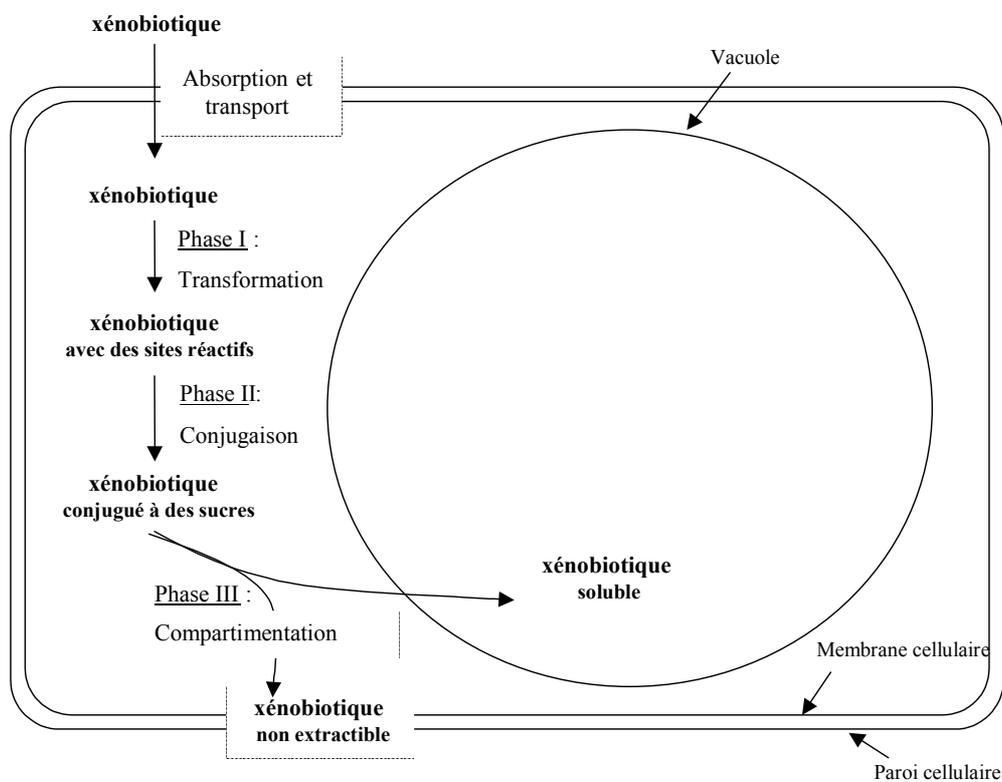


Figure I.2. Métabolisme des xénobiotiques chez la plante : concept du "green liver" (d'après Sandermann, 1992).

Ces processus enzymatiques sont mis à profit pour la dépollution. Certaines enzymes végétales sont particulièrement impliquées dans la phyto-dépollution pourtant, leurs substrats naturels dans la plante sont mal connus : les déhalogénases (composés chlorés), les peroxydases (composés

phénoliques), les nitroréductases (composés nitroaromatiques), les nitrilases (composés aromatiques cyanilés) et les phosphatases (pesticides organophosphorés).

Certaines plantes peuvent convertir un contaminant en composé volatil qui sera rejeté dans l'atmosphère par les stomates des feuilles (Yu et Gu, 2006). Ce processus est plus particulièrement appelé phyto-volatilisation. Dans ce cas, le composé volatil néoformé peut être toxique mais il sera dilué dans l'air pour diminuer l'exposition et ainsi le risque.

> Rhizo-dégradation ou phyto-stimulation

Dans ce cas, les plantes ont une action indirecte sur le polluant. Elles agissent en activateur de la dégradation microbienne. La rhizosphère, zone de sol à proximité des racines, est une zone de haute densité et d'activité microbiennes. Les plantes peuvent moduler l'environnement géochimique de la rhizosphère ce qui fournit des conditions plus adaptées à la croissance des bactéries et des champignons. 10 à 20% des photosynthétats des plantes sont sécrétés par celles-ci sous forme d'exsudats racinaires qui favorisent la croissance et l'activité métabolique des communautés fongiques et bactériennes de la rhizosphère (Anderson *et al.*, 1994 ; Newman et Reynolds, 2005). La composition chimique des exsudats racinaires et les taux d'exsudation varient considérablement selon les espèces (Rao, 1990). Certains composés organiques des exsudats racinaires (phénols, acides organiques, alcools, protéines) peuvent être utilisés comme sources de carbone et d'azote pour la croissance et la survie des micro-organismes. L'activité des micro-organismes est favorisée par la présence des plantes qui créent un environnement physico-chimique approprié favorisant ainsi la dégradation microbienne des polluants organiques. Par exemple, les taux de biodégradation du phénanthrène sont plus élevés quand il est situé à moins de 3 mm de racines de *Lolium perenne* (Corgie *et al.*, 2004).

Cette interaction entre les plantes et les micro-organismes permet de limiter, dans certains cas, l'utilisation de fertilisants au cours de la bio-dépollution grâce aux déchets végétaux et aux exsudats racinaires.

> Phyto-stabilisation

Certains polluants sont récalcitrants aux précédents mécanismes. Dans ce cas, la phyto-stabilisation fournit une alternative au problème de contrôle de la contamination. Elle repose sur l'immobilisation du polluant pour limiter sa dispersion dans l'environnement et sa biodisponibilité. Elle peut consister en une simple revégétalisation du site qui évite l'érosion et la

dispersion du contaminant dans l'air et dans l'eau. Les plantes peuvent aussi être utilisées comme des pompes organiques pour absorber de grands volumes d'eau. Bien que le polluant ne pénètre pas dans la plante, il reste alors localisé dans la zone polluée initialement. Cela ne permet pas de diminuer la pollution dans le sol mais cela réduit la migration des contaminants vers les nappes phréatiques. Les racines des plantes ont aussi la capacité de modifier les conditions environnementales comme le pH ou l'humidité du sol. Certains contaminants peuvent être sensibles à ces variations et la présence de plantes peut ainsi permettre une diminution de la biodisponibilité du polluant. Ainsi, une expérience de revégétalisation a été menée avec des plantes mycorhызées sur trois sites contaminés par des métaux ou des polluants organiques et a permis la réimplantation d'une activité biologique (Oliveira *et al.*, 2001).

Enfin, certains composés peuvent être absorbés par la plante mais ne pas être transférés vers les parties aériennes. Ils peuvent donc être incorporés dans les parois racinaires après une métabolisation. Le polluant sera immobilisé dans la paroi par des liaisons covalentes irréversibles. Certains micro-organismes sont capables de dégrader les parois végétales et ils seraient donc capables de dégrader le polluant (Aust, 1995 ; Broda *et al.*, 1994).

La combinaison de plusieurs mécanismes peut permettre d'optimiser la phyto-dépollution. Dans certains cas, les micro-organismes peuvent, dans un premier temps, dégrader un composé récalcitrant pour permettre dans un deuxième temps l'absorption par la plante du ou des métabolites ainsi produits. L'utilisation de la phyto-dépollution peut être limitée par la taille des plantes présentant des potentiels intéressants de dépollution ou une trop faible capacité des plantes à tolérer, détoxiquer et accumuler les contaminants. Le choix des plantes était jusqu'à présent basé sur un processus de tolérance aux polluants et sur leur efficacité en matière de dépollution des sols (Sun *et al.*, 2004). Plus récemment, une approche transgénique a été proposée pour optimiser la capacité des plantes qui présentent un intérêt en phyto-dépollution (Peuke et Rennenberg, 2005). Le premier choix se fait en fonction de la capacité de croissance et de production de biomasse mais aussi de l'adaptation au type du site à dépolluer. Les biotechnologies incluent le transfert de gènes d'intérêt chez les plantes (Karavangeli *et al.*, 2005 ; Kawahigashi *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2005). Le transfert de gènes se fait généralement d'un micro-organisme vers la plante mais il peut aussi se faire à partir d'un animal ou d'une autre

plante. Actuellement, ces approches restent limitées au stade expérimental car elles sont difficilement acceptées du grand public à cause de l'image négative des organismes génétiquement modifiés (OGM).

L'action des plantes se faisant naturellement lors de la phyto-dépollution, les sites pollués ayant un couvert végétal naturel ont tendance à être dépollués sans intervention humaine. Cette atténuation naturelle est la forme la plus simple de phyto-dépollution car elle ne nécessite pas d'autre intervention qu'un suivi du niveau de pollution au cours des années.

Dans le cas des métaux lourds, la phyto-dépollution est principalement basée sur une extraction ou sur une inactivation dans le sol pour limiter la dispersion (Lombi *et al.*, 2001). Ainsi, certaines plantes sont capables d'accumuler jusqu'à 0,1% de leur poids sec en métaux lourds et une extraction ultérieure permet de réutiliser le métal. La phyto-dépollution peut aussi réduire la biodisponibilité des métaux lourds. Beaucoup d'exsudats racinaires causent la spéciation des métaux (modification du degré d'oxydation des métaux lourds), la précipitation et l'adsorption des métaux ce qui forme des dépôts minéraux stables sur les acides humiques dans le sol. Cela limite leur biodisponibilité dans le sol pour les plantes et les autres organismes. Des amendements d'agents complexants tels que l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) peuvent être réalisés pour rendre les métaux plus solubles (Lombi *et al.*, 2001). Ils permettent alors d'augmenter la biodisponibilité des métaux et donc une phyto-extraction. Cette méthode est très controversée car elle augmente aussi les risques de lessivage et de dispersion des métaux dans l'environnement. Lors de l'utilisation de chélateurs, il est donc essentiel d'effectuer un suivi complet et à long terme.

I.1.2.3 *Facteurs affectant la phyto-dépollution*

Pour pouvoir dépolluer des sols, les plantes et les micro-organismes qui leur sont associés doivent être en contact avec le polluant. Le devenir d'un polluant dans le système sol-plante est donc déterminé par sa biodisponibilité qui dépend d'un ensemble de caractéristiques physico-chimiques de la molécule et d'interactions complexes de celle-ci avec le milieu. Ces caractéristiques et celles du milieu ont un rôle déterminant dans le succès de la dépollution pour un polluant donné. L'efficacité de la phyto-dépollution dépend, par conséquent, de multiples critères.

Il existe de nombreuses définitions de la biodisponibilité, certaines sont basées sur le degré d'extractibilité par des méthodes physico-chimiques, sur la biodégradabilité d'un composé dans le sol ou encore sur la biodiversité des micro-organismes. Nous utiliserons une définition prenant en compte les différents types d'organismes cibles, elle a été proposée dans la norme ISO/CD 17402 (2005) : "la biodisponibilité correspond au degré avec lequel un composé chimique présent dans le sol peut être absorbé et métabolisé par l'homme ou un récepteur écologique ou être disponible pour interagir avec des systèmes biologiques". Un récepteur écologique est une personne ou une partie de l'écosystème qui peut être potentiellement exposée. Dans le cas de la phyto-dépollution, les plantes sont donc considérées comme des récepteurs écologiques. La biodisponibilité est dépendante de la capacité du sol à fixer le polluant, définissant la fraction disponible dans la partie aqueuse du sol, mais aussi de la capacité de la plante à absorber le polluant. Les caractéristiques environnementales couplées aux propriétés physico-chimiques du polluant et aux caractéristiques du récepteur écologique déterminent la biodisponibilité du polluant dans le sol (Pilon-Smits, 2005).

Les facteurs affectant l'adsorption des produits chimiques dans le sol, leur absorption et leur distribution dans la plante sont :

- les propriétés physico-chimiques du composé comme la solubilité, la tension de vapeur, le poids moléculaire et le coefficient de partage octanol eau (K_{ow}), le coefficient de partition avec la matière organique (K_{oc}),
- les caractéristiques environnementales comme la température, le pH, la matière organique et l'humidité du sol,
- les caractéristiques du végétal telles que le type de système racinaire et les enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques.

Tous ces facteurs n'agissent pas au même niveau pour modifier la biodisponibilité. Ils peuvent avoir un rôle dans l'interaction sol-eau et/ou eau-plante (Figure I.3). La distribution dans la plante après absorption du composé est, elle aussi, influencée par certains facteurs précédemment énoncés et joue un rôle important dans le devenir du polluant au cours d'un processus de phyto-dépollution.

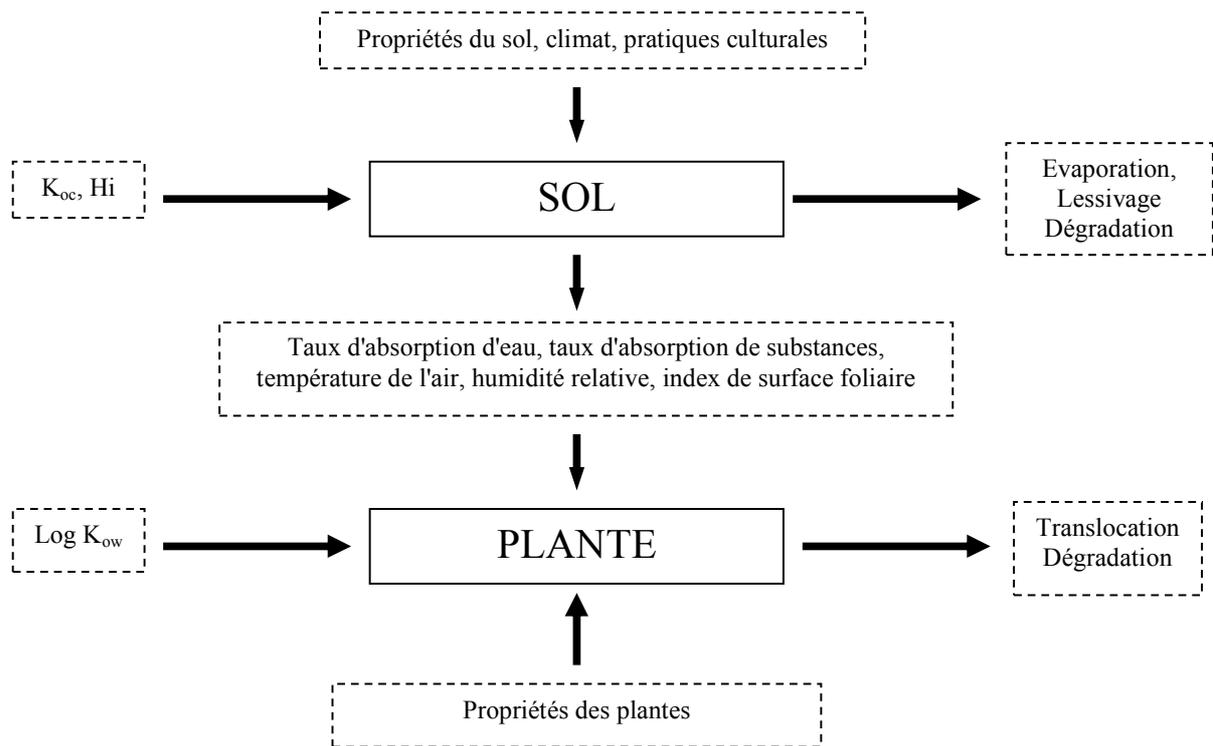


Figure I.3. Dynamique des xénobiotiques dans le système sol-plante, influence des différents facteurs.

> Facteurs influençant l'interaction sol-eau

La concentration en matière organique mais aussi le caractère volatil et hydrophobe du polluant sont des données essentielles pour déterminer ses mouvements dans le sol. La répartition entre le sol et l'eau (K_d) est dépendante de la quantité de matière organique d'un sol, elle permet de calculer le coefficient de partition du polluant dans la matière organique (K_{oc}) par la relation suivante :

$$K_d = K_{oc} \times (\% \text{ de matière organique})/100$$

Dans des sols contenant entre 1 et 5% de matière organique, les composés non ionisés lipophiles ($\log K_{ow} > 4$) seront fortement adsorbés sur le sol avec un $K_d > 10$ alors que les composés modérément lipophiles ($\log K_{ow}$ entre 2 et 4) seront modérément adsorbés, leur K_d sera compris entre 1 et 10. L'humus est constitué principalement de tissus végétaux morts et les parois végétales possèdent des groupes chargés négativement qui fixent les composés hydrophobes ou les cations. Le K_d des cations est supérieur à 50 et peut atteindre 1000 pour des dications. De

plus, la mobilité des composés ionisés dépend du pH du sol, qui détermine la forme prédominante en fonction de leur pKa. Le K_{oc} est lié à l'hydrophobicité de la molécule appelée aussi coefficient de partage octanol eau (K_{ow}) par la relation : $\log K_{oc} = 0,52 \log K_{ow} + 0,62$ (Bromilow et Chamberlain, 1995). Cette relation n'est toutefois pas toujours confirmée expérimentalement. Le $\log K_{oc}$ est un des paramètres les plus importants pour décrire le transfert et le devenir d'un produit chimique dans le système sol-eau.

La volatilité permet, elle aussi, de déterminer la disponibilité d'un polluant dans la phase aqueuse du sol. Elle mesure la tendance d'un composé à se répartir entre l'air et l'eau (Davis *et al.*, 2003). Elle est exprimée par la constante de la loi de Henry (H_i notée parfois H'). Un composé avec un H_i supérieur à 10^{-4} aura tendance à diffuser dans l'air et se déplacer entre les particules du sol alors qu'un composé avec un H_i inférieur à 10^{-6} se retrouvera majoritairement dans l'eau. Entre 10^{-4} et 10^{-6} , le composé est mobile entre l'air et l'eau. Quelle que soit cette répartition, les composés peuvent diffuser passivement à travers les plantes ou les parois racinaires des végétaux (Pilon-Smits, 2005).

La tendance d'un composé organique présent dans la phase aqueuse à être absorbé par les plantes peut être prédite en fonction de son $\log K_{ow}$ (Figure I.4). Les molécules avec un $\log K_{ow}$ supérieur à 4 (PCB, HAP et autres hydrocarbures) ont tendance à être piégées par adsorption sur la matière organique du sol ou sur les racines des plantes, elles sont donc très peu biodisponibles pour subir l'action des plantes. Ces molécules sont donc souvent considérées comme récalcitrantes à cause de leur faible biodisponibilité. Les molécules ayant un $\log K_{ow}$ inférieur à 1 ont tendance par contre à être lessivées car elles sont très hydrosolubles. Les molécules intermédiaires sont celles qui sont les plus susceptibles d'être absorbées par les plantes car elles sont forcément biodisponibles.

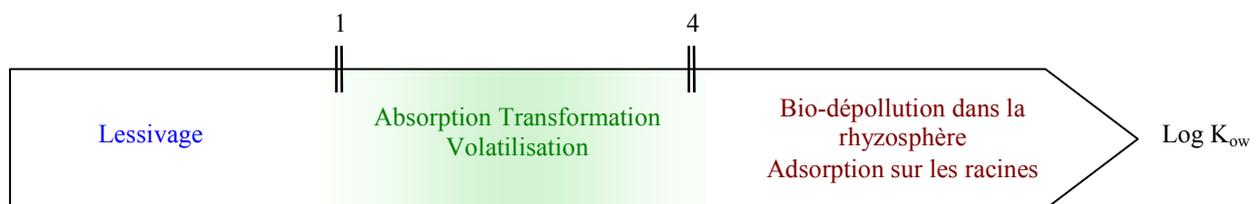


Figure I.4. Prédiction du devenir des composés organiques en fonction de la loi de Briggs *et al.* (1982).

> Facteurs influençant l'interaction eau-plante et la distribution dans la plante

Le transfert d'un polluant non ionisé de la phase aqueuse du sol vers la plante est gouverné principalement par son hydrophobicité. L'efficacité de ce transfert est exprimée par le ratio de la concentration du polluant dans les racines sur la concentration dans la solution externe à la plante, c'est le facteur de concentration racinaire (Root Concentration Factor ou RCF). Celui-ci est donc dépendant du $\log K_{ow}$ du contaminant comme cela est représenté sur la figure I.5. Pour les composés ayant un $\log K_{ow}$ élevé, le RCF élevé observé expérimentalement est dû à une forte adsorption du contaminant sur les parois racinaires sans pénétration dans la plante. Il n'est pas représentatif de l'absorption du composé par la plante.

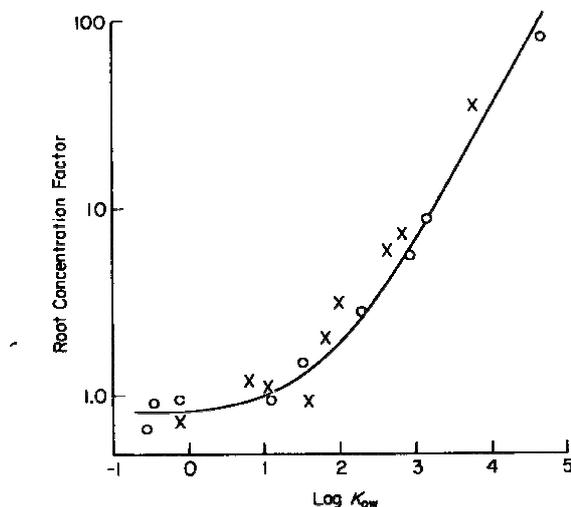


Figure I.5. Relation entre l'absorption racinaire après 24 h en solution hydroponique (exprimée par le RCF) et le $\log K_{ow}$ de différents composés : o, *O*-méthylcarbamoxyloximes et x, phénylurées substituées (d'après Briggs *et al.*, 1982).

En effet, pour pénétrer dans la plante, les composés doivent pénétrer dans les cellules pour pouvoir passer la bande de Caspari (structure subérimée) (Figure I.6). Dans le cas contraire, ils restent bloqués dans l'épiderme et le cortex des racines et leur transfert dans les parties aériennes de la plante sera impossible. Les composés très lipophiles sont retenus par les parois cellulaires et sont donc piégés dans les racines (Mc Farlane, 1995). Le mécanisme d'absorption est le plus efficace pour des composés modérément hydrophobes ($\log K_{ow}$ entre 0,5 et 3) qui pourront passer

à travers les membranes mais aussi dans la phase aqueuse des cellules (Burken et Schnoor, 1998).

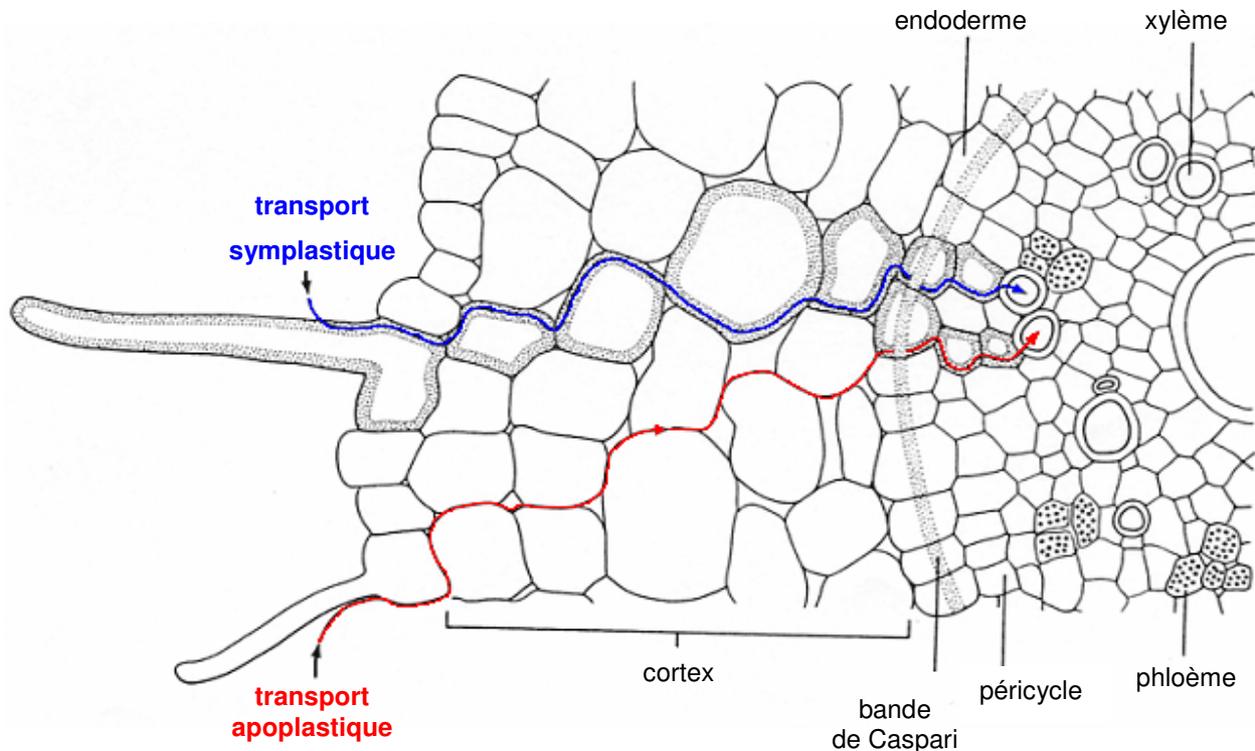


Figure I.6. Schéma d'une coupe transversale de racine de blé montrant les voies possibles de mouvement des composés solubles (d'après Mc Farlane, 1995).

Après pénétration du polluant dans la plante, celui-ci peut être transféré vers les différents organes via le xylème (tissu composé de cellules mortes qui transporte l'eau et les minéraux du sol). L'efficacité du transport des racines vers les parties aériennes est exprimée par le ratio de la concentration du composé dans le xylème sur la concentration dans la solution externe à la plante, appelé le facteur de concentration dans le courant de transpiration (Transpiration Stream Concentration Factor ou TSCF). Les composés se déplaçant avec la même efficacité dans le xylème, la valeur maximale est donc de 1 pour un transport passif. Bromilow et Chamberlain (1995) ont mesuré expérimentalement le TSCF de différentes substances non ionisées, ce qui a permis d'établir une courbe exprimant le TSCF en fonction du $\log K_{ow}$ des composés (Figure I.7). Certains TSCF mesurés expérimentalement ne se situent pas sur cette courbe mais cela semble

dû à leur dégradation très rapide dans la plante qui modifie leur mobilité. Lors de l'évaluation de ce TSCF, l'étape du transfert dans la plante concernant la biodisponibilité du polluant est prise en compte, le TSCF est donc dépendant de la matière organique présente dans le sol. Plus il y a de matière organique, plus le TSCF est faible.

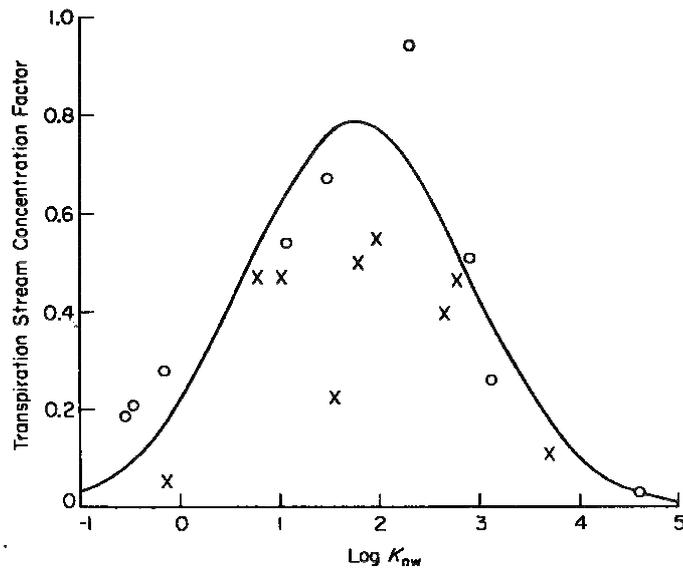


Figure I.7. Relation entre le $\log K_{ow}$ et la translocation des composés chimiques chez le persil (exprimée par le TSCF) : o, *O*-méthylcarbamoyloximes et x, phénylurées substituées (d'après Bromilow et Chamberlain, 1995).

Dans le cas des molécules ionisées, l'absorption par la plante et leur transport dans celle-ci sont dépendants du pH de la phase aqueuse du sol et du pK_a de la molécule. Pour les acides faibles, le RCF diminue lorsque le pH de la solution nutritive augmente (Bromilow et Chamberlain, 1995).

> Optimisation de l'efficacité de la phyto-dépollution

La compréhension des mécanismes influant sur la biodisponibilité des polluants peut aider à optimiser l'efficacité des processus de phyto-dépollution. Par exemple, l'ajout de matière organique peut permettre de diminuer la biodisponibilité des composés hydrophobes en cas de phytotoxicité nuisant à la mise en place des végétaux. Dans le cas inverse, l'ajout de surfactants va pouvoir augmenter leur biodisponibilité. Cette méthode est très utilisée pour les produits phytosanitaires, les pesticides peu solubles sont formulés avec des surfactants et sont ainsi plus

solubles et davantage disponibles pour la plante (Komives et Gullner, 2000). Pour les polluants organiques plus ou moins protonés, la modification du pH du sol va modifier leur solubilité et leur capacité à être absorbé par les plantes. L'ajout d'eau peut aussi être optimisé pour faciliter la migration du polluant tout en contrôlant son lessivage.

> Critères de choix des plantes pour la phyto-dépollution

Les plantes envisagées pour la dépollution doivent avoir une croissance rapide, une forte production de biomasse et être compétitives vis-à-vis des plantes endogènes du site, elles doivent aussi être tolérantes à la pollution pour permettre une extraction optimum du polluant. Les plantes seront choisies en fonction de leurs propriétés (densité du couvert racinaire) en relation avec le type de mécanisme envisagé pour dépolluer. Dans le cas d'une phyto-extraction de métaux lourds, les plantes envisagées sont celles qui ont les niveaux d'absorption les plus forts, de translocation et d'accumulation dans les parties aériennes qui seront ensuite récoltés (Meagher et Heaton, 2005). Pour les mécanismes de phyto-dépollution en général, les plantes ayant un système racinaire large et dense sont privilégiées car elles ont une plus grande capacité d'absorption et elles explorent une plus vaste zone de sol. Pour un mécanisme de phyto-dégradation, il est préférable que les plantes synthétisent de grandes quantités d'enzyme de dégradation (Pilon-Smits, 2005).

I.1.2.4 *Avantages et inconvénients de la phyto-dépollution*

La phyto-dépollution présente de nombreux avantages. Tout d'abord, un faible coût de mise en place et de maintenance présente un intérêt non négligeable dans la dépollution de sites. Procédé biologique captant l'énergie du soleil, la phyto-dépollution est environ 10 fois moins chère que les technologies classiques comme l'excavation et l'incinération des sols ou des systèmes d'extraction et de traitement chimique. Cette technologie étant mise en place *in situ*, son coût est nettement diminué en comparaison aux autres méthodes *ex situ*. Le travail *in situ* réduit aussi les risques de dispersion et d'exposition de l'homme, de la faune et de l'environnement au polluant.

La phyto-dépollution devrait permettre aussi d'améliorer la qualité des sols. En effet, la croissance du système racinaire permet une aération des sols ce qui stimule l'activité

microbiologique, de même que l'apport de nutriments au travers des exsudats racinaires (Suresh et Ravishankar, 2004). Les végétaux participent également à la diminution de l'érosion. Ils diminuent aussi l'infiltration des eaux de surface polluées vers les nappes phréatiques en freinant le ruissellement.

La phyto-dépollution a un impact positif sur l'opinion publique en tant que "dépollution verte". En effet, elle respecte et restaure l'environnement et représente une alternative aux méthodes classiques trop destructrices et polluantes. Elle tend surtout à être utilisée pour les composés chimiques présentant un risque pour l'environnement (Meagher, 2001).

Elle peut être utilisée seule ou couplée à des technologies plus agressives. Dans de nombreux projets de dépollution, les forts niveaux de contaminations doivent d'abord être maîtrisés par des traitements chimiques. La phyto-dépollution est alors envisagée comme une étape finale perfectionnée pour l'élimination des traces de contaminants. Quand la concentration en polluants est faible, la phyto-dépollution reste la stratégie de dépollution la plus envisageable économiquement. Il existe de nombreux sites avec une légère contamination en polluants qui peuvent être traités par cette technique en tant que solution à long terme.

La phyto-dépollution présente cependant des inconvénients non négligeables. Les plantes doivent être en contact avec le polluant pour pouvoir agir. Par conséquent, les propriétés du sol, les niveaux de toxicité et le climat doivent permettre la croissance des plantes envisagées. Si la toxicité est trop élevée, elle peut cependant être diminuée par dilution du sol avec des sols non contaminés mais cela augmente les coûts de mise en œuvre.

De plus, les contaminants doivent être accessibles aux tissus absorbants. La phyto-dépollution est donc limitée par la profondeur des racines des plantes utilisées. Celles-ci peuvent atteindre 2 m de profondeur dans le cas des herbacées et plus de 5 m pour les arbres, même si certaines racines de phréatophytes peuvent atteindre des profondeurs de 15 m dans des zones arides (Negri *et al.*, 2003). Dans le cas de nappes phréatiques contaminées, une alternative peut être le pompage de l'eau et l'utilisation de celle-ci pour irriguer les plantes.

Un autre inconvénient de la phyto-dépollution est qu'il s'agit d'un traitement à long terme, limitant son application aux cas d'utilisation non urgente des sites, i.e. sans pression économique, ou aux cas ne présentant aucun risque de dissémination dans l'environnement, i.e. sans pression

environnementale. La vitesse de dépollution varie de l'ordre de quelques années pour la rhyzo-dégradation à quelques dizaines d'années pour la phyto-accumulation. D'autre part, la majorité des recherches a été effectuée en laboratoire dans des conditions très contrôlées, il est probable que la mise en place sur un site diminue l'efficacité de la dépollution à cause des conditions climatiques et environnementales du site (arrosage, présence de nuisibles...) non maîtrisées.

L'histoire du site à dépolluer est importante car elle renseigne sur les composés qui peuvent être rencontrés sur le site. En effet, un autre facteur limitant la phyto-dépollution est la présence sur les sites de plusieurs contaminants, souvent à des concentrations variables et de répartition hétérogène. Le sol peut alors devenir phytotoxique pour les plantes choisies alors que le seul contaminant de référence ne l'était pas. L'âge de la contamination peut aussi jouer un rôle important sur la biodisponibilité du polluant dans le sol et sur sa toxicité (Alexander, 2000). En effet, le temps favorise la liaison des polluants aux substances humiques ce qui diminue la quantité de polluant dans la phase aqueuse. Le temps par l'alternance de lumière et d'obscurité et de périodes sèches et humides peut aussi modifier ces paramètres par la photo-décomposition, l'hydrolyse, les réactions avec la matière organique du sol, l'adsorption sur les particules du sol, la précipitation, la transformation microbienne et d'autres mécanismes pouvant entrer en jeu dans les sols.

Si malgré tous ces facteurs limitants, les plantes arrivent à croître et à absorber de grandes quantités de polluant, elles représentent toujours un risque environnemental important dans le cas d'un site non suivi. En effet, après absorption du polluant, elles peuvent entrer dans la chaîne alimentaire et induire la dispersion de la pollution. Elles peuvent aussi atténuer naturellement la pollution en dégradant le polluant.

1.1.2.5 Conclusions économiques de la phyto-dépollution

La popularité de la phyto-dépollution auprès des agences gouvernementales et des investisseurs industriels a nettement progressé au cours des dix dernières années. De nos jours, ils n'hésitent plus à inclure la phyto-dépollution dans leurs stratégies de réhabilitation des sols. Les entreprises consultantes en environnement proposent de plus en plus la phyto-dépollution dans leurs technologies de dépollution. Cette popularité est basée sur l'impact social positif et sur le faible

coût de mise en place. Les fonds alloués à la réhabilitation des sites pollués sont limités, le coût de la dépollution est donc un facteur essentiel dans le choix de la méthode.

Actuellement, 25 à 50 milliards de dollars sont dépensés par an dans le monde pour la réhabilitation de l'environnement (Pilon-Smits, 2005). Aux Etats-Unis, 0,5% des 6 à 8 milliards de dollars de budget annuel destiné à la dépollution sont consacrés à la phyto-dépollution, ce qui représente seulement 100 à 150 millions de dollars. La bio-dépollution représente 2% de ce budget. La majorité des études concernent les métaux alors que la phyto-dépollution des polluants organiques représenterait 80% du potentiel commercial de cette stratégie. Les fonds gouvernementaux pour la recherche sur la phyto-dépollution se sont stabilisés à seulement plusieurs millions de dollars par an, c'est très faible par rapports aux milliards dépensés annuellement pour la gestion des sites de stockage et les méthodes de dépollution physique.

L'estimation du coût de la phyto-dépollution était de 150 000 à 250 000 dollars US par hectare, ce qui est faible, comparé aux millions de dollars US par hectare ou plus nécessaires pour le décaissement et le stockage des sols. Malgré cette nette différence de coût, le marché de la dépollution de l'environnement présente une faible perspective de profits par rapport aux fonds engagés dans la recherche. Les entreprises associent toujours la phyto-dépollution avec de faibles marges de profits (Marmioli et Mc Cutcheon, 2003). Toutefois, cette technologie bénéficie aujourd'hui du soutien de plusieurs gouvernements à travers le monde (Etats-Unis, Canada, Japon, Chine et Angleterre). Au Japon, par exemple, le gouvernement crée de nombreux jardins pour tenter de lutter contre la pollution atmosphérique due à la grande concentration automobile. Depuis quelques années, des utilisations commerciales de la phyto-dépollution ont été mises en place dans des stations d'épuration où les plantes sont utilisées pour traiter l'eau par filtration dans des jardins. Dans le cadre d'une politique de développement durable, il existe de plus en plus d'entreprises de services qui proposent aux collectivités et aux entreprises la mise en place de la phyto-dépollution pour le traitement de boues d'épuration ou de boues industrielles, pour la dépollution de friches industrielles et pour le traitement de sols agricoles (lisiers).

I.2 Cas du RDX et du TNT

I.2.1 Le RDX, le TNT et origine de leur pollution

L'hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) et le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) sont deux composés énergétiques de groupe chimique différent (Figure I.8). En fonction du lieu de production et d'utilisation, le RDX est connu sous les noms de cyclotriméthylènetrinitramine, Royal Demolition eXplosive (Canada), Research Department eXplosive (Royaume-Uni), Research Development eXplosive (U.S.A.) ou hexogène (France). Les principales caractéristiques physico-chimiques du TNT et du RDX sont présentées dans le tableau I.1.

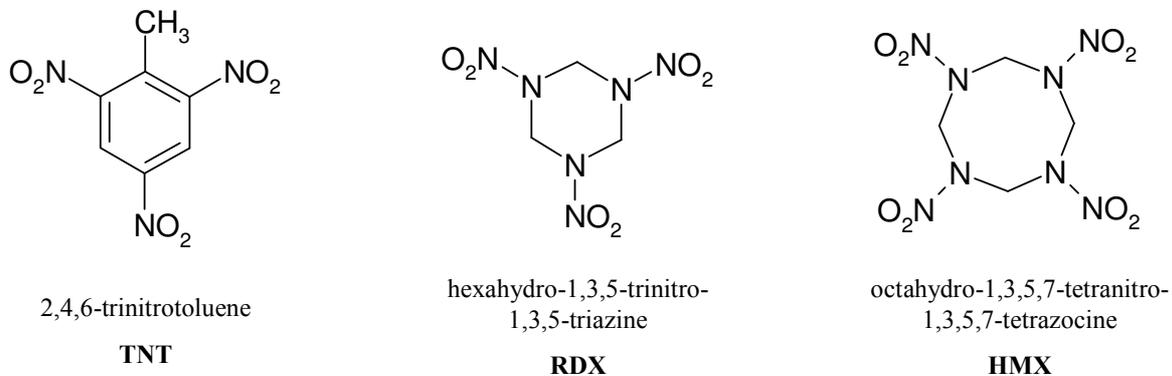


Figure I.8. Structure chimique des explosifs.

Le RDX et le TNT sont des explosifs secondaires car ils nécessitent une initiation de l'explosion par une détonation explosive à partir d'une plus faible quantité d'un composé plus instable, l'explosif primaire. Ils ne peuvent pas détonner directement par action de la chaleur ou lors d'un choc. Ils sont ou ont été largement utilisés dans les munitions militaires ou civiles dans le monde entier. Le RDX est classé dans les polynitramines, il est très utilisé dans les explosifs depuis le début du vingtième siècle. C'est actuellement un composant principal de la majorité des munitions utilisées par les forces militaires dans le monde. Le TNT fait partie du groupe des nitroaromatiques caractérisés par un cycle aromatique sur lequel sont greffés trois groupements nitrés. Il a été l'explosif le plus largement utilisé dans les munitions depuis plus de 150 ans. Les niveaux de TNT les plus élevés ont été produits à la fin de la Seconde Guerre Mondiale, la production mondiale était alors estimée à 150 ktonnes par mois. Le RDX étant plus énergétique, il est plus utilisé que le TNT dans la fabrication des munitions (Comfort, 2006).

	RDX	TNT
Numéro de CAS (Chemical Abstract Service)	121-82-4	118-96-7
Poids moléculaire (g/mol)	222.26	227.13
Solubilité dans l'eau à 20 °C (mg/L)	42,3	130
Solubilité dans l'acétone à 20 °C (g/L)	40	130
Point de fusion	205 °C	80,1 °C
Log K _{ow}	0,81	1,6
Log K _{oc}	2,1	3,2
Hi (atm·m ³ /mole)	1,2·10 ⁻⁵	4,57·10 ⁻⁷

Tableau I.1. Principales caractéristiques physico-chimiques du RDX et du TNT (d'après Talmage *et al.* 1999).

Le RDX a souvent été synthétisé et utilisé de façon conjointe avec le HMX (octahydro-1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétrazocine) (Figure 8). De plus, la synthèse de Bachmann du RDX conduit à la formation de 8 à 12% de HMX (Bachmann et Sheehan, 1949). C'est un polynitramine qui a un point de fusion plus élevé que le RDX, d'où son nom de High Melting eXplosive. Ils se retrouvent donc souvent de façon conjointe sur les sites contaminés (Snellinx *et al.*, 2002). Le RDX et le HMX possèdent des groupements nitrés mais contrairement aux autres composés énergétiques, ils sont reliés au cycle par une liaison covalente azote-azote. Cette distinction est importante car contrairement aux composés nitrés aliphatiques ou aromatiques, ils ne peuvent pas être synthétisés par des plantes ou des micro-organismes. Les nitramines semblent être des composés xénobiotiques vis-à-vis de l'environnement : ils n'apparaissent dans l'environnement qu'à la suite de l'activité humaine (Comfort, 2006).

Le TNT est obtenu par nitration du toluène, une contamination par le TNT est donc souvent accompagnée d'impuretés de dinitrotoluène (2,4-DNT, 2,6-DNT et 3,4-DNT) et de nitrotoluène (2-NT, 3-NT et 4-NT) (Figure I.9). Par exemple sur un site de production de munitions, 13 explosifs et composés dérivés ont été trouvés dont le plus concentré était le 2-nitrotoluène. Les dérivés aminés qui résultent de la dégradation microbiologique partielle, représentent un problème aussi important que le TNT parental. Ils sont plus stables dans l'environnement, souvent aussi toxiques et plus mobiles, ce qui représente une menace pour les réserves d'eau potable, la santé humaine et l'environnement (Snellinx *et al.*, 2002).

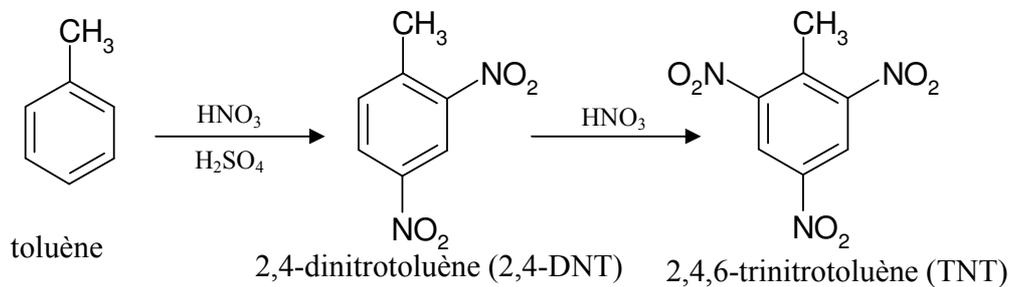


Figure I.9. Synthèse de TNT par nitration du toluène (Humphrey et Smoak, 1960).

Le RDX et le TNT ont une faible pression de vapeur ce qui indique un faible potentiel d'entrée dans l'atmosphère (Talmage *et al.*, 1999). Aucune présence de ces explosifs n'a été détectée lors d'études de suivis atmosphériques au niveau des sites pollués.

La contamination actuelle des sols et des eaux de ruissellement par le RDX et le TNT est étendue et représente un problème écologique mondial qui a débuté par suite des activités militaires intenses lors de la première Guerre Mondiale (Hawari *et al.*, 2000). Cette contamination peut avoir des origines différentes : la production industrielle, le stockage, les tests d'armement, les entraînements, les explosions civiles ou militaires. Dans les environs proches des usines de fabrication des munitions, de très hauts niveaux de pollution peuvent être retrouvés, concentrés dans des surfaces réduites. Ils sont principalement dus aux anciennes méthodes de décontamination des eaux usées. En effet, anciennement, les eaux résultant de la synthèse des explosifs étaient déversées dans des lagunes pour permettre la décantation des polluants. L'eau ainsi décontaminée était ensuite redirigée vers les rivières avoisinantes (Harvey *et al.*, 1990). Au

cours du temps, de grandes quantités de résidus d'explosifs et de leurs produits de transformation se sont accumulés dans ces lagunes. De nos jours, les eaux usées sont filtrées sur charbon actif avant de rejoindre le circuit commun de traitement de l'eau. Sur les sites militaires, les niveaux de pollution sont plutôt bas et diffus, ils résultent de l'absence de combustion ou de la combustion incomplète des explosifs durant les tests et les entraînements. Quelle que soit l'origine de la contamination, elle pose un problème important à cause de la possible introduction de ces molécules ou de produits de transformation dans les chaînes alimentaires lors de la revégétalisation de ces sites mais aussi dans les eaux d'écoulement et les nappes phréatiques.

L'estimation du danger environnemental posé par le RDX et le TNT a permis de déterminer que les sols contaminés contenaient souvent des mélanges de composés énergétiques plutôt qu'un seul explosif (Comfort, 2005). Les autres contaminants peuvent être des esters nitrés (nitroglycérine, nitrocellulose), des co-produits et des intermédiaires de synthèse, et des produits résultants d'une dégradation microbienne partielle dans le sol (Bhadra *et al.*, 2001). Bien que la plupart des sites pollués par les munitions soient très anciens, ils représentent toujours un sérieux risque pour l'environnement. Cette contamination est connue pour s'être répandue mais peu d'informations sur ces sites et sur leur degré de contamination sont disponibles dans la littérature. Un nombre élevé de sites contaminés est localisé en Allemagne et aux Etats-Unis à cause des fortes activités durant la Seconde Guerre Mondiale. D'autre part, les niveaux de pollutions actuellement retrouvés sur les sites sont extrêmement hétérogènes et sont différents d'un site à l'autre (Talmage *et al.*, 1999). Pour le TNT, ils peuvent varier de 0,08 à 87000 mg/kg et pour le RDX de 0,7 à 74000 mg/kg (Tableau I.2). En 2003, le département américain de la Défense déclarait 850 sites contaminés par les explosifs nécessitant une action de dépollution et 988 qui ne présentaient pas de risques pour la santé humaine ou l'environnement (Siegel, 2004). Par exemple, les sédiments du site très étudié de l'usine militaire de munitions de l'Iowa contiennent jusqu'à 9290 mg/kg de TNT et 2950 mg/kg de RDX (George *et al.*, 2001). En conséquence, pour dépolluer des sols contaminés par des explosifs, les technologies employées doivent être suffisamment robustes pour traiter des contaminations multiples, variées et anciennes.

Explosif	Eaux profondes ($\mu\text{g/L}$)	Eaux de surfaces ($\mu\text{g/L}$)	Sédiments (mg/kg)	Sols (mg/kg)
TNT	0,4-21960	1-3375	6,7-711000	0,08-87000
RDX	0,5-36000	2,6-224	1-43000	0,7-74000

Tableau I.2. Niveaux de contaminations d'explosifs retrouvés sur les installations militaires (d'après Talmage *et al.*, 1999).

Les explosifs étant des composés organiques, les sols contaminés par ces explosifs peuvent être dépollués par les méthodes présentées précédemment pour les composés organiques : traitements physico-chimiques, bio-dépollution et phyto-dépollution. Les traitements chimiques ne seront pas abordés dans le détail car ces méthodes bien maîtrisées à l'heure actuelle ont un effet négatif sur l'environnement (cf I/1). Certes la pollution est diminuée voire supprimée mais les dégâts sur le site freinent considérablement la revégétalisation naturelle du site. La meilleure technique disponible actuellement pour traiter les eaux contenant des explosifs est l'adsorption sur charbon actif. Bien qu'efficace, ce traitement est trop onéreux pour être envisagé à grande échelle. Pour les mêmes raisons que celles invoquées pour les produits organiques en général, la phyto-dépollution semble donc être une méthode envisageable et efficace pour la dépollution des explosifs, elle représente un faible coût et a un impact positif sur l'environnement.

I.2.2 Toxicité des explosifs

L'estimation du risque des explosifs est basée sur la détermination de leur toxicité ou écotoxicité et sur les possibilités d'exposition. Les composés nitrés sont potentiellement toxiques pour les espèces indigènes des sites contaminés. Cette toxicité explique la nécessité d'une dépollution de ces sols et d'une limitation de la dispersion de ces composés. La toxicité de ces composés a été très étudiée durant les dernières années en utilisant des organismes aquatiques, des espèces terrestres telles que les vers de terre, des mammifères ou encore des monocytes humains. La diversité des valeurs de toxicité montre la diversité de sensibilité des différents organismes testés. Les doses toxiques peuvent aussi varier en fonction du mode d'exposition et

du temps d'exposition mais elles permettent toutefois de déterminer une dose de référence pour l'exposition humaine.

I.2.2.1 *Le RDX*

L'effet du RDX sur l'activité microbienne d'un sol a été évalué avec des concentrations variant de 10 à 12500 mg/kg (Gong *et al.*, 2001). Le potentiel de nitrification, la fixation de l'azote, la respiration ont été mesurés après 1, 4 et 12 semaines d'exposition. Le RDX a inhibé la croissance des populations microbiennes de 36%. Les effets ont été plus importants avec un long temps d'exposition. La plus faible concentration induisant un effet (Low Observed Effect Concentration, LOEC) était de 1235 mg/kg.

Sur les vers de terre (*Eisenia andrei*), divers paramètres de reproduction ont été mesurés après 56 jours de culture dans un sol contaminé de 0 à 168 mg/kg de sol (Robidoux *et al.*, 2002). Ces paramètres (nombre de cocons, nombre de jeunes individus et leur poids) sont significativement diminués en présence de RDX à une concentration supérieure à 46,7 mg/kg. Par contre, aucun effet sur la survie ou sur la croissance des adultes n'a été observé même à de fortes concentrations comme 167,3 mg/kg. En conclusion, le RDX a un impact significatif sur la reproduction du ver de terre *E. andrei* mais aucun sur sa croissance.

La toxicité sur les plantes a été testée sur des concombres (*Cucumis sativus*) à des concentrations de 50 à 200 mg/kg de sol pendant 20 jours (Simini *et al.*, 1992). Une nette diminution de la biomasse des plantes exposées a été observée à partir de 100 mg/kg. Aucun autre effet néfaste n'a été observé.

Des salamandres entièrement terrestres (*Plethodon cinereus*) ont été exposées à des concentrations de 0, 10, 100, 1000 et 5000 mg de RDX par kg de sol durant 28 jours (Johnson *et al.*, 2004). A la plus forte concentration, des effets neuromusculaires (tremblements, hypersensibilité, léthargie) et une perte de poids étaient observés.

Les effets d'une exposition au RDX chez les oiseaux ont été déterminés chez le colin de Virginie (*Colinus virginianus*) appelée aussi caille des blés (Gogal *et al.*, 2003). Cette espèce sauvage est potentiellement présente sur les sites contaminés. Les doses orales ayant un effet ont été déterminées après 14 jours et 90 jours à 187 mg/kg pour les femelles et 280 mg/kg pour les

mâles. Les régimes contenant des doses supérieures ou égales de RDX ont provoqué une diminution de la consommation alimentaire, du poids et de la production d'œufs avec une réponse dose-dépendante.

Bentley *et al.* (1977) ont réalisé des études sur les effets chroniques du RDX sur deux espèces d'invertébrés (*Daphnia magna* et *Chironomus tentans*) et deux espèces de poissons (*Ictalurus punctatus* et *Pimephales promelas*). Les concentrations testées variaient en fonction de l'organisme étudié. Chez les daphnies (*D. magna*), le nombre de jeunes issus de la parthénogenèse a été réduit aux concentrations de 4,8, 9,5 et 20 mg/l entre 7 et 14 jours. Chez la mouche d'eau douce (*C. tentans*), la survie des larves et des adultes ainsi que l'émergence des adultes ne sont pas affectées par le RDX. Toutefois, les capacités de reproduction sont diminuées, aucun œuf n'était fertile à 1,3 et 4 mg/l et aucun œuf n'était produit à une concentration de 10 mg/l. A 2,3 mg/l, la survie des poissons chats (*I. punctatus*) âgés de 30 jours était très faible. Cette observation a été attribuée à des dysfonctionnements internes. Après 60 jours d'exposition, chez le poisson tête-de-boule (*P. promelas*), la survie des jeunes était significativement réduite à 4,9 mg/l. Ces résultats ont permis de déterminer une concentration sans effet (No Observed Effect Concentration, NOEC) et une LOEC qui étaient respectivement de 3,0 et 6,3 mg/l.

Une autre étude, sur des larves de poisson zèbre (*Danio rerio*), a permis de déterminer une NOEC à 13,2 mg/l et une LOEC à 16,5 mg/l (Mukhi *et al.*, 2005). La concentration nécessaire pour causer la mort de 50% des individus (Concentration Létale 50, CL50) à 96 h était de 22,9 mg/l et la concentration qui produit 50% de l'effet maximal observé (EC50) pour la déformation de la colonne était de 20,8 mg/l à 96 h.

De nombreuses études ont été commissionnées par le Département américain de la Défense pour déterminer les doses orales de référence et les doses limites chez l'homme. Le RDX a un effet sur le système nerveux central avec des symptômes de convulsion et d'hyperactivité chez l'homme et les animaux de laboratoire (Talmage *et al.*, 1999). Ces symptômes ont été observés chez des rats et des souris exposés à de fortes doses. Après 24 mois de traitement sur des groupes de 75 rats mâles et femelles à différentes doses de RDX dans le régime alimentaire, 68% des mâles et 36% des femelles sont morts avec la plus forte dose de 40 mg/kg/jour (Hart, 1976). Leur mort était précédée de tremblements et de convulsions. De plus, ces animaux et ceux traités à la

dose inférieure (8 mg/kg/jour) développaient des anémies et de l'hypoglycémie, leur poids corporel était diminué de 5% et le poids de leur rein était supérieur à celui du contrôle. Les femelles développaient des cataractes et avaient des hépatomégalies alors que les mâles présentaient des lésions urogénitales et une inflammation de la prostate. Schneider *et al.* (1978) ont traité oralement 30 rats Sprague-Dawley (sexe non spécifié) pendant 90 jours avec une solution saline à 20 mg/kg/jour. Huit rats sont morts entre 42 et 77 jours, apparemment à cause d'une maladie respiratoire chronique.

Une étude sur les effets du RDX au niveau de la reproduction a été réalisée sur des groupes de 24 rates Fischer 344 qui ont reçu par gavage des doses de 0; 0,2; 2 ou 20 mg/kg/jour de RDX du 6^{ième} au 19^{ième} jour de gestation (USEPA, 1993a). Aucun effet tératogène n'a été observé quelle que soit la dose. A partir de la toxicité sur l'embryon et sur la mère, la dose sans effet (No Observed Effect Level, NOEL) était de 2 mg/kg/jour et la plus faible dose induisant un effet (Low Effect Observed Level, LOEL) était de 20 mg/kg/jour. Angerhofer *et al.* (1986) ont étudié les effets toxiques du RDX au cours du développement. Des groupes de 6 rates gestantes ont été traités par gavage avec différentes doses de 0, 10, 20, 40, 80 ou 120 mg/kg/jour du 6^{ième} au 15^{ième} jour de gestation. Aucun effet tératogène n'a été observé. Toutefois, la NOEL et la LOEL ont été déterminées à 6 et 20 mg/kg/jour respectivement.

Pour l'homme, une dose chronique par voie orale de 0,003 mg/kg/jour a été calculée en extrapolant les résultats d'une étude de deux ans sur les rats (USEPA, 1993a). L'effet observé dans cette étude était une inflammation de la prostate. L'exposition d'ouvriers au RDX par inhalation ou par une prise orale est caractérisée par des convulsions, des maux de têtes, des nausées, des vomissements et des pertes de connaissance. Ces effets néfastes disparaissent après l'exposition. Selon les expérimentations, l'effet carcinogène du RDX n'a pas été mis en évidence chez le rat (USEPA, 1993a). Toutefois, le RDX est considéré par l'US EPA comme un composé appartenant au groupe C des carcinogènes humains potentiels. La dose maximale dans l'eau potable a été fixée à 3,1 µg/l.

I.2.2.2 Le TNT

Les études de toxicité en milieu aqueux ont majoritairement été réalisées à l'obscurité pour limiter la photolyse du TNT et certifier le lien entre le polluant et l'effet observé. Dans l'eau et en présence de lumière, le TNT se décompose, le temps de demi-vie va de 0,5 à 22 h (Spangord *et al.*, 1982). Les produits de dégradation observés étaient variés et comprenaient aussi des dérivés azo et azoxy formés par couplage de nitroso et d'hydroxylamines.

Une étude a été réalisée pour déterminer la toxicité aiguë du TNT chez 5 espèces d'invertébrés aquatiques (*Brachionus calyciflorus*, *Lumbricus variegatus*, *Daphnia magna*, *Hyallela azteca* et *Tanytarsus dissimilis*) et 4 espèces de poissons (*Ictalurus punctatus*, *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* et *Oncorhynchus mykiss*) (Liu *et al.*, 1983). La LC50 a été déterminée au bout de 48 h pour les invertébrés et 96 h pour les poissons. Les concentrations létales variaient entre 1,5 et 29 mg/l. Une autre étude sur le poisson *L. macrochirus* a permis d'évaluer l'EC50 du TNT à 96 h à 0,46 mg/l (Smock *et al.*, 1976). Les effets observés étaient un état de léthargie suivi par une perte de motricité. Des études ont aussi été menées pour déterminer la toxicité chronique du TNT chez les espèces aquatiques. Bailey *et al.* (1985) ont évalué durant 28 jours la toxicité chronique du TNT sur *Daphnia magna*. Les concentrations testées variaient de 0,03 à 1,03 mg/l et les critères mesurés étaient : la mortalité, l'efficacité de la reproduction et la taille des jeunes individus. Aucun effet n'a été observé sauf sur le nombre de nouveaux individus à 1,03 mg/l. A partir de ces résultats, la NOEC a été déterminée à 0,48 mg/l. Une autre partie de cette étude a permis de déterminer la LOEC à 0,24 mg/l chez la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*) après 60 jours d'exposition. L'effet observé était une diminution de la survie des jeunes. Le nombre d'œufs éclos a diminué pour une concentration de 0,93 mg/l.

Parmelee *et al.* (1993) ont testé les effets du TNT sur *Eisenia foetida* à 0, 25, 50, 100 ou 200 mg de TNT par kg de sol. Après 14 jours, différents paramètres ont été mesurés avec une NOEC de 110 mg/kg, une LOEC de 150 mg/kg et une LC50 de 325 mg/kg.

Une étude sur le souchet comestible (*Cyperus esculentus*) a été réalisée en culture hydroponique durant 42 jours pour déterminer l'effet du TNT sur différents paramètres de croissance (Palazzo et Leggett, 1986). La croissance des feuilles et des racines a été diminuée à toutes les concentrations testées (5, 10 et 20 mg/l). A 5 mg/l, le poids des racines est diminué de 95% par rapport au souchet non traité. La taille de la plante a diminué de 34%. Cataldo *et al.*

(1989) ont testé la toxicité du TNT chez le blé (*Triticum aestivum*), le haricot (*Phaseolous vulgaris*) et le brome mou (*Bromus mollis*). Chez le pois et le blé, une diminution de la taille de 25% est observée pour des sols contaminés à 30 mg/kg. A partir de 60 mg/kg, la taille de toutes les plantes est réduite de moitié et une importante chlorose apparaît. D'autre part, des tests de germination et d'émergence ont été réalisés sur la fétuque élevée (*Festuca arundinacea*) (Peterson *et al.*, 1996). La germination des graines, placées dans de l'agar contenant de 0 à 60 mg de TNT par litre, diminuait de façon linéaire par rapport à la concentration en TNT. Les concentrations inférieures à 30 mg/l ont eu peu d'effets sur la croissance et développement des plantules. A 60 mg/l de TNT, le développement était retardé et la croissance des racines et des parties aériennes était réduite.

Une étude a été réalisée sur les chiens, les rats et les souris durant 13 semaines (Dilley *et al.*, 1982). Les concentrations administrées aux chiens mâle et femelle étaient de 0 ; 0,2 ; 2 ou 20 mg/kg/jour. Des signes cliniques et des symptômes toxiques (diarrhées, urine orangée) sont apparus chez les chiens ayant reçu 20 mg/kg/jour. Le poids corporel des mâles avait nettement diminué et les poids du foie et de la rate avaient augmenté. Les mâles et les femelles présentaient des anémies. Ces effets étaient plus faibles chez les chiens ayant reçu 2 mg/kg/jour. Chez des souris Swiss-Webster, des mâles et des femelles ont reçu dans leur alimentation du TNT à différentes concentrations (1,57 ; 8,06 ; 37,8 ; 188 mg/kg/jour). Les rates des souris ont augmenté significativement de volume avec le plus fort traitement et des nécroses sont apparues sur le foie. Aucune différence n'a été observée en fonction du sexe de la souris. Les rats Sprague-Dawley ont été traités avec 0 ; 1,4 ; 7,4 ; 36,4 et 160 mg/kg/jour. Les rats ayant reçu la plus forte dose présentaient des anémies avec une diminution de l'érythrocyte, de l'hémoglobine et des hématocrites. Quel que soit le sexe, les rats ont perdu du poids et le poids de leur rate a significativement augmenté. Les mâles présentaient des atrophies testiculaires. Une autre étude a permis de déterminer une NOEL à 0,4 mg/kg/jour (USEPA, 1993b). Après 24 mois de traitement, les effets observés aux doses supérieures étaient localisés sur la rate, le foie, la moelle épinière et la vessie.

Des effets similaires sur le sang et le foie ont été observés chez des animaux ayant respiré ou ingéré du TNT. Ces effets s'accompagnent d'un accroissement de la rate et de perturbations du système immunitaire. Les effets du TNT sur l'homme peuvent être une forte irritation de la peau lors d'un contact prolongé (365 jours ou plus) et un développement de cataracte. D'autre part, les ouvriers impliqués dans la production des explosifs qui ont été exposés à de fortes concentrations de TNT subissent des effets nocifs pour leur santé comme des anémies et des dysfonctionnements du foie (ATSDR, 1995). La dose chronique par voie orale pour l'homme de 0,005 mg/kg/jour a été calculée en extrapolant les résultats d'une étude sur les chiens où l'effet observé était une lésion du foie (USEPA, 1993b). Les recommandations sanitaires de l'US EPA sont de 2 µg de TNT par litre d'eau potable.

I.2.3 Bio-dépollution des explosifs

La bio-dépollution repose sur l'intervention de micro-organismes pour diminuer la contamination. Comme dans le cas de la phyto-dépollution, il existe des micro-organismes qui vivent naturellement dans les sols même dans des conditions extrêmes de températures, de pH ou de toxicité des polluants. Parmi ces micro-organismes, certains peuvent dégrader partiellement ou totalement les contaminants. En cas de dégradation partielle, ils peuvent modifier le type de contamination du sol. Il est donc important de connaître l'action des micro-organismes sur les polluants. La connaissance du métabolisme des polluants chez les micro-organismes permet d'établir un parallèle avec le métabolisme dans les plantes dans le cas d'une étude de phyto-dépollution. Il est même possible d'optimiser la métabolisation du polluant par transgénèse. La bio-dépollution des explosifs a été surtout très étudiée dans un objectif de découvrir des micro-organismes pouvant être inoculés dans des bio-réacteurs ou directement *in situ* et dégrader le polluant. Ainsi, de nombreux micro-organismes capables de dégrader ou de minéraliser les explosifs ont été identifiés à partir de souches isolées sur des sols et des eaux contaminés (Lee et Brodman, 2004).

I.2.3.1 Procédés de bio-dépollution

Plusieurs technologies basées sur des processus biologiques ont été développées pour la dépollution de sols contaminés par les explosifs, les principales étant l'utilisation de bio-réacteurs

avec de la boue, le compostage et le "land farming" (Esteve-Núñez *et al.*, 2001 ; Snellinx *et al.*, 2002). Toutes ces technologies nécessitent un travail *ex situ*, les sols doivent donc être excavés.

Pour les bioréacteurs en condition anaérobie, l'objectif final est de minéraliser le polluant ou de diminuer sa biodisponibilité ou celle des métabolites en les liant de façon irréversible à la matrice. Cette technologie n'est pas très efficace et semble nécessiter des phases en aérobie.

Lors du compostage, le sol est mélangé avec des co-produits de l'agriculture (paille de luzerne, tiges de betteraves à sucre et déchets végétaux). Le compostage est réalisé en extérieur, en alternant des phases aérobie et anaérobie par aération régulière du mélange. Cette biotechnologie est efficace pour diminuer la toxicité des sols mais elle nécessite des temps d'incubation très longs et les coûts de mise en place et de maintenance sont élevés.

Le "land farming" est un traitement en phase solide dans lequel les sols contaminés sont mélangés avec des nutriments et de la moisissure en aérant périodiquement. Cette méthode nécessite toutefois un contrôle des flux hydriques à cause de la solubilité du polluant et de ses métabolites.

Dans tous les cas, un suivi intensif et une évaluation finale de la dépollution sont nécessaires pour la prise en compte de la protection de l'environnement (Ramos *et al.*, 2005). Ces traitements sont ainsi adaptés à des contaminations élevées en explosifs et relativement localisées, ils sont peu adaptés à des pollutions faibles et diffuses. De plus, cette technologie *ex situ* implique une altération de l'environnement difficile à remédier.

I.2.3.2 Biodégradation du RDX

De nombreuses études de biodégradation du RDX en condition anaérobie *ex-situ* ont montré qu'il peut être réduit successivement en hexahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triazine (MNX), puis en hexahydro-1,3-dinitroso-5-nitro-1,3,5-triazine (DNX) et enfin en hexahydro-1,3,5-trinitroso-1,3,5-triazine (TNX) (Hawari *et al.*, 2000 ; Van Aken *et al.*, 2004). Après la rupture de liaisons N-NO₂ ou de liaisons carbone hydrogène sur le cycle, la molécule devient instable et elle subit une décomposition spontanée qui pourrait être non enzymatique (Figure I.10). La molécule est alors transformée en dérivés hydroxylamine-RDX suivi d'un clivage du cycle pour donner, comme produits intermédiaires ou produits finaux, de l'hydrazine (NH₂NH₂), de la 1,1-

diméthylhydrazine [(H₃C)₂ NNH₂], de la 1,2-diméthylhydrazine (H₃CHNNHCH₃), du formaldéhyde (HCHO) et du méthanol (CH₃OH). Ces composés sont toxiques et ne doivent pas être accumulés par les micro-organismes pour éviter toute exposition de la faune. Plus récemment, une autre voie de métabolisation a été mise en évidence avec un clivage direct du cycle précédant une quelconque réduction. Durant les deux voies de métabolisation, des mélanges bactériens différents ont été employés. Il semble aussi difficile, malgré les nombreuses études, d'élucider les mécanismes biochimiques (enzymatiques et métaboliques) intervenant dans le processus de biodégradation anaérobie du RDX. Le RDX est toutefois facilement utilisé comme source d'azote (Snellinx *et al.*, 2002). Le RDX est d'abord transformé en nitrites que les bactéries vont utiliser dans la synthèse de constituants cellulaires. Pourtant, aucune autre information sur les métabolites intermédiaires, les voies métaboliques et les enzymes impliquées n'a pu être mise en évidence (Priestley *et al.*, 2006).

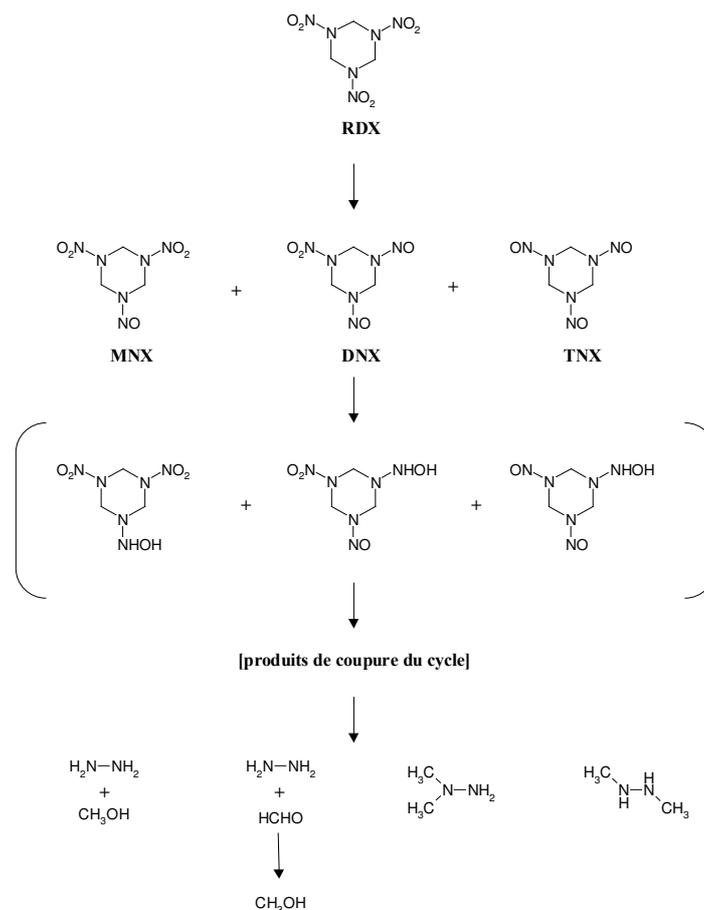


Figure I.10. Principales voies de biodégradation du RDX en conditions anaérobie (d'après Hawari *et al.*, 2000).

En condition aérobie, le RDX est en général beaucoup plus résistant à une attaque microbienne. De nombreuses études ont établi qu'il était toutefois possible de minéraliser totalement ou partiellement le RDX et d'obtenir du CO₂ et du NO₂ ou des métabolites non toxiques suggérant la possibilité d'une utilisation pour dépolluer des sols contaminés. Cette situation est différente de la biodégradation du RDX en conditions anaérobies qui peut produire des composés mutagènes ou carcinogènes (Snellinx *et al.*, 2002). Le RDX a été également minéralisé par le champignon *Phanerochaete chrysosporium* mais la minéralisation est très lente (Sheremata et Hawari, 2000). En 60 jours, seulement 52% du RDX total de la solution initiale à 62 mg/l a été minéralisé.

La dégradation du RDX a été réalisée avec succès dans des microcosmes mais la mise en place d'une bio-dégradation *in situ* nécessite une distribution des cellules dégradant l'explosif sur la zone contaminée (Priestley *et al.*, 2006). Cette étape nécessiterait une addition des micro-organismes puis une homogénéisation des sols qui est difficile à réaliser *in situ*.

I.2.3.3 Biodégradation du TNT

Les micro-organismes, bactéries et champignons, sont capables de dégrader le TNT en condition aérobie mais aussi anaérobie.

En condition aérobie, les bactéries transforment le TNT en réduisant un ou deux groupements nitrés formant ainsi des hydroxylamino-dinitrotoluènes (HADNT), des amino-dinitrotoluènes (ADNT) et des diamino-nitrotoluènes (DANT) (Figure I.11) (Esteve-Núñez *et al.*, 2001 ; Hughes *et al.*, 1998). Ces composés sont tout aussi toxiques que le TNT en ce qui concerne la cytotoxicité et la mutagénicité sur des cellules de mammifère (Honeycutt *et al.*, 1996). De plus, ces composés étant eux-mêmes très persistants, ils sont un obstacle sérieux pour les procédés de bio-dépollution. Il a aussi été montré que les HADNT peuvent réagir entre eux en présence d'oxygène et former des azoxytétranitrotoluènes. Ces composés sont eux-mêmes très récalcitrants à une dégradation ultérieure et sont plus toxiques que le TNT (Esteve-Núñez *et al.*, 2001). Les bactéries aérobie sont capables de réduire deux des trois groupes NO₂, la réduction du troisième groupe nécessitant des conditions anaérobies. Ainsi, certaines souches sont capables d'utiliser le TNT comme unique source d'azote. Le clivage du noyau aromatique du TNT ne semble toutefois pas possible chez les bactéries sauf exceptionnellement et avec une faible efficacité comme, par exemple, chez les espèces *Pseudomonas* (Oh *et al.*, 2003) et *Enterobacter*.

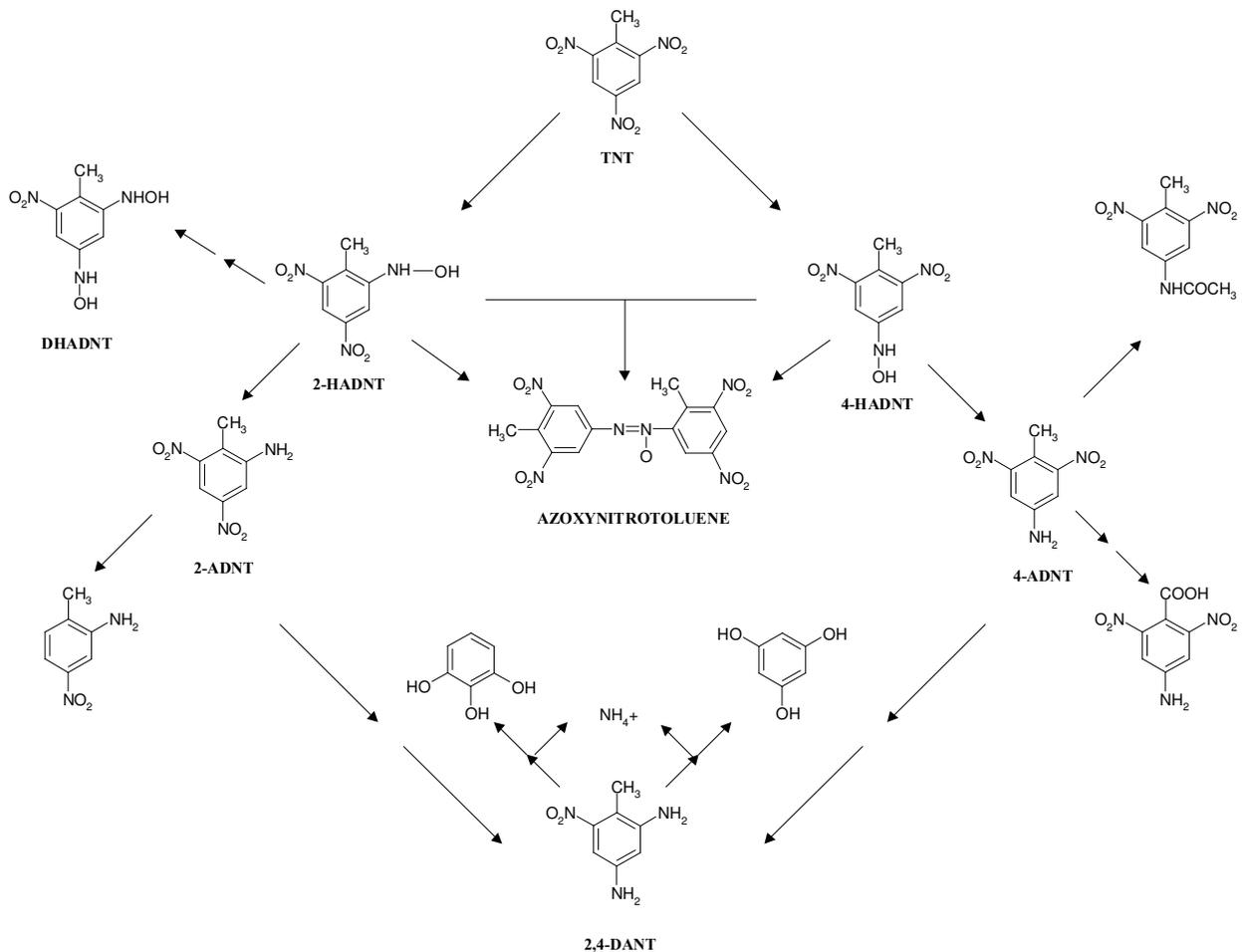


Figure I.11. Principales voies de biodégradation du TNT en conditions aérobie (d'après Esteve-Núñez *et al.*, 2001).

En condition anaérobie, la souche la plus étudiée est *Clostridium* (Esteve-Núñez *et al.*, 2001). Les bactéries réduisent rapidement le TNT car il n'y a pas de polymérisation (formation d'azoxy) en absence d'oxygène. Toutefois, aucune minéralisation n'est obtenue. Cette voie de dégradation du TNT aboutit à l'accumulation de triamino-toluène (TAT) mais elle n'est pas suffisamment efficace pour la bio-dépollution des sites pollués.

Les champignons sont aussi capables de dégrader le TNT (Esteve-Núñez *et al.*, 2001). La voie majeure de dégradation est la réduction des groupes nitrés aboutissant à l'accumulation d'ADNT, de HADNT et de composés azoxy. Toutefois, le champignon *Phanerochaete chrysosporium* a été très étudié, il est capable de minéraliser l'ADNT (Fernando *et al.*, 1990). Il semble toutefois que

les taux de minéralisation ne soient pas encore optimaux pour concurrencer les méthodes classiques de dépollution.

Les voies de dégradation du TNT sont très complexes et font appel à des micro-organismes nombreux et variés. Tous les micro-organismes ne peuvent pas coexister, à cause de leur vitesse de croissance, de la compétition pour les nutriments et de la production naturelle d'antibiotiques. L'exploitation des micro-organismes pour la dépollution des sols et eaux contaminés par le TNT nécessite plus de connaissances sur les voies de dégradation du TNT à cause de la phase de réduction du 3^{ème} groupement nitré qui doit avoir lieu en anaérobie stricte (Snellinx *et al.*, 2002).

La cytotoxicité des métabolites majeurs du TNT (4-HADNT, 2-ADNT, 4,4',6,6'-tétranitro-2,2'-azoxytoluène et 2,2',6,6'-tétranitro-4,4'-azoxytoluène) a été étudiée sur des cellules H4IIE et CHO-K1 (Honeycutt *et al.*, 1996). La LC50 du TNT était de 24 µg/ml. Sur ces lignées cellulaires, les quatre métabolites testés se sont révélés autant cytotoxiques, entre 3 et 18 µg/ml, que le TNT. Le compostage du TNT réduit bien les niveaux en composé parent mais le risque reste incertain à cause de la formation de métabolites cytotoxiques.

I.2.4 Phyto-dépollution des explosifs

Les nombreux avantages de la phyto-dépollution ont généré de nombreuses études sur les processus mis en œuvre et sur le devenir des résidus résultant de la biotransformation par les plantes. Dans le cas des explosifs, la phyto-dépollution semble être une alternative adaptée pour pallier les défauts des autres méthodes. Elle peut aussi être utilisée en complément des méthodes plus classiques. Les études préalables de phyto-dépollution du RDX et du TNT ont montré que les plantes sont capables d'absorber et de métaboliser ces deux explosifs.

L'efficacité de la dépollution peut être mesurée par le facteur de bioconcentration qui est défini comme le rapport de la concentration d'un composé dans l'organisme ou le tissu cible sur la concentration dans l'environnement ou l'alimentation (Best *et al.*, 2006). Il permet de connaître la capacité de la plante à accumuler le composé.

I.2.4.1 Absorption, transfert et métabolisme du RDX

Comme présenté dans le chapitre précédent (cf. I 2.2.2), l'absorption racinaire et le transfert vers les parties aériennes sont gouvernés par divers facteurs et notamment les propriétés lipophiles des composés organiques représentées par le coefficient de partage octanol-eau K_{ow} . Le $\log K_{ow}$ du RDX étant de 0,87, il peut être théoriquement absorbé et transformé par les plantes. La phyto-extraction semble donc envisageable comme méthode de décontamination du RDX.

L'absorption et le devenir du RDX ont été étudiés sur divers types de plantes : des plantes aquatiques, des plantes agronomiques, le peuplier et des plantes endogènes de sites contaminés. Diverses conditions de cultures ont été testées. Ainsi, le haricot (*Phaseolus vulgaris*) cultivée durant 7 jours en milieu hydroponique contaminé à 10 mg/l a accumulé 114 mg de RDX par kg de poids sec (Harvey *et al.*, 1991). Le facteur de bioconcentration du RDX était donc de 11,4. De plus, 85% de la quantité absorbée étaient localisés dans les feuilles. L'analyse des tissus en CLHP a montré que plus de 90% de la radioactivité extraite correspondait à du RDX, le reste n'ayant pas été analysé en CLHP, il peut s'agir aussi de RDX. Dans une étude similaire, Thompson *et al.* (1999) ont montré que plus de 60% du RDX absorbé par des peupliers hybrides (*Populus deltoides x nigra*, DN34) étaient transférés vers les feuilles après seulement sept jours d'incubation en conditions hydroponiques. La répartition du RDX dans les différentes parties de la plante était la même après 2 ou 7 jours de contamination. Les peupliers ont été choisis pour la phyto-dépollution car ils ont une croissance rapide et consomment de grandes quantités d'eau. Ils ont accumulé entre 350 et 720 mg/kg en fonction de la concentration en RDX dans la solution hydroponique conduisant à des facteurs de bioconcentration allant de 27 à 44. Les peupliers semblent donc plus efficaces que la fève pour l'accumulation du RDX. Même si aucun métabolite du RDX n'a été observé chez les deux plantes, des résidus non extractibles sont retrouvés dans les deux cas et représentent respectivement 14 et 15%. La présence de résidus non extractibles suggère une transformation du RDX dans la plante. Une étude plus récente (Yoon *et al.*, 2006) sur les peupliers a confirmé les capacités d'accumulation du RDX après 12 jours de culture hydroponique. Dans ce cas, aucun métabolisme n'a été observé.

Dans différentes études, Best *et al.* (1999 ; 1997) ont étudié les capacités d'absorption et de distribution du RDX de différentes plantes aquatiques submergées et émergées. Dans la première

étude (Best *et al.*, 1997), elles ont été cultivées durant 10 jours dans des eaux lagunaires recueillies sur le site d'une usine militaire de production d'explosifs (Burlington, Iowa). Le RDX a été dosé dans les eaux à 12785 µg/l. Certaines plantes émergentes ont accumulé de grandes quantités de RDX : *Alisma subcordatum* (218 µg/g), *Scirpus cyperinus* (179 µg/g), *Sagittaria latifolia* (144 µg/g) et *Carex vulpinoidea* (102 µg/g). Leurs facteurs de bioconcentration respectifs étaient les suivants : 17, 14, 11 et 8. Les plantes submergées avaient un facteur de bioconcentration d'environ 15. Dans la seconde étude (Best *et al.*, 1999), les plantes ont été récoltées sur un autre site militaire de production d'explosifs (Milan, Tennessee). Elles ont été cultivées dans une solution nutritive puis le RDX et son équivalent radiomarqué ont été rajoutés pour obtenir une concentration finale de 1529 µg/l. Après 13 jours de culture, les plantes ont été analysées. Les plantes émergentes contenaient beaucoup moins de RDX que les plantes submergées, les facteurs de bioconcentrations variaient respectivement de 12 à 27 contre 1 à 7. Ces résultats confirment les observations précédentes montrant que les plantes sont capables d'absorber de grandes quantités de RDX. De plus, il s'est avéré que le RDX était principalement accumulé sous forme de molécule parente dans les tissus végétaux fraîchement synthétisés. Dans une étude récente du même auteur (Best *et al.*, 2006), de la luzerne (*Medicago sativa*) et de l'ivraie ou ray-grass anglais (*Lolium perenne*) ont été cultivées sur des sols non contaminés mélangés avec différentes proportions d'un sol provenant de Picanthy (New Jersey) contaminé à 1540 mg/kg de RDX. Après 55 jours de culture, les plantes cultivées sur les sols les plus contaminés contenaient 4155 et 3068 mg de RDX par kg de poids sec, les facteurs de bioconcentration respectifs étaient de 3 et 2. Aux concentrations plus basses, le facteur de bioconcentration est plus élevé (jusqu'à 58) en raison de la faible quantité de RDX dans le sol.

Bhadra *et al.* (2001) ont étudié le devenir du RDX (8 mg/L) chez une plante aquatique (*Myriophyllum aquaticum*) après 16 jours et sur des cultures racinaires stériles (*Catharanthus roseus*) après plus de neuf semaines. L'ajout de RDX radiomarqué a permis de confirmer que le RDX a été absorbé par les deux systèmes. Dans cette étude, les plantes aquatiques ont absorbé plus de 60% du RDX présent contre 20% pour les cultures racinaires. La radioactivité a été détectée uniquement sous forme de RDX, de dérivés non liés (5%) et de résidus liés non identifiés (6-8% du [¹⁴C]-RDX introduit dans le milieu).

Thorne (1999) a envisagé l'utilisation de chanvre (*Hibiscus cannabinus*) pour dépolluer les sols contaminés par les explosifs car cette plante consomme de grandes quantités d'eau et produit une

grande quantité de biomasse. De plus, une fois récoltée, elle possède une valeur ajoutée avec la production de fibres et de sorbants biodégradables. Ces plantes ont donc été cultivées sur des sols contaminés avec deux concentrations de RDX (contamination modérée : 142 mg/kg et contamination élevée 6600 mg/kg) ou bien sur des sols non contaminés irrigués avec une eau contaminée (12 litres d'eau contenant : 12,4 mg/L de RDX). Après deux mois de culture, le RDX se retrouve à des concentrations modérées dans les racines et les tiges mais à de fortes concentrations dans les feuilles. En effet, le chanvre cultivé sur un sol non contaminé irrigué par de l'eau contaminée absorbe et transfère de plus grandes quantités de RDX, jusqu'à 3130 mg/kg, que dans le cas de sols contaminés, entre 787 et 1350 mg/kg. Le facteur de bioconcentration dans le cas d'irrigation était de 93 alors que pour les sols contaminés il est inférieur à 1,5. Cette différence est probablement due à la différence de concentration dans le sol mais aussi à la biodisponibilité dans le sol, dans le cas de l'irrigation, le RDX est directement disponible pour la plante, alors que dans le sol, il doit d'abord se solubiliser dans la phase aqueuse. Aucun nitroso-RDX n'a été détecté dans les analyses. D'autre part, les plantes ont été mixées avec les sols humidifiés pendant deux mois ; après deux mois, la majorité du RDX se retrouve dans les eaux de lavage ou les extraits organiques (acétonitrile). Ceci signifie qu'ils ne sont transformés ni dans la plante ni dans le sol et qu'ils restent biodisponibles après passage dans les plantes. De plus, du nitroso-RDX, composé toxique, est retrouvé en faible quantité dans les sols. Le chanvre ne semble donc pas une plante qui stimule suffisamment les micro-organismes pour permettre la bio-dépollution du RDX. Cependant, c'est une plante qui absorbe et transfère le RDX en grande quantité. Il est ainsi possible d'envisager la mise en place d'un processus de phyto-extraction suivi d'une destruction des plantes après concentration des explosifs dans les parties aériennes.

Lors d'une autre étude sur sol contaminé, des plantes agronomiques (laitue, tomate, radis, maïs et souchet comestible) ont été cultivées durant 45 jours sur des sols contaminés pour déterminer le transfert du polluant dans les parties comestibles des plantes (Price *et al.*, 2002). La laitue était la seule plante dont la partie comestible a accumulé de grandes quantités de RDX, 1172 mg/kg (facteur de bioconcentration de 20). Dans le cas d'un arrosage avec de l'eau contaminée, aucune partie comestible des différentes plantes n'accumulait le RDX avec un facteur de bioconcentration supérieur à 1. Les quantités accumulées dans les légumes sont trop faibles pour permettre une dépollution efficace mais elles représentent tout de même un risque pour le consommateur même si les sols sont faiblement contaminés. Il est, par conséquent, nécessaire de

contrôler les niveaux de contamination après un processus de dépollution dans le but d'une réhabilitation du site.

Dans des extraits de souchet comestible (USEPA method 8330), l'hexahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triazine (MNX), connu comme intermédiaire du RDX chez les micro-organismes, a été observé mais en quantité constante quelle que soit la quantité de RDX (Larson *et al.*, 1999). Ceci semble confirmer que le MNX serait un produit mineur de la transformation du RDX ou un intermédiaire qui serait transformé plus tard en composés inconnus. De plus, lors de cultures de tomate, laitue, maïs et de radis arrosées avec de l'eau contaminée par le RDX, des molécules de poids moléculaire ou volume plus important que la molécule parent ont été observées.

Le concept du "green liver" envisagé pour la détoxification des composés xénobiotiques (Sandermann, 1992) dans les tissus végétaux spécifie que la transformation, la conjugaison et la compartimentation caractérisent le devenir du produit chimique. Cependant, dans le cas du RDX, la transformation et la conjugaison, mécanismes catalysés par des enzymes, n'ont pas été clairement mises en évidence chez les plantes étudiées. Pourtant, un autre mécanisme pourrait être impliqué en amont de ces deux étapes : la phyto-photolyse (Just et Schnoor, 2004). Les auteurs suggèrent que la photolyse du RDX serait facilitée par la mise en solution du produit dans la plante et par son transfert vers les feuilles et les organites responsables de la photolyse. Les pigments végétaux sont soupçonnés de transférer des excès d'énergie vers le RDX afin de faciliter sa photolyse et d'aboutir à une dégradation partielle libérant du N_2O , du CH_2O (formaldéhyde) et aussi du 4-nitro-2,4-diazabutanal (produit hautement toxique). Le formaldéhyde pourrait alors être conjugué avec du glutathion et donner du S-formylglutathion qui serait capable de former des résidus liés.

Cette liste non exhaustive des publications traitant de l'absorption et du devenir du RDX dans les plantes montre bien le manque de données sur les capacités d'absorption d'une plus grande diversité de plantes et sur les modes d'accumulation du RDX afin d'en optimiser la phyto-dépollution. Le métabolisme du RDX n'a pas été élucidé chez les plantes. Même si certaines études sur tissus permettent d'observer des métabolites, ces observations ne sont pas confirmées lors de culture sur plantes entières. Les études sur l'absorption et le transfert de RDX radiomarké montrent qu'il est rapidement transféré dans les tissus foliaires, comme cela était pressenti en regard de son $\log K_{ow}$, et que la forme prédominante est le produit parent. Cette

absence de métabolisation coïncide avec la présence de liaisons azote-azote qui le rendent récalcitrant aux dégradations biologiques. Il semble donc possible d'utiliser les plantes pour absorber et transférer vers les parties aériennes de grandes quantités de RDX. Toutefois, une étude sur des plantes terrestres (concombre, maïs, ivraie, blé, laitue, tournesol...) a montré que des effets négatifs sur le développement (chloroses, nécroses et diminution de la taille des fleurs) apparaissaient après six semaines de culture (Winfield *et al.*, 2004). Ces effets néfastes étaient plus souvent observés chez les dicotylédones que chez les monocotylédones. Ces dernières devraient donc être préférées dans un processus de phyto-dépollution.

I.2.4.2 Absorption, transfert et métabolisme du TNT

Le log K_{ow} du TNT étant de 1,6, cette molécule peut être absorbée par la plante et transformée par celle-ci. Contrairement au RDX, le TNT est facilement métabolisé par les micro-organismes. Le TNT ne possède pas de sites réactifs permettant sa conjugaison directe à des sucres, une transformation initiale est alors nécessaire. Ces caractéristiques ainsi que la grande quantité de sites connus pour être contaminés par cet explosif a engendré de nombreuses études sur la phyto-dépollution du TNT. Certaines d'entre elles ont été réalisées en parallèle sur le RDX et le TNT, lorsque ce sera le cas, les protocoles ne seront pas réexpliqués.

Plusieurs études ont montré que le TNT est éliminé de solutions hydroponiques lorsque des plantes sont ajoutées dans le milieu. Ainsi, la croissance du souchet comestible cultivé durant 40 jours en solution hydroponique contenant du TNT a été affectée par la présence de TNT quelle que soit la concentration (entre 5 et 20 mg/l) (Palazzo et Leggett, 1986). Les plantes ont été analysées en chromatographie en phase gazeuse pour déterminer leur contenu en TNT, 2-ADNT et 4-ADNT. Les plus fortes quantités ont été retrouvées dans les racines et aux concentrations les plus élevées : TNT, 714 $\mu\text{g/g}$; 2-ADNT, 614 $\mu\text{g/g}$; 4-ADNT, 2180 $\mu\text{g/g}$. La formation du 4-ADNT semble privilégiée au détriment du 2-ADNT. L'accumulation du TNT et de ses métabolites majeurs dans les racines a été confirmée par Harvey *et al.* (1990) sur des cultures hydroponiques de fèves naines durant 7 jours. Les quantités retrouvées étaient beaucoup plus faibles que précédemment, certainement à cause de la durée plus courte de l'expérimentation. Les isomères des ADNT n'ont pas été séparés lors de l'analyse.

Görge *et al.* (1994) ont montré que la longueur des racines de *Medicago sativa* et *Allium schoenosprasum* a été diminuée par la présence de TNT à des concentrations supérieures à 5 mg/l. Pour des concentrations supérieures à 50 mg/L, la croissance des végétaux est totalement inhibée. L'absorption et l'accumulation du TNT et des ADNT dans la plante sont dépendantes de l'organe récepteur, du type de plante et de la concentration en TNT dans le milieu. Dans les racines, ces plantes accumulent jusqu'à 13 mg/g de TNT et 94 et 82 mg/g de 4- et 2-ADNT. Cette observation a été confirmée par Vanderford *et al.* (1997) qui ont montré que les racines de myriophylles cultivés en milieu hydroponique contaminé à 80 mg/l de TNT accumulent la plus grande partie de la radioactivité absorbée par la plante.

Au cours d'une expérience sur 11 plantes, aucune différence notable dans l'absorption du TNT et la répartition des métabolites dans la plante entre les monocotylédones et les dicotylédones n'a été observée (Scheidemann *et al.*, 1998). Les profils de distribution du TNT et de ses métabolites nitrés dans la plante étaient différents selon les plantes, peut-être à cause du métabolisme ou d'une absorption différents. Après 28 jours de culture hydroponique, la majorité des métabolites détectables ont été extraits des tissus racinaires et le TNT ne représentait plus que 8% de la radioactivité présente dans les racines contre 80% pour les ADNT (extraction en phase acide).

Dans son étude sur les plantes aquatiques, Best *et al.* (1999) ont montré que le TNT est rapidement absorbé mais qu'il est très peu mobile dans les plantes. Les plantes submergées concentrent plus de radioactivité que les plantes émergentes (respectivement 513 et 65 $\mu\text{g/g}$ au maximum).

Plus récemment, une étude de Thompson *et al.* (1998) a permis de déterminer l'absorption et la transformation du TNT par des peupliers hybrides (*Populus sp. Deltoïdes x nigra*, DN 34). Seulement 10% de la radioactivité a été transféré vers les feuilles. La biodisponibilité du TNT s'est révélée supérieure dans un milieu hydroponique que dans le sol. Toutefois, le milieu n'a pas affecté la distribution du TNT radiomarqué entre les différents tissus. La majorité du TNT n'était pas extractible dans les tissus végétaux et moins de 10% des extraits ont été identifiés en CLHP. Les produits de la transformation retrouvés sont le 4-ADNT, le 2-ADNT, le 2,4-DANT et d'autres composés non identifiés.

Sens *et al.* (1999) ont déterminé la répartition du TNT dans les compartiments cellulaires du blé (*Triticum sativum*). 95% du ^{14}C sont accumulés dans les racines après 14 jours de culture des

plantes dans un milieu hydroponique contenant du ^{14}C -TNT. Par un fractionnement spécifique, 43% de la radioactivité ont été localisés dans le cytoplasme et 57% dans la paroi des cellules racinaires. Cette distribution est la même dans les cellules des feuilles. 27% des 57% localisés dans la paroi cellulaire sont répartis dans la fraction lignifiée. Deux métabolites non polaires du TNT sur trois ont été identifiés comme étant le 2-ADNT et le 4-ADNT. D'autres composés plus polaires ont été trouvés mais non identifiés.

Lors de l'expérimentation de Price *et al.* (2002) (protocole cf. I.2.4.1), le TNT n'a pas été détecté dans les plantes agronomiques encore moins dans les parties comestibles. Kim *et al.* (2004) ont montré que, lors d'une culture en solution hydroponique contenant du TNT radiomarké durant 48 h, l'oignon a accumulé dans les racines 75% de la radioactivité présente et seulement 4,4% dans les feuilles. Cette étude confirme le faible taux de transfert du TNT et de ses métabolites vers les parties aériennes de la plante (5% de la quantité absorbée par la plante). Parmi quatre hélrophytes (*Phragmites australis*, *Typha latifolia*, *Carex gracilis* et *Juncus glaucus*) testées pour leur capacité à absorber et dégrader le TNT radiomarké, *P. australis* s'est révélée être la plante la plus efficace après 10 jours de culture hydroponique (Nepovim *et al.*, 2005). 84% de la radioactivité absorbée étaient localisés dans les racines dont 34% sous forme non extractible.

De nombreuses études ont spécialement été orientées vers le métabolisme du TNT dans la plante. Une grande partie de ces études a été réalisée sur le myriophylle (*Myriophyllum aquaticum* ou *M. spicatum*). Hughes *et al.* (1997) ont montré que le myriophylle en culture hydroponique était capable de diminuer la quantité de TNT dans le milieu et de le transformer dans ses tissus. Pas de TNT, peu d'ADNT (moins de 6% du contenu des extraits) et pas de minéralisation ont été observés dans les plantes, les métabolites du TNT n'ont pas été identifiés. Seulement 27% du carbone radiomarké a pu être extrait des tissus végétaux. Lors d'une autre étude (Pavlostathis *et al.*, 1998), dans les mêmes conditions, les formes réduites du TNT (HADNT, ADNT et DANT) représentaient moins de 20% de la radioactivité totale. Les autres métabolites n'ont pas été identifiés. Dans ces deux études, des résidus non extractibles ont été obtenus (entre 10 et 20% de la radioactivité des cellules). La présence d'ADNT et d'une grande

quantité de résidus non extractibles a aussi été observée chez *M. aquaticum* par Medina *et al.* (2000 ; 2000).

Lors d'études portant sur le métabolisme du TNT dans des cellules en suspension de *Datura innoxia*, Lucero *et al.* (1999) ont montré que la sensibilité des cellules au TNT varie en fonction de l'âge des cellules. Les ADNT apparaissent comme des métabolites intermédiaires car leur concentration commençait à diminuer dès 3 heures de culture. Le total des ADNT n'excédait jamais 26% du TNT initial ce qui suggère que d'autres étapes de biotransformation interviennent ultérieurement à la réduction. Les métabolites inconnus ont été identifiés par CLHP, Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et hydrolyses enzymatiques (Bhadra *et al.*, 1999b). Ces métabolites étaient des ADNT conjugués à des sucres à 6 carbones. Le TNT semble ainsi se comporter comme la plupart des xénobiotiques. Il serait pris en charge dès son entrée dans la cellule par des enzymes de phase I qui le transforment en ADNT. Les ADNT seraient ensuite rapidement conjugués grâce à des enzymes de phase II (Sandermann, 1992).

Des myriophylles cultivés en solution hydroponique contaminée avec du TNT par un flux entrant et sortant continu ont effectivement diminué les quantités de TNT dans le milieu sans accumulation de TNT et d'ADNT dans les tissus (Rivera *et al.*, 1998). Le TNT a été transformé par photolyse en 1,3,5-trinitrobenzène (TNB). Dans cette molécule, l'absence de groupement méthyle limite la réduction des groupements nitrés pour permettre la formation de 3,5-dinitroaniline (DNA) (Figure I.12). Le TNB a été retrouvé dans les tissus végétaux mais tous les métabolites n'ont pas été identifiés.

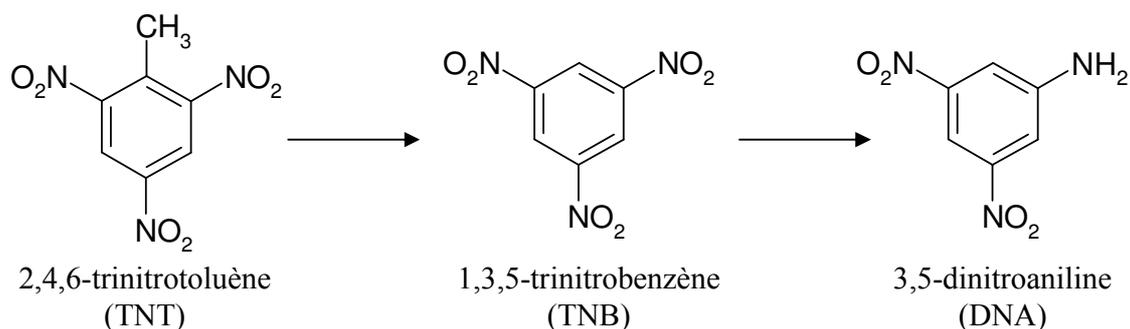


Figure I.12. Formation du TNB et du DNA par transformation par photolyse puis réduction biologique (d'après Rivera *et al.*, 1998).

Une voie de biotransformation oxydative a été mise en évidence chez *Myriophyllum aquaticum* (Bhadra *et al.*, 1999a). L'oxydation a été observée sur le groupement méthyle ou directement sur le cycle. Lors de la détoxification des herbicides, l'oxydation est la première étape qui précède leur conjugaison, elle est catalysée par des oxydases, généralement des enzymes à cytochrome P-450 (Sandermann, 1992). Des composés binucléaires non identifiés ont aussi été retrouvés dans le milieu de culture. Cette étude est la seule qui ait démontré la présence de métabolites oxydés. Effectivement, Adamia *et al.* (2006) ont montré que cette voie d'oxydation du TNT n'était pas la voie prédominante lors de la dégradation du TNT par le soja. Le dosage de l'activité des nitroréductases en présence de TNT a montré qu'elles étaient les principales responsables de la dégradation du TNT. La voie oxydative est bien présente mais la voie majeure de dégradation du TNT reste tout de même la réduction des groupements nitrés. L'activité des nitroréductases semble être un bon indicateur biochimique pour orienter le choix des plantes efficaces pour la phyto-dépollution du TNT.

Les métabolites obtenus lors de la phyto-dépollution du TNT présentent une toxicité importante pour la plante. En effet, Pavlostathis *et al.* (1998) ont observé des chloroses importantes sur des myriophylles cultivés durant 123 h en milieu contenant du TNT alors que l'analyse des plantes a montré qu'il n'y avait plus de TNT. Il est donc essentiel de déterminer les risques (devenir, toxicité et biodisponibilité) liés aux métabolites solubles et aux résidus liés.

Une étude *in situ* (Koehler *et al.*, 2002) a été réalisée sur une année complète pour mesurer l'évolution de la toxicité d'un sol contaminé (Harz, Allemagne) en fonction du traitement du sol : nivellement du sol, ajout de champignons ou plantations d'arbustes mycorrhizés (peuplier, aulne et épicea). Les biotests réalisés ont été les suivants : croissance végétale, reproduction des collemboles, respiration du sol, toxicité et mutagénicité des éluats évalués avec *Vibrio fischeri*. La phyto-dépollution s'est révélée efficace pour diminuer la toxicité des sols et des éluats, donc de la biodisponibilité des polluants. Le processus s'est, toutefois, révélé plus efficace lorsqu'il était couplé au traitement préalable du sol. De plus, l'utilisation d'espèces arbustives mycorrhizées suppose une intervention des mycorrhizes dans la dégradation du TNT dans le sol et l'absorption du TNT ou des métabolites par la plante.

En conclusion, le TNT est bien absorbé par les plantes et transformé au niveau des racines, principalement par réduction, puis il semble que les produits soient principalement stockés sous

forme de résidus non extractibles ou transférés en faible proportion vers les tissus aériens. Les taux d'absorption et de transfert varient en fonction de la plante étudiée. L'intervention des nitroréductases dans la dégradation du TNT est essentielle, le choix des plantes doit tenir compte de leur activité.

I.2.4.3 Utilisation de plantes transgéniques

La transformation de plantes avec des gènes bactériens exprimant des enzymes capables de dégrader les explosifs représente une optimisation de la phyto-dépollution permettant d'augmenter la dégradation après absorption par la plante.

Ainsi, *Arabidopsis thaliana* a été transformée avec un gène isolé chez la bactérie *Rhodococcus rhodochrous* codant pour un cytochrome P450 dégradant le RDX (Rylott *et al.*, 2006). Cette enzyme est capable de dégrader le RDX en réduisant les groupes nitrés puis en ouvrant le cycle. Les plantes transformées se sont montrées beaucoup plus tolérantes à de fortes concentrations en RDX. De plus, elles accumulaient moins de RDX dans leurs parties aériennes, suggérant une dégradation du RDX après absorption par les plantes.

Lors de la transformation du TNT par les plantes, il n'y a pas de suppression complète des groupes NH₂ du TNT, elle aboutit alors à l'accumulation de métabolites toxiques. Or, certains micro-organismes produisent des enzymes capables de dénitrifier le TNT. En transformant des plantes par une de ces enzymes (pentaérythritol tétranitrate réductase, nitroréductase, etc...), elles deviennent plus résistantes à de fortes concentrations en TNT (French *et al.*, 1999 ; Hooker et Skeen, 1999). D'autre part, ces plantes n'accumulent pas l'ADNT, composé hautement toxique. Plus récemment, Kurumata *et al.* (2005) ont montré l'efficacité de différentes plantes d'*Arabidopsis thaliana* exprimant différents gènes de nitroréductase bactérienne pour tolérer et absorber le TNT. L'utilisation de plantes transgéniques pour la phyto-dépollution *in situ* semble une voie efficace mais elle reste encore à explorer. De plus, les sites contaminés possèdent des composés variés (TNT, RDX, TETRYL, HMX, etc...), les plantes devront faire appel à plusieurs voies de métabolisation, ce qui pourra nécessiter l'introduction de multiples gènes.

CHAPITRE II

ABSORPTION ET TRANSFERT DES EXPLOSIFS CHEZ LES PLANTES AGRONOMIQUES

Grâce à leurs caractéristiques de croissance et leur production importante de biomasse, les plantes agronomiques, à l'exception du riz, sont a priori bien adaptées aux sites non lagunaires contaminés où la contamination est disséminée. C'est le cas des terrains d'essais militaires contaminés. Leur utilisation peut être envisagée dans les lagunes mais un assèchement préalable est indispensable. La culture de riz, par contre, ne nécessite pas cette étape car le riz peut pousser sur des zones inondées. Le choix des plantes doit également être orienté en fonction de leur capacité à tolérer de fortes concentrations en explosifs et de leur capacité à "épurer" le sol, quels que soient les mécanismes mis en jeu. Dans le cas de polluants organiques comme les explosifs, le principe le plus économique pour réaliser la phyto-dépollution est de favoriser l'absorption de grandes quantités de polluant et, secondairement, leur transformation éventuelle en composés non toxiques pour l'environnement. Dans ce cas, le procédé ne nécessite pas de traitement ultérieur et diminue les risques de dispersion dans l'environnement. Si la biotransformation n'a pas lieu, les plantes peuvent être récoltées et incinérées pour détruire l'agent toxique. Il est donc essentiel d'étudier la tolérance des plantes aux explosifs, mais aussi leur capacité à accumuler ces explosifs et le devenir des explosifs dans la plante.

II.1 Phytotoxicité et transfert du RDX et du TNT chez le riz

La phytotoxicité des polluants est une donnée indispensable pour la mise en place d'un processus de phyto-dépollution. En effet, les plantes qui vont être utilisées doivent être capables de tolérer la pollution et de croître sur le sol contaminé. La phytotoxicité se définit par la capacité pour une substance d'altérer passagèrement ou durablement les végétaux allant même jusqu'à leur mort. Les effets phytotoxiques peuvent être observés à la levée de la culture, durant son développement ou à la récolte. Les symptômes peuvent affecter la plante entière ou une partie seulement : racines, pousses, tiges, feuilles, fleurs, fruits. Certains paramètres peuvent faire l'objet de mesures (hauteur des parties aériennes, longueur des racines, poids des parties aériennes et des racines ou des organes échantillonnés). D'autres critères de phytotoxicité résultent d'estimations visuelles de l'intensité de la déformation ou de la décoloration. Cette dernière peut aussi être déterminée par une mesure de la quantité de chlorophylle des feuilles. Les tests permettant de mesurer la phytotoxicité sont des tests de germination, de croissance foliaire et de croissance

radiculaire. Pour le test de germination, les risques d'inhibition de la germination des semences mises en contact avec différentes concentrations du produit testé sont évalués. Le paramètre mesuré est le taux de germination. Pour les deux autres tests, les risques d'inhibition de la croissance des parties aériennes et des racines des végétaux supérieurs mis en contact avec différentes concentrations du produit testé sont évalués. Les paramètres mesurés sont le poids de matière fraîche et sèche des parties aériennes et des racines de la plante mais aussi leur taille maximale.

Pour l'étude de la phytotoxicité des explosifs, les trois types de tests ont été réalisés et complétés par la mesure de la quantité de chlorophylle. Les études d'inhibition de croissance ont été couplées à une mesure de l'absorption et du transfert des explosifs en fonction de la concentration initiale dans le sol.

Publication 1 : *Phytotoxicity to and uptake of RDX by rice* (Environmental Pollution, sous presse).

Publication 2 : *Phytotoxicity to and uptake of TNT by rice* (Environmental Geochemistry and Health, en révisions depuis octobre 2006)

Ces deux études ont permis d'évaluer la toxicité du RDX et celle du TNT pour le riz aux concentrations retrouvées sur certains sites qui peuvent aller jusqu'à 1000 mg d'explosif par kg de sol (Best *et al.*, 1997). Lors d'études de phytotoxicité sur la germination ou sur la croissance réalisées sur des périodes courtes (inférieures à 12 jours), la présence de RDX ne déclenche aucun effet sur les plantes alors que le TNT a un effet négatif sur la germination. Le RDX semble avoir un effet négatif sur la croissance des parties aériennes au bout de 40 jours pour les fortes concentrations étudiées. Dans le cas du TNT, aucun effet néfaste sur la croissance n'est observé. Il semblerait même que jusqu'à 500 mg/kg, le TNT ait un effet positif sur la croissance du riz. Les nécroses foliaires observées dans le cas du RDX peuvent limiter l'utilisation du riz pour des cultures à plus long terme bien que, dans notre étude, aucun effet sur la croissance n'ait été observé. Ces observations sont en désaccord avec les résultats d'autres études de toxicité qui montrent que le TNT est plus toxique que le RDX (Robidoux *et al.*, 2003). Ces études de toxicité

ont été réalisées sur des temps courts, inférieurs à 30 jours. Or, les nécroses dues à l'accumulation du RDX ne s'observent que lors d'expérimentations conduites sur des temps plus longs (40 jours). Dans ces études à court terme et dans nos études de germination, le TNT semble plus toxique que le RDX alors que, lors de nos études à long terme, le RDX a un effet toxique mais pas le TNT.

Par ailleurs, l'absorption du RDX est différente de celle du TNT puisque, pour une même concentration dans le sol, les quantités de RDX absorbées sont 40 fois plus élevées que celles de TNT. Les valeurs maximales absorbées par le riz pour le RDX et le TNT atteignent respectivement 31,5 mg/g et 0,8 mg/g. De plus, l'analyse du devenir des explosifs dans la plante montre que la distribution des deux composés est diamétralement opposée. Le RDX est majoritairement transporté vers les parties aériennes de la plante et plus particulièrement vers les extrémités des feuilles par le flux de transpiration. En revanche, le TNT reste séquestré au niveau des racines sous forme de résidus liés à la paroi ou sous forme de conjugués stockés probablement dans les vacuoles (Sandermann *et al.*, 1983).

Un phénomène de saturation de l'absorption des explosifs est observé à partir 1000 mg/kg de sol pour le RDX et 200 mg/kg pour le TNT. En deçà de ces valeurs, la concentration retrouvée dans la plante est proportionnelle à la concentration d'explosif dans le sol. Pour ces concentrations, l'absorption est bien un phénomène passif. Dans le cas du RDX, la saturation semble être due à la faible solubilité du RDX. Pour le TNT, la solubilité étant plus élevée, il semble peu probable qu'elle limite l'absorption à une concentration 5 fois plus basse que pour le RDX.

Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation du riz en tant que plante efficace pour la dépollution des explosifs nitrés tels que le RDX dans des sites contaminés de type lagunaire. Toutefois, le RDX n'étant pas dégradé par la plante, la récolte puis l'incinération des parties aériennes sont des étapes nécessaires pour diminuer efficacement la pollution. En revanche, pour le TNT, le riz ne semble pas capable d'absorber et de transférer des quantités suffisantes pour dépolluer efficacement dans des délais courts. Par conséquent, il est nécessaire d'étudier d'autres plantes avant de pouvoir proposer un processus de phyto-extraction concluant.

II.2 Absorption et transfert des explosifs chez des plantes agronomiques

Les études précédentes sur le RDX et du TNT chez le riz ont montré que leurs mécanismes d'absorption et de transfert étaient différents chez cette plante. Ces différences observées chez le riz doivent être confirmées chez d'autres plantes cultivées (maïs, blé et soja) durant 40 jours de culture. Ces plantes ne seront pas adaptées à des milieux humides.

Publication 3 : *Fate of RDX and TNT in agronomic plants* (Environmental Pollution, acceptée)

Cette étude confirme chez les autres plantes agronomiques testées, le blé, le maïs et le soja, les différences observées précédemment au niveau de l'absorption et du devenir des deux explosifs chez le riz. Le RDX est principalement accumulé dans les parties aériennes alors que le TNT, peu absorbé, reste séquestré dans les racines. Les nécroses observées chez le riz sont également observées chez le blé et le soja conduisant dans le cas du soja, plante dicotylédone, à la chute des feuilles nécrosées contenant de grandes quantités de RDX. Ce phénomène pose un problème important pour le contrôle de la dissémination de la pollution. Dans le choix des plantes, il faut donc privilégier des monocotylédones pour lesquelles nous n'avons pas constaté de chute de feuilles, même si, à terme, les parties nécrosées peuvent se déliter et être dispersées dans l'environnement. Les nécroses observées sur les feuilles âgées ne semblent pas affecter l'apparition de nouvelles feuilles.

D'autre part, les quantités d'explosifs retrouvées chez le riz sont beaucoup plus faibles que pour les autres plantes agronomiques testées. Le blé est la plante qui absorbe la plus grande quantité de RDX et de résidus du TNT dans ses parties aériennes et la plus grande quantité de résidus du TNT dans les racines. Dans nos conditions de culture, le blé a accumulé 64,5 mg/g de RDX dans les feuilles et 0,5 mg/g d'équivalent TNT dans les racines. Ensuite, viennent le soja, le maïs et enfin le riz. Les taux d'absorption et de transfert ne sont pas du tout les mêmes en fonction des plantes, il ne semble pas y avoir de facteur permettant de prévoir quelle sera l'efficacité d'une plante en matière d'absorption d'un composé particulier. Par exemple, le riz et le blé sont deux monocotylédones mais elles ont des capacités d'absorption des explosifs différentes.

La plante la plus efficace pour accumuler de grandes quantités de RDX semble être le blé. En appliquant les rendements de production de biomasse (hors production de grains) de l'année 2005

(source Service Régional de l'Information Statistique et Economique de Midi-Pyrénées), le maïs s'avère être la plante capable d'accumuler les plus grandes quantités de RDX dans ses parties aériennes, jusqu'à 219 kg par hectare. Le blé est tout de même capable d'accumuler 174 kg de RDX par hectare mais les nécroses observées dans les parties aériennes présentent un risque de dispersion de la pollution et de diminution de la croissance du blé. Malgré l'absence de phytotoxicité chez le maïs, son utilisation est limitée par la forte production de biomasse qui devra être prise en charge à la fin de la culture. En effet, pour une même quantité de RDX absorbé, le maïs produit cinq fois plus de biomasse sèche que le blé. Ainsi, le blé semble la plante parmi celles testées qui est la plus envisageable pour une mise en place *in situ*.

Dans le cas du TNT, les résultats sont plus faibles que ceux obtenus dans l'étude de Makris *et al.* (2006) et du même ordre que ceux d'autres études (Adamia *et al.*, 2006 ; Hughes *et al.*, 1997 ; Pavlostathis *et al.*, 1998). Ces résultats ont été réalisés en conditions hydroponiques et étaient basés sur des dosages du TNT dans le milieu de culture et non dans les plantes. Or, la disparition dans le milieu de culture n'est pas obligatoirement liée à l'absorption par la plante, elle peut être due à une dégradation physico-chimique ou biologique.

Lorsque les conditions climatiques et le type de sol le permettent, le maïs semble recommandé pour la dépollution du RDX. Ce dernier accumulé pourra être détruit par incinération des parties aériennes après leur récolte. Les quantités de TNT absorbé et transféré dans les plantes agronomiques ne permettent pas une dépollution très efficace mais elles peuvent stabiliser le produit dans le sol en le transformant et le liant dans les parois des racines. Le riz reste une plante agronomique à privilégier dans le cas de sites lagunaires où l'assèchement ne peut pas être mis en place.

II.3 Discussion

Ces expérimentations avec différentes plantes cultivées ont montré que ces plantes étaient tolérantes à des concentrations élevées en RDX et en TNT, 1000 et 500 mg/kg. Toutefois, quelle que soit la plante, ces études aboutissent à la même conclusion : le RDX est absorbé en grande quantité et transféré en majorité vers les parties aériennes de la plante alors que le TNT est relativement peu absorbé et reste principalement localisé dans les racines. Les différences de

comportement de ces deux molécules dans la plante sont surprenantes si on considère leurs coefficients de partition octanol-eau ($\log K_{ow}$) respectifs. Le $\log K_{ow}$ du RDX et du TNT sont respectivement de 0,81 et 1,6. Une relation parabolique permettant de prédire l'absorption d'un composé organique dans la plante en fonction du $\log K_{ow}$ des molécules a été établie (Briggs *et al.*, 1982). Une relation du même type a été établie entre le $\log K_{ow}$ des molécules et leur translocation dans la plante (Bromilow et Chamberlain, 1995). Ainsi, les composés ayant un $\log K_{ow}$ entre 1 et 2 sont les mieux absorbés et les mieux transférés. Le $\log K_{ow}$ du TNT étant plus élevé que celui du RDX, il devrait, a priori, être absorbé dans les racines en plus grande quantité et transféré plus efficacement vers les parties aériennes. La différence d'absorption des explosifs est inattendue puisque le RDX a une solubilité plus faible que le TNT ce qui devrait limiter son absorption. Le faible transfert du TNT vers les parties aériennes observé expérimentalement est en contradiction avec les estimations qui décrivent la relation entre le $\log K_{ow}$ et la concentration du composé dans le flux de transpiration. Ce phénomène de rétention racinaire a aussi été observé chez le soja dans le cas du phénol et du nitrobenzène dont les $\log K_{ow}$ sont respectivement de 1,5 et 1,85 (Mc Farlane *et al.*, 1987). Le transfert de ces deux composés était plus faible que ce qui était prédit par Bromilow et Chamberlain (1995) alors qu'ils étaient absorbés en grande quantité après 2 jours en conditions hydroponiques. Les auteurs ont présumé que la cause de cette faible translocation était due au métabolisme rapide des composés. De la même façon, le métabolisme important du TNT observé chez les plantes agronomiques peut ainsi être responsable de ce faible transfert vers les parties aériennes. Le RDX, retrouvé sous forme de composé parent dans les parties aériennes, ne semble pas être métabolisé dans la plante et ne subit pas cette rétention dans les racines.

Ces expérimentations ont mis en évidence une limite à l'utilisation des plantes pour la dépollution des explosifs : la durée du traitement. En effet, pour des concentrations dans le sol inférieures à 1000 mg/kg de RDX ou 200 mg/kg de TNT, la concentration dans la plante est proportionnelle à la concentration dans le sol. Les quantités absorbées par les plantes diminueront donc au fur et à mesure de la dépollution du site, la dépollution suivra une décroissance exponentielle. La durée totale et le nombre de rotation culturale nécessaire devra tenir compte de ce phénomène mais aussi de la concentration de départ en explosifs et du seuil de dépollution nécessaire en fonction de la réhabilitation du site.

Même si les plantes semblent tolérantes pour de fortes concentrations en explosifs, une phytotoxicité du RDX se manifeste au cours du temps par l'apparition de nécroses aux extrémités des parties aériennes. Ces nécroses sont corrélées à l'accumulation du RDX dans les parties aériennes. Cet effet devient problématique notamment dans le cas du soja car les feuilles nécrosées finissent par tomber. Dans le cas des dicotylédones, la chute de ces feuilles ayant accumulé du RDX présente donc un risque de dispersion de la contamination. Dans le cas des monocotylédones, ce phénomène n'est pas observé, les parties nécrosées restent sur la plante et ne semblent pas gêner la croissance de nouvelles feuilles. De nombreuses études ont été réalisées en utilisant le peuplier comme plante modèle (Burken et Schnoor, 1998 ; Thompson *et al.*, 1999 ; Thompson et Schnoor, 1997 ; Van Aken *et al.*, 2004a ; Van Aken *et al.*, 2004b ; Yoon *et al.*, 2006). Cet arbre est envisagé en phyto-dépollution pour les grands volumes d'eau qu'il est capable d'absorber au cours de sa rapide croissance. Il peut donc absorber théoriquement de grandes quantités de contaminants biodisponibles. Toutefois, son utilisation sur plusieurs saisons peut poser un problème dans le cas du RDX. Les feuilles du peuplier tombant à chaque automne, si elles ont accumulé de grandes quantités de RDX, ce dernier sera dispersé dans l'environnement. Les études sont, pour l'instant, restreintes à des cultures hydroponiques sur des jeunes arbres et ce phénomène n'a pas encore été envisagé.

Nos études ne prennent pas en compte deux facteurs limitants : l'âge de la contamination et les pollutions multiples des sites contaminés qui peuvent modifier les taux d'absorption d'un polluant donné par les plantes. D'une part, l'âge de la contamination joue un rôle essentiel sur la biodisponibilité du polluant ; en effet, celle-ci diminue avec le temps car les forces de liaison des composés organiques sur les particules du sol (argiles ou substances humiques) peuvent se renforcer au cours du temps (Alexander, 2000). Les composés liés sont alors difficilement solubilisés dans la phase aqueuse. Dans nos expérimentations, les temps sont relativement courts en comparaison à des sites contaminés. Seuls les mécanismes d'adsorption faibles entrent alors en jeu. *In fine*, l'ensemble de la molécule surchargeant le sol est disponible dans la limite de sa solubilité. D'autre part, la présence de co-produits est dépendante de l'historique du site à dépolluer et ne pourra être prise en compte que lors d'études de cas réels de contamination par des explosifs.

Bien que le riz soit une plante adaptée aux zones humides, nous allons tester d'autres plantes adaptées à ces conditions pour trouver les plantes les plus efficaces pour la dépollution des

explosifs dans les sites lagunaires. De plus, les capacités d'absorption peuvent aussi être dépendantes du stade de croissance auquel les plantes ont été mises en contact avec le polluant mais aussi du temps de culture sur le sol contaminé. Pour optimiser le temps de culture nécessaire pour une efficacité maximale de dépollution, nous allons effectuer des expérimentations en mesurant la cinétique d'absorption des deux explosifs.

PUBLICATION 1 :

Phytotoxicity to and uptake of RDX by rice

Vila M, Mehier S, Pascal-Lorber S and Laurent F

Environmental Pollution, sous presse



Phytotoxicity to and uptake of RDX by rice

M. Vila, S. Mehier, S. Lorber-Pascal, F. Laurent*

Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1089 Xénobiotiques, 180, Chemin de Tournefeuille, BP3, 31931 Toulouse Cedex 9, France

Received 5 January 2006; received in revised form 9 May 2006; accepted 10 May 2006

RDX phytotoxicity was correlated to RDX accumulation in leaf rice.

Abstract

Phytoremediation is an emerging strategy to remediate soils contaminated with pollutants like explosives in which plants will uptake, degrade and/or accumulate pollutants. To implement this technology on a site contaminated with RDX, we chose rice, which is able to grow in lagoons, and we tested its ability to grow in soils with high levels of RDX and to decrease RDX concentrations in soil. Rice was grown for 40 days in soil contaminated with increasing [^{14}C]RDX concentrations. Emergence and growth were not affected by RDX. Total chlorophyll content decreased with RDX concentrations of over 500 mg kg^{-1} . Amounts of chlorophyll were correlated with the appearance of necrosis in leaf extremities. After 40 days, rice translocated 89% of uptaken radioactivity to leaves with 90% in leaf extremities. Analyses of leaf extracts showed that 95% of radioactivity was RDX in its parent form. Necrosis appears to be a phytotoxic symptom of RDX accumulation.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Phytoremediation; Rice; RDX; Munitions

1. Introduction

Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine or royal demolition explosive (RDX) is the most widely used highly energetic compound thanks to its high stability and detonation power. Production of RDX has led to multiple and heterogeneous contaminated sites. In the past, wastewater resulting from the production of explosives was collected in lagoons to allow solid materials to settle prior to release to rivers and streams (Harvey et al., 1990). Over time, explosives and residues have accumulated in large areas of soil. RDX remediation is of great concern owing to its relative recalcitrance and its possible human carcinogenicity conferred by U.S. EPA (Lachance et al., 1999). Although excavation and thermal processes are too expensive and damaging for the environment, incineration is the most commonly used remediation strategy for munitions-contaminated soils (Spain, 2000). To reduce the cost and

environmental problems, alternative technologies have been studied and phytoremediation is one of the promising technologies for treating explosives (Arthur et al., 2005; Frische, 2003). Phytoremediation is a plant based remediation technology. Plants are able to accumulate, degrade and detoxify pollutants.

For successful phytoremediation, it is essential to determine the remediation potential and the fate of RDX in the plants concerned. Many studies have evidenced the ability of aquatic, axenic, and terrestrial plants to uptake, transform, and transfer RDX to leaves, and to incorporate RDX under different culture conditions (Best et al., 1999, 2005; Bhadra et al., 2001; Chen, 1993; Harvey et al., 1991; Price et al., 2002; Thompson et al., 1999). Harvey et al. (1991) showed that RDX has a limited metabolism in bush bean, even if the formation of unknown polar compounds and of non-extractable products has been reported. Previous studies have shown that more than 70% of uptaken RDX accumulated in aerial parts (Harvey et al., 1991; Thompson et al., 1999). Plants could thus be used in a phytoextraction process and the pollution could be remediated by burning the aerial parts of the plant after gathering.

* Corresponding author. Tel.: +33 5 6128 5392; fax: +33 5 6128 5244.

E-mail address: flaurent@toulouse.inra.fr (F. Laurent).

Further identification of the metabolites formed, and estimation of RDX uptake are necessary to improve the real capacity of the plants tested to remove large amounts of RDX during an in-situ process. The objective of this study was to evaluate the ability of another plant, rice (*Oriza sativa* L.), to remediate RDX contaminated soils. Rice is one of rare crops that grow in regions where conditions are similar to those found in contaminated sites like lagoons. Before testing the remediation potential of rice, it was necessary to study its resistance to high concentrations of this pollutant. To achieve our objective, we measured phytotoxicity to and uptake of RDX by rice. Our results could be useful in setting up an in-situ remediation strategy.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Analytical grade (>99% purity) RDX was obtained from Eurochem (Sorgues, France) in the form of 1% contaminated sand with 25% humidity. For labeled RDX, the solution of [U-¹⁴C]RDX obtained from Perkin Elmer Life Sciences (Courtaboeuf, France) was 98% pure, and exhibited a radioactivity of 9.24 mCi mmol⁻¹. All other chemicals used in the experiments were analytical reagent grade purchased from Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain).

2.2. Plant materials and growth conditions

Rice (*Oriza sativa* L. var. carinam) was used in the experiments. All experiments except the germination test were conducted in a temperature-controlled room. Environmental conditions were an average day/night temperature of 24/21 °C and a 16 h photoperiod.

2.3. Germination test

The germination tests were carried out according to the recommendations of the AFNOR X31-201 standard (1982). Germination was assessed using three replicates of 20 seeds sown uniformly in petri dishes. Non-contaminated and contaminated sand (1% RDX) was mixed at different ratios to dilution concentrations of 0, 10, 100, 500, 1000 and 10000 mg RDX kg⁻¹ dry sand. 20 ml of water were added in each petri dish. Dishes were closed hermetically and placed in a controlled environment germination room maintained at 32 °C. Germination was recorded after 8 days. Seeds were considered to be germinated when we observed a bursting of tegument with the appearance of germ but without presuming its subsequent development.

2.4. Soil preparation for growth and uptake tests

Non-contaminated and RDX contaminated sand (1% RDX) was mixed at different ratios to dilution concentrations of 0, 50, 250, 500, 1000 and 2000 mg RDX kg⁻¹ soil. Compost (Nehaus NF U 44-551, pH 4, Geeste, Germany) was sieved through a 4 mm sieve and mixed with the first mixture. In each jar, 250 g of contaminated soil was hydrated to 60% of the water-holding capacity with deionized water. Water evaporation was measured by weighting the jars daily and replaced by adding distilled water. There were three replicates for each concentration of contaminated soil tested.

2.5. Emergence, growth test, and estimation of chlorophyll content

The emergence and growth tests were carried out according to the recommendations of the ISO 11269-2 standard (1995). Seedling emergence was recorded daily until the end of the test. After 50% of the seeds had emerged in

the control soil, the seedlings were thinned to five per jar. The length, fresh and dry weight of roots and shoots were measured 40 days after sowing. After biomass determinations, aerial parts were ground, and total chlorophyll content estimation was determined on 30 mg sub-samples of homogenate. Samples were placed in a vial containing 10 ml of 80% acetone. Bleached leaf tissue was removed by centrifugation at 3000 × g for 5 min. Chlorophyll was quantified spectrophotometrically at 645 and 663 nm (Uvicon 810, Kontron), using the following equation (Arnon, 1949):

$$\text{Total chlorophyll} = (20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}) \times \text{dilution factor}$$

2.6. Uptake

Uptake of RDX by rice was estimated using soil contaminated with RDX and [U-¹⁴C]RDX. 5 μCi of [U-¹⁴C]RDX were added to each replicate. [U-¹⁴C]RDX was amended as acetone solution to RDX contaminated sand before addition of artificial soil. Sand was homogenized and acetone evaporated under vacuum.

After 40 days, plants were harvested and separated into leaves and roots. Each part was freeze-dried and ground. In some experiments, to determine more precisely the distribution of radioactivity, the three oldest leaves were cut into damaged and non-damaged parts before freeze drying. Radioactivity was measured after oxidative combustion of aliquots of about 200 mg in an oxidizer (Packard Instrument Co, Downers Grove, IL), trapping the resulting ¹⁴CO₂ in a scintillation mixture (Carbo-Sorb and Permafluor, Packard) followed by liquid scintillation counting in a Packard Tricarb 2200 CA scintillation counter. The amounts of residues in plants were calculated from the specific activity of each concentration of RDX in soils.

2.7. HPLC chromatography conditions

Radioactivity in leaves was extracted by homogenization in an acetonitrile/water mixture (1:1, v/v) (10 mL/g dry weight). The homogenates were stored overnight at -20 °C then centrifuged at 10000 × g for 10 min. The pellets were washed twice with the solvent mixture. The three supernatants were combined, and contained the soluble residues. The extracts were analyzed by reverse-phase HPLC with a HP 1100 liquid chromatograph (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). Radioactivity was monitored with an on-line Packard Flo-One β A250 scintillation detector, using Flo-Scint II as scintillation counting cocktail (Packard, Downers Grove, IL). Separation was carried out on a C18 Bischoff reverse-phase column (Prontosil Eurobond, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a guard cartridge. Elution was performed at 40 °C at a flow rate of 1 mL/min. The column was equilibrated with 100% of solvent A (water/methanol/formic acid, 89.8:10:0.2). Elution conditions were as follows: 100% solvent A for 15 min, a 5 min linear increase of solvent B (water/methanol/formic acid, 79.8:20:0.2) from 0 to 100% and then 100% solvent B for 10 min. Under these conditions, the retention time of standard RDX was 23 min.

After growth with [U-¹⁴C]RDX, labeled plants were autoradiographed using a phosphor imager (Amersham Biosciences, Orsay, France) with Imagequant software.

All data were statistically analyzed by two-tailed Student's *t* test (*P* ≤ 0.05) taking into account all the replicates.

3. Results

3.1. Germination and growth tests

Radicle emergence typically began 4 days after initiation of the germination test. No effect of RDX concentration on seed germination was observed after 8 days of exposure (germination rate >75%, data not shown).

Twenty-one days after initiation, neither hypocotyl emergence, nor root and shoot elongation or weight of rice

seedlings were affected when plants grew in soil treated with RDX (data not shown). However, toxic symptoms appeared in leaf extremities in the oldest leaves. Bleaching was observed at quantities as low as $100 \text{ mg RDX kg}^{-1}$ and necrotic spots were observed above $500 \text{ mg RDX kg}^{-1}$ (Fig. 1). The area of necrosis increased proportionally with the concentration of RDX in the soil (Fig. 2). Chlorophyll content was measured to quantify these phytotoxic symptoms with more precision. As shown in Fig. 3, it decreased at quantities as small as $100 \text{ mg RDX kg}^{-1}$ and began to differ significantly above 500 mg kg^{-1} .

3.2. Uptake of RDX by rice

Plant uptake and translocation of RDX in rice was further evaluated using soil contaminated with different concentrations of radiolabeled $[U-^{14}\text{C}]\text{RDX}$. Autoradiographies of rice cultivated on RDX contaminated soils indicated that at all concentrations, most radioactivity was found in leaf extremities (Fig. 4).

The mass balance recoveries in plants from oxidative combustion are shown in Fig. 5. More than 89% of the uptaken radioactivity was translocated to the leaves. High amounts of equivalent RDX were recovered in leaves, i.e. up to $31.5 \pm 2.6 \text{ mg per g}$ of dry weight in soil contaminated with 2000 mg kg^{-1} . Up to 1000 mg kg^{-1} , the concentration of radioactivity in leaves increased and was closely correlated with soil concentration. Above 1000 mg kg^{-1} , uptake leveled off (Fig. 5).

Distribution of radioactivity within leaves was analyzed after separation of bleached or necrotic parts and sound ones. We observed that radioactivity was mainly present in altered parts of leaves (Fig. 6). The concentration of radioactivity in the damaged parts of the leaf followed the same pattern as the concentration in whole leaves because radioactivity in sound parts remained very weak. For example, at $1000 \text{ mg RDX kg}^{-1}$, necrotic parts accounted for 94.7% of radioactivity in leaves.

HPLC analysis of leaf extracts showed two peaks (Fig. 7): RDX (retention time 23 min) accounting for more than 95% of radioactivity and an unknown compound not retained on the column under HPLC conditions used in the present study (retention time 2 min).

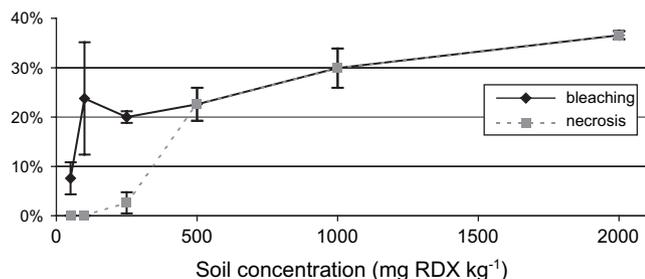


Fig. 1. Proportion of bleached and necrotic parts in the oldest leaves exposed to different concentrations of RDX for 40 days expressed as percent of leaf area. $n = 3$ for all samples. Vertical bars indicate standard deviations.

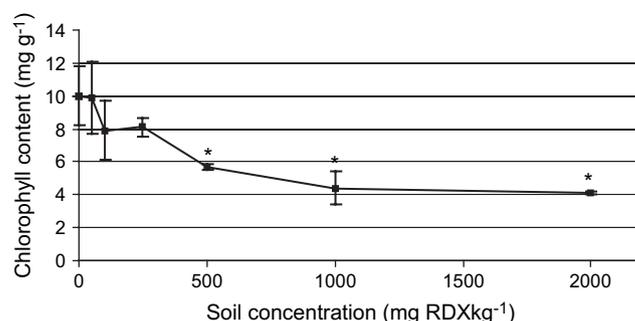


Fig. 2. Effect of RDX on the total chlorophyll content of rice seedlings cultivated on soil contaminated with different concentration of RDX. *Statistically significant differences ($P \leq 0.05$). $n = 3$ for all samples. Vertical bars indicate standard deviations.

4. Discussion

Germination was not reduced by increasing RDX concentrations up to $10\,000 \text{ mg RDX kg}^{-1}$. Germination tests need to be supplemented by growth tests because germination tests are less sensitive probably due to the fact that seeds use the energy reserves in the cotyledons for germination (Gong et al., 1999). RDX may not penetrate seeds or may not have any effect on this stage of development.

Emergence and growth tests showed that RDX had no effect on rice growth at concentrations up to 2000 mg kg^{-1} in soils. Nevertheless, we could not conclude that RDX was not phytotoxic to rice after 40 days of culture. Indeed, bleaching and necrosis observed in leaf extremities were clearly phytotoxic symptoms. Winfield et al. (2004) also observed adverse developmental effects like bleaching and necrotic spots in 100% of treated seedlings after long-term exposure. Following 2-week exposure, these authors measured significant differences in growth in 15 plants (dicots and monocots). In our study, adverse effects were observed only with high concentrations. We suspect that bleaching and necrosis could decrease transpiration and therefore affect growth of rice in long-term culture. It is thus necessary to confirm the results of growth tests in long term experiments to assess RDX phytotoxicity.

RDX accumulated mainly (89%) in aerial parts. Our results are in agreement with those of Harvey et al. (1991) who

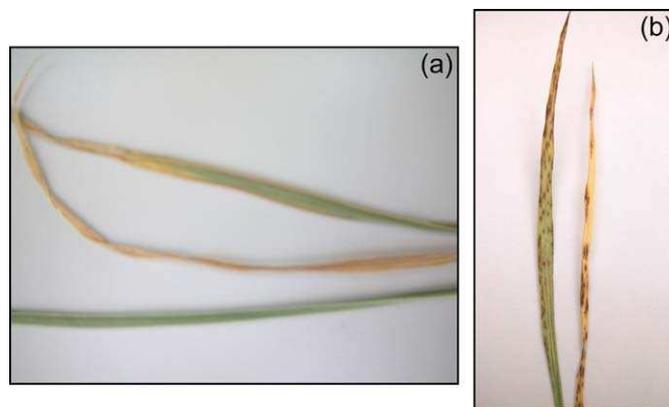


Fig. 3. Phytotoxic symptoms observed on photographs of leaf extremities of rice cultivated in soil contaminated with: (a) 250; and (b) 2000 mg RDX kg^{-1} .

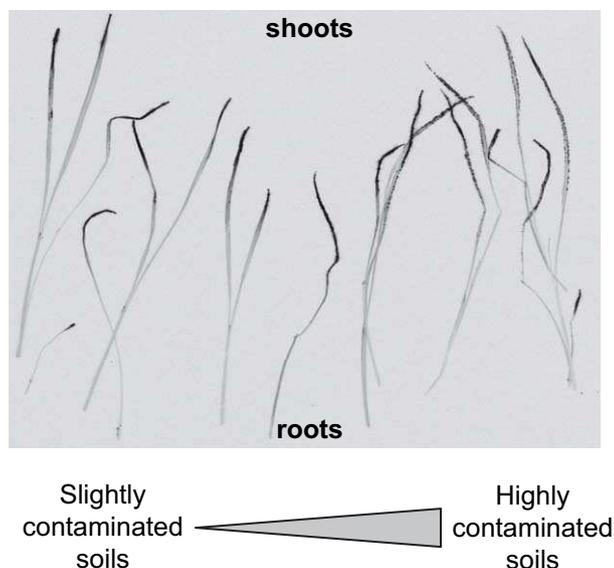


Fig. 4. Accumulation of radioactivity in aerial parts of rice cultivated for 40 days in soils contaminated with increasing soil concentrations of RDX. Autoradiography of aerial parts, radioactivity is represented by dark spots.

showed that 86% of the uptaken $[U-^{14}C]$ RDX was translocated to the leaves of bush bean 7 days after hydroponic treatment. Under the same conditions, Thompson et al. (1999) showed a translocation of 60% in poplar trees. In contrast to 2,4,6-trinitrotoluene, also often present in lagoons, which is weakly translocated to leaves (Larson, 1997), RDX pattern of distribution suggested a xylem translocation by way of the evapotranspiration flow. As RDX cannot be volatilized in its parent form (Harvey et al., 1991) and is little metabolized, it accumulates in leaf extremities.

Most of the radioactivity found in leaf extracts was in the form of RDX. The 5% of radiolabeled chemical detected in leaf extracts could be a transformation product of RDX in the plant or a soil degradation compound. The lack of transformation of RDX resulted in the accumulation of the parent compound in leaves.

Rice accumulated very high amounts of RDX in leaves (of the order of several mg per g of dry weight). These concentrations were higher than those obtained by Thompson et al. (1999) who found concentrations ranging from 350 to 720 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the leaf tissues of poplar trees. However, this

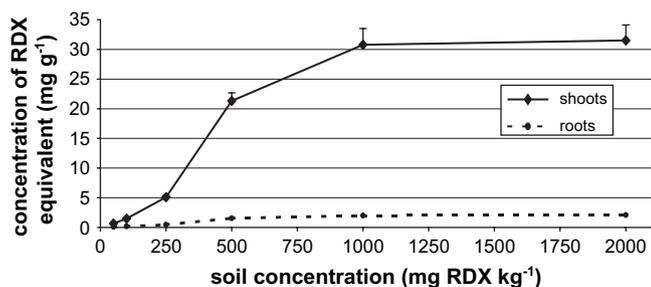


Fig. 5. Uptake and distribution of RDX equivalent in rice plant tissues after 40 days exposure to soil contaminated with increasing soil concentrations of RDX. $n = 3$ for all samples. Vertical bars on symbols indicate standard errors.

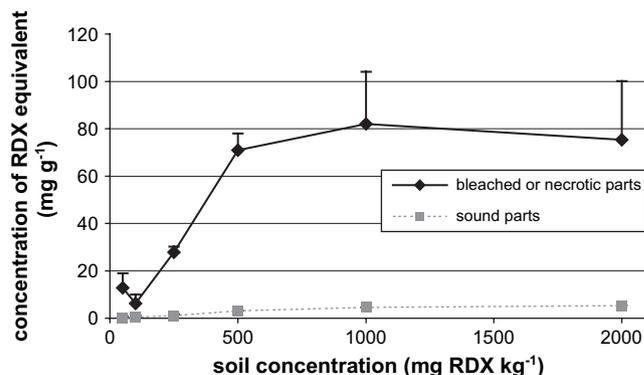


Fig. 6. Distribution of uptaken RDX equivalent (mg g^{-1}) in sound or bleached or necrotic parts. Rice plants were grown for 40 days in contaminated soil with increasing soil concentrations of RDX. $n = 3$ for all samples. Vertical bars on symbols indicate standard errors.

difference could depend on culture time, 7 days in Thompson's study and 40 days under our conditions. Higher development of poplar trees may palliate the difference in concentrations.

The high concentration of RDX in rice leaves led to the appearance of phytotoxic symptoms (chlorosis and necrosis) in leaf extremities resulting from the accumulation of RDX and its metabolites in these parts.

Amounts of RDX found in rice plants grown in soils contaminated with 1000 or 2000 mg kg^{-1} were not significantly different. This saturation of translocation could result from: (i) a reduced bioavailability of RDX in soil; and/or (ii) a decrease in transpiration. (i) Bioavailability of RDX depends on the solubility of the compound, and the maximum solubility of RDX in water is 45 mg L^{-1} (Talmage et al., 1999). It seems that saturation of the aqueous phase in soil is reached at RDX concentrations of more than 1000 mg kg^{-1} . (ii) Necrosis of leaf extremities decreases the areas of leaves available for transpiration. If RDX translocation mainly depends on transpiration flow, translocation would thus decrease with a decrease in transpiration.

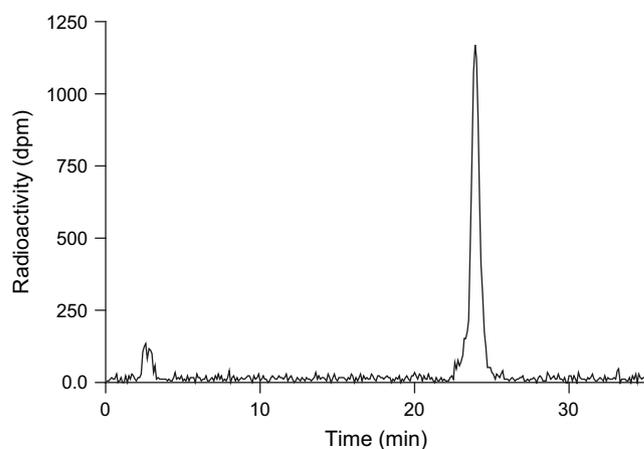


Fig. 7. HPLC-radiochromatogram obtained from extract of rice leaves exposed to 2000 mg kg^{-1} of $[U-^{14}C]$ RDX per kg of soil for 40 days.

5. Conclusions

This study represents the first steps in site trials to evaluate the feasibility of using rice to remediate RDX contaminated soils. Rice was able to grow for 40 days in a soil highly contaminated with RDX. Rice plants accumulated high amounts of RDX in their aerial parts. Accumulation of RDX occurred in the leaf extremities and resulted in necrosis, which could reduce plant growth. Further long-term experiments are necessary to determine if high concentrations of RDX in shoots reduce growth of new leaves that may also be able to accumulate RDX. The ratio between the accumulation of RDX and the harvested biomass should also be determined to measure the ability of rice crops to remediate RDX contaminated soils. Ultimately, the rice could be incinerated for energy production after harvest. This technology may be an economic and ecological alternative to physico-chemical methods.

Acknowledgements

Support for this research was provided by the *Délégation Générale de l'Armement* (PEA 033603). We would like to thank J.C. Evrard (*Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*, Montpellier, France) for providing the rice seeds. Thanks are due to Daphne Goodfellow for critical reading of the English.

References

- AFNOR X31–201, 1982. Soil Quality – Test for the Inhibition of Seed Germination by Means of a Substance. Paris, France.
- Arnon, D., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenylperoxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24, 1–15.
- Arthur, E.L., Rice, P.J., Anderson, T.A., Baladi, S.M., Henderson, K.L.D., Coats, J.R., 2005. Phytoremediation – an overview. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 109–122.
- Best, E.P.H., Sprecher, S.L., Larson, S.L., Fredrickson, H.L., Bader, D.F., 1999. Environmental behaviour of explosives in groundwater from the Milan Army ammunition plant in aquatic and wetland plant treatments. Uptake and fate of TNT and RDX in plants. *Chemosphere* 39, 2057–2072.
- Best, E.P.H., Kvesitadze, G., Khatishashvili, G., Sadunishvili, T., 2005. Plant processes important for the transformation and degradation of explosives contaminants. *Zeitschrift für Naturforschung* 60c, 340–348.
- Bhadra, R., Wayment, D.G., Williams, R.K., Barman, S.N., Stone, M.B., Hughes, J.B., Shanks, J.V., 2001. Studies on plant-mediated fate of the explosives RDX and HMX. *Chemosphere* 44, 1259–1264.
- Chen, D., 1993. Plant Uptake and Soil Adsorption of RDX. MS Thesis. University of Illinois, Urbana, IL, USA.
- Frische, T., 2003. Ecotoxicological evaluation of in situ bioremediation of soils contaminated by the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Environmental Pollution* 121, 103–113.
- Gong, P., Wilke, B.-M., Fleischmann, S., 1999. Soil-based phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36, 152–157.
- Harvey, S.D., Fellows, R.J., Cataldo, D.A., Bean, R.M., 1990. Analysis of 2,4,6-trinitrotoluene and its transformation products in soils and plant tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 518, 361–374.
- Harvey, S.D., Fellows, R.J., Cataldo, D.A., Bean, R.M., 1991. Fate of the explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in soil and bioaccumulation in bush bean hydroponic plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 845–855.
- ISO 11269–2, 1995. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants. Geneva, Switzerland.
- Lachance, B., Robidoux, P.Y., Hawari, J., Ampleman, G., Thiboutot, S., Sunahara, G.I., 1999. Cytotoxic and genotoxic effects of energetic compounds on bacterial and mammalian cells in vitro. *Mutation Research* 444, 25–39.
- Larson, S.L., 1997. Fate of explosive contaminants in plants. *Annals of New York Academy of Science* 829, 195–201.
- Price, R.A., Pennington, J.C., Larson, S.L., Neumann, D., Hayes, C.A., 2002. Uptake of RDX and TNT by agronomic plants. *Soil and Sediment Contamination* 11, 307–326.
- Spain, J.C., 2000. Introduction. In: Spain, J.C., Hughes, J.B., Knackmuss, H.J. (Eds.), *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 1–5.
- Talmage, S.S., Opresko, D.M., Maxwell, C.J., Welsh, C.J.E., Cretella, F.M., Reno, P.H., Daniel, F.B., 1999. Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 161, 1–156.
- Thompson, P.L., Ramer, L.A., Schnoor, J.L., 1999. Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine translocation in poplar trees. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 279–284.
- Winfield, L.E., Rodgers, J.H., D'Surney, S.J., 2004. The responses of selected terrestrial plants to short (<12 days) and long term (2, 4 and 6 weeks) hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) exposure. Part I: Growth and developmental effects. *Ecotoxicology* 13, 335–347.

PUBLICATION 2 :

Phytotoxicity to and uptake of TNT by rice

Vila M, Pascal-Lorber S and Laurent F

Environmental Geochemistry and Health, soumise

Running head. Fate of TNT in rice

Mini-paper in special issue in Environmental Geochemistry and Health

Phytotoxicity to and uptake of TNT by rice

M. Vila, S. Lorber-Pascal, F. Laurent*

Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1089 Xénobiotiques, 180, Chemin de
Tournefeuille, BP3, 31931 TOULOUSE Cedex 9, France

* corresponding author. Tel. +33 5.61.28.53.92 Fax: +33 5.61.28.52.44 e-mail address:

flaurent@toulouse.inra.fr

Abstract.

The contamination of the environment by explosives is a worldwide environmental problem resulting in part from 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) production. *In-situ* phytoremediation is an appropriate alternative cost-effective technology to detoxify extended contamination of surface soil. The ability of rice (*Oriza sativa*) to tolerate and to assimilate TNT was investigated after 40 days exposure. Germination rate decreased at 500 mg/kg whereas the length of aerial parts and roots increased significantly at high TNT concentrations, from 150 to 500 mg/kg. Rice uptook TNT residues from soil and accumulated most in roots. Less than 25% of uptaken radioactivity was translocated to aerial parts. From 200 mg/kg, the concentration of TNT residues in roots reached a maximum of approximately 0.7 mg/g. No TNT was found in plant extracts evidencing rapid metabolism of TNT. More than 60% of radioactivity was found as unextractable residues in roots. TNT was sequestered in roots and could not be translocated to aerial parts.

Keywords. Explosive; Phytoremediation; Phytotoxicity; Rice; TNT

1. Introduction

Huge amounts of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) were produced and used during the First and Second World Wars. Production, packaging, and storage led to the contamination of soil and groundwater in many countries (Spain 2000). Concentrations of TNT in contaminated soils are extremely heterogeneous, ranging from 0.08 to 87,000 mg/kg (Talmage et al. 1999). In the past, wastewater resulting from TNT production was directed to lagoons to allow settling of solid material and then directed to rivers. Excavation and incineration have been commonly used to remediate soil contaminated with TNT but this method is both expensive and destructive for the soil. Phytoremediation is an alternative cost-effective biological method that is more easily acceptable to the general public. The tolerance of plant species to the pollutant is one of the main factors in choosing a plant for phytoremediation. Another factor is the ability of plants to uptake contaminants.

Numerous studies have evaluated the phytotoxicity of TNT. They enabled the determination of the toxicity threshold, which is the turning point from regular to inhibitory growth. All of these experiments were realized with plants grown hydroponically and the threshold value was expressed in mg/L (Kim et al. 2004). This value is helpful for groundwater phytoremediation but, in the case of contaminated soil or sediment, more representative values are required. However, some studies determine the ecotoxicological threshold of TNT in different natural or artificial soils with different plants (Gong et al. 1999, Hannink et al. 2002, Medina et al. 2003, Robidoux et al. 2003). Some plants with a low level of tolerance to TNT showed adverse effects like chlorosis and loss of leaves or flowers. The degree of phytotoxicity appears to depend on the plant species, stage of growth, amount of biomass or plant density but also on contaminant bioavailability and other environmental factors such as the type of soil or microbial activity.

In parallel, the uptake and the fate of TNT have been studied in many plants but almost always in hydroponic studies (Palazzo and Leggett 1986, Gorge et al. 1994). Although the effectiveness of accumulation can vary, these studies showed that plants could significantly reduce the concentration of TNT in solution. Price et al. (2002) described the uptake of TNT by agronomic plants from soil and irrigation water. However, they were interested in assessing risk to human health and thus focused their analyses on edible parts of vegetables and not on uptake and translocation in whole plants. Many studies have evidenced that TNT is mainly reduced to hydroxylamino-dinitrotoluene (HADNT) and amino-dinitrotoluene (ADNT) (Bhadra et al. 1999, Vila et al. 2005). These metabolites pose a serious problem because they are as toxic as the parent compound (Honeycutt et al. 1996). More information was thus necessary to better understand the ultimate fate of TNT in plants.

In this context, we determined the phytotoxicity of TNT to rice, a suitable plant for lagoon cultivation. Standardized toxicity assays were used to assess the effects of TNT on rice plants using endpoints such as seed germination, growth, or root elongation, and total chlorophyll content. We also measured uptake and distribution of TNT in rice after 40 days exposure on soil freshly contaminated with TNT. Processes involved in TNT phytoremediation were determined by analyses of the fate of TNT after uptake by rice.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Analytical standard TNT was obtained from SCP Science (Courtaboeuf, France). Unlabeled TNT was obtained from Eurenco (Sorgues, France) in the form of 2% contaminated sand with 25% humidity. [methyl-¹⁴C]-2,4,6-Trinitrotoluene (specific activity = 14 mCi mmol⁻¹; radiochemical purity >97% as determined by radio-HPLC analysis) was purchased from Moravek Biochemical

(Brea, CA). All other chemicals used in the experiments were analytical grade reagents purchased from Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain).

2.2 Plant materials and growth conditions

Rice (*Oriza sativa* L. var. carinam) was used in the experiments. All experiments except the germination test were conducted in a temperature-controlled room. Environmental conditions were an average day/night temperature of 24/21°C and a 16 h photoperiod.

2.3 Germination test

The germination tests were carried out as previously described (Vila et al. 2006). Non-contaminated and contaminated sand (2% TNT) was mixed at different ratios to dilution concentrations of 0, 50, 100, 250, and 500 mg TNT kg⁻¹ dry sand.

2.4 Soil preparation for growth and uptake tests

Non-contaminated and TNT contaminated sand (2% TNT) were mixed at different ratios to dilution concentrations of 0, 50, 100, 150, 200, 250, and 500 mg TNT kg⁻¹ soil. Compost (Nehaus NF U 44-551, pH 4, Geeste, Germany) was sieved through a 4 mm sieve and mixed with the first mixture. In each jar, 250 g of contaminated soil was hydrated to 60% of water-holding capacity with deionized water. Water evaporation was measured by weighing the jars daily and lost moisture was replaced by adding distilled water. There were three replicates for each concentration of contaminated soil tested.

2.5 Emergence, growth test, and uptake

The emergence, growth tests and estimation of chlorophyll content were carried out as described elsewhere (Vila et al. 2006). Uptake of TNT by rice was estimated using soil contaminated with TNT and [U-¹⁴C]TNT. 5 µCi of [U-¹⁴C]TNT were added to each replicate. [U-¹⁴C]TNT was amended as acetone solution to TNT contaminated sand before addition of artificial soil. Sand was homogenized and acetone evaporated under vacuum.

After 40 days, plants were harvested and separated into leaves and roots. Each part was freeze-dried and ground. In some experiments, the three oldest leaves were cut into damaged and non-damaged parts before freeze drying to determine the distribution of radioactivity more precisely. Radioactivity was measured after oxidative combustion of aliquots of about 200 mg in an oxidizer (Packard Instrument Co, Downers Grove, IL), trapping the resulting $^{14}\text{CO}_2$ in a scintillation mixture (Carbo-Sorb and Permafluor, Packard) followed by liquid scintillation counting in a Packard Tricarb 2200 CA scintillation counter. The amounts of residues in plants were calculated from the specific activity of each concentration of TNT in soils.

2.6 HPLC chromatography

Radioactivity in leaves was extracted by homogenization in an acetonitrile/water mixture (1:1, v/v) (10 mL/g dry weight). The homogenates were stored overnight at -20°C then centrifuged at 10 000g for 10 min. The pellets were washed twice with the solvent mixture. The three supernatants were combined and the resulting solution contained the soluble residues. The extracts were analyzed by reverse-phase HPLC with a HP 1100 liquid chromatograph (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). Radioactivity was monitored with an on-line Packard Flo-One β A250 scintillation detector, using Flo-Scint II as scintillation counting cocktail (Packard, Downers Grove, IL). Separation was carried out on a C18 Bischoff reverse-phase column (Prontosil Eurobond, 4.6 mm x 250 mm, 5 μm) with a guard cartridge. Elution was performed at 40 $^\circ\text{C}$ at a flow rate of 1 mL/min. The column was equilibrated with 100% of solvent A (water/methanol/formic acid, 89.8:10:0.2, v/v/v). Elution conditions were as follows: 100% solvent A for 15 min, a 5 min linear increase of solvent B (water/methanol/formic acid, 79.8:20:0.2, v/v/v) from 0 to 100% and then 100% solvent B for 10 min. Under these conditions, the retention time of standard TNT was 23 min.

3. Results and Discussion

3.1 Phytotoxicity of TNT

The percentage of seed germination in contaminated soil decreased with increasing concentrations of TNT (data not shown). There was a linear decrease in the germination rate from $85 \pm 10\%$ in non-contaminated sand to $56.7 \pm 2.9\%$ at 500 mg of TNT per kg of soil but the first significant effect on germination was obtained at 500 mg/kg.

Rice was cultivated for 40 days in the absence and presence of TNT to test tolerance to TNT. No adverse effects such as chlorosis or necrosis were detected in the presence of TNT. We did not observe any significant difference in chlorophyll content between controls and plants cultivated on TNT contaminated soil (data not shown). Nevertheless, variations in shoot and root biomass were observed at concentrations above 150 mg/kg. As shown in Figure 1, shoot growth slightly increased in the presence of TNT. In soil contaminated with 200 mg/kg, roots grew 2.8 times longer than controls. TNT thus had a positive effect on plant growth. In accordance with our results, low levels of TNT (between 5 and 50 mg/kg) stimulated seedling growth of cress, turnip, oat and wheat (Gong et al. 1999). In our study, phytotoxicity tests showed the opposite effect of TNT on rice germination and growth. Germination rate decreased in TNT contaminated soil whereas root and shoot lengths increased (Figure 1). Rice is normally sown directly in rice fields or sown in the nursery and then transplanted as seedlings to the rice paddy. When rice cultivation is intended in soil contaminated with TNT, first growing seedlings in the nursery would prevent the adverse effect of TNT on germination.

Plants cultivated in TNT-contaminated soil appear to tolerate higher concentrations of the pollutant than plants cultivated in hydroponic studies. This is probably due to the decrease in TNT availability resulting from its binding to organic matter in the soil during longer experiments (Alexander 2000). So in soil, the TNT available fraction is probably lower than the

total TNT concentration, and this phenomenon would increase over time. During in-situ phytoremediation, bioavailability of TNT could be reduced by aging of the contamination and thus decrease phytotoxicity but could also reduce the uptake of TNT by plants.

3.2 Uptake of TNT by rice

To measure the uptake of TNT by rice, plants were cultivated for 40 days on soil contaminated with ^{14}C -TNT. Analyses of radioactivity found in aerial parts and roots enabled measurement of the quantities of TNT residues in each part (Figure 2). Most TNT residues were found in roots. From 50 to 150 mg/kg, the concentration of TNT residues in roots was proportional to the concentration in the soil after which it increased rapidly. Above 200 mg/kg, we observed a plateau-like phase in uptake.

The concentration in roots was at least 3 times higher than in aerial parts. At a concentration of 500 mg/kg in soils, the ratio was 7 times greater. Rice uptook a maximum of 0.80 ± 0.12 mg/g of dry weight (DW). These concentrations were in the same order of magnitude as results obtained in other studies, i.e. between 0.5 and 0.7 mg/kg DW in yellow nutsedge (Palazzo and Leggett 1986) and aquatic plants (Best et al. 1999). Nevertheless, cultivation conditions in the two experiments were not comparable since the plants were grown in hydroponic solution with TNT concentrations 10 times lower than the concentrations in our study. TNT has a low water solubility and a part is bound to organic matter. Therefore in soil, only a fraction of total TNT concentration would actually be available for uptake by plants. Comparison of these different experiments showed that TNT uptake by plants is probably more closely linked to free TNT in water than to total soil concentration. Rice could thus be as efficient as other tested plants (Palazzo and Leggett 1986, Best et al. 1999) to uptake TNT and should be used on contaminated soil. Hydroponic culture was probably a good approach to measure plant efficiency but the concentrations tested remain limited.

Rice accumulated high concentrations of another explosive found in contaminated lagoons, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX), in its aerial parts, i.e. 31.5 ± 2.6 mg/g DW (Vila et al. 2006). In spite of its optimal $\log K_{ow}$ for uptake (Briggs et al. 1982), the efficiency of TNT uptake by rice was lower than that of RDX.

Radio-HPLC analyses of TNT residues in rice showed that TNT was completely metabolized into more polar compounds (data not shown). Metabolism of TNT has been widely studied in plants. After penetration in cells, TNT was reduced in hydroxylamine and amine residues (Vila et al. 2005). For a long time, these metabolites were thought to be conjugated to sugars. However, the low amounts of radioactivity did not allow identification of metabolites by mass spectrometry. Moreover, most radioactivity found in rice was unextractable, i.e. in roots, 75% at 150 mg/kg and 65% at 500 mg/kg, and in shoots 55% whatever concentration of TNT (data not shown).

TNT polar metabolites were probably stored in vacuoles and as unextractable residues linked to cell wall polymers. Low uptake associated with a high metabolic rate and high rate of sequestration of TNT residues in roots led to weak translocation to shoots. Although rice exhibits good TNT tolerance, low uptake of TNT might limit the use of rice in the bioaccumulation of TNT. Nevertheless, rice might influence degradation of TNT and vegetation can enhance microbial degradation by offering a favorable rhizospheric environment to soil microorganisms.

Figures

Figure 1. Rice root and shoot length increased with high concentrations of TNT in soil after 40 days of culture. Results are expressed as percentage of growth compared to controls.

Figure 2. The concentration of TNT residues in roots and shoots of rice cultivated for 40 days depends on soil concentrations of ^{14}C -TNT. Results are expressed as mg/g DW.

References

- Alexander, M. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology*, 34, 4259-4265
- Best, E. P. H., Sprecher, S. L., Larson, S. L., Fredrickson, H. L. & Bader, D. F. (1999). Environmental behavior of explosives in groundwater from the Milan Army ammunition plant in aquatic and wetland plant treatments. Uptake and fate of TNT and RDX in plants. *Chemosphere*, 39, 2057-2072
- Bhadra, R., Wayment, D. G., Hughes, J. B. & Shanks, J. V. (1999). Confirmation of conjugation processes during TNT metabolism by axenic plant roots. *Environmental Science and Technology*, 33, 446-452
- Briggs, G. G., Bromilow, R. H. & Evans, A. A. (1982). Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pesticide Science*, 13, 495-504
- Gong, P., Wilke, B. M. & Fleischmann, S. (1999). Soil-base phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 152-157
- Görge, E., Brandt, S. & Werner, D. (1994). Uptake and metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene in higher plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 1, 229-233
- Hannink, N., Rosser, S. J. & Bruce, N. C. (2002). Phytoremediation of explosives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 511-538
- Honeycutt, M. E., Jarvis, A. S. & MacFarland, V. A. (1996). Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35, 282-287
- Kim, J., Drew, M. C. & Corapcioglu, M. Y. (2004). Uptake and phytotoxicity of TNT in onion plant. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 39, 803-819

Medina, V. F., Maestri, E., Marmiroli, M., Dietz, A. C. & McCutcheon, S. C. (2003). Plant tolerances to contaminants. (In J. L. Schnoor, (Eds), *Phytoremediation - Transformation and control of contaminants* (pp. 189-232). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons)

Palazzo, A. J. & Leggett, D. (1986). Effect and disposition of TNT in a terrestrial plant. *Journal of Environmental Quality*, 15, 49-52

Price, R. A., Pennington, J. C., Larson, S. L., Neumann, D. & Hayes, C. A. (2002). Uptake of RDX and TNT by agronomic plants. *Soil and Sediment Contamination*, 11, 307-326

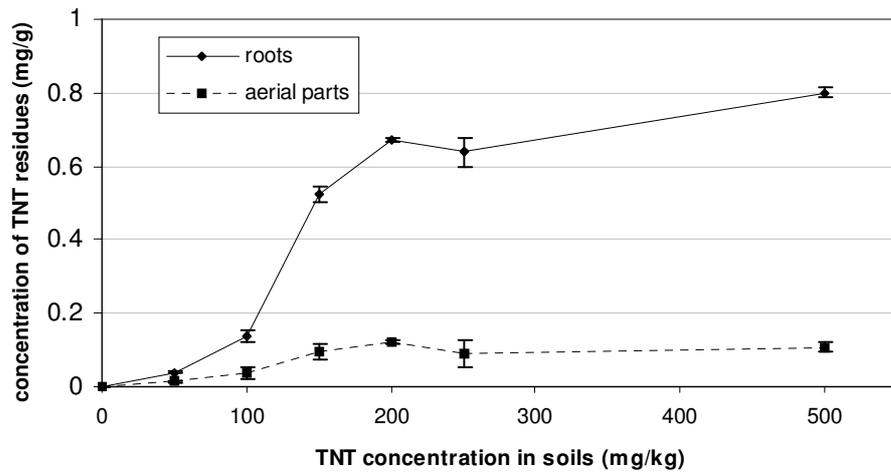
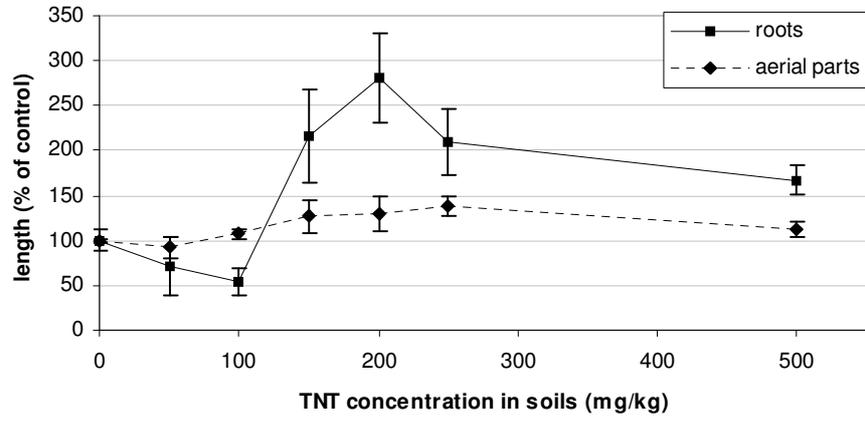
Robidoux, P. Y., Bardai, G., Paquet, L., Ampleman, G., Thiboutot, S., Hawari, J. & Sunahara, G. I. (2003). Phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in spiked artificial and natural forest soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 198-209

Spain, J. (2000). Introduction. (In H. Knackmuss, (Eds), *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives* (pp. 1-5). Boca Raton, Florida: Lewis Publishers)

Talmage, S. S., Opresko, D. M., Maxwell, C. J., Welsh, C. J. E., Cretella, F. M., Reno, P. H. & Daniel, F. B. (1999). Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 161, 1-156

Vila, M., Mehier, S., Pascal-Lorber, S. & Laurent, F. (2006). Phytotoxicity to and uptake of RDX by rice. *Environmental Pollution*, (in press), DOI 10.1016/j.envpol.2006.1005.1009

Vila, M., Pascal-Lorber, S., Rathahao, E., Debrauwer, L., Canlet, C. & Laurent, F. (2005). Metabolism of [¹⁴C]-2,4,6-trinitrotoluene in tobacco cell suspension cultures. *Environmental Science & Technology*, 39, 663-672



PUBLICATION 3 :

Fate of RDX and TNT in agronomic plants

Vila M, Pascal-Lorber S and Laurent F

Environmental Pollution, acceptée

Fate of RDX and TNT in agronomic plants

M. Vila, S. Lorber-Pascal, F. Laurent*

Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1089 Xénobiotiques, 180, Chemin de
Tournefeuille, BP3, 31931 TOULOUSE Cedex 9, France

5 * corresponding author. Tel. +33 5.61.28.53.92 Fax: +33 5.61.28.52.44 e-mail address:

flaurent@toulouse.inra.fr

Abstract.

Phytoremediation is of great interest to remediate soil contaminated with hexahydro-1,3,5-
10 trinitro-1,3,5-triazine (RDX) and 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). The ability of 4 agronomic plants
(maize, soybean, wheat and rice) to take up these explosives and their fate in plants were
investigated. Plants were grown for 42 days on soil contaminated with [¹⁴C]RDX or [¹⁴C]TNT.
Then, each part was analyzed for its radioactivity content and the percentage of bound and
soluble residues was determined following extractions. Extracts were analyzed by radio-HPLC.
15 More than 80% of uptaken RDX was translocated to aerial tissues, up to 64.5 mg g⁻¹ of RDX. By
contrast, TNT was little translocated to leaves since less than 25% of uptaken TNT was
accumulated in aerial parts. Concentrations of TNT residues were 20 times lower than for RDX
uptake. TNT was highly metabolized to bound residues (more than 50% of radioactivity) whereas
RDX was mainly found in its parent form in aerial parts.

20

Keywords. Phytoremediation; RDX; TNT; Crop plants.

Capsule. Crop plants are able to accumulate RDX in aerial parts and to metabolize TNT in roots.

Introduction

25 Soil polluted with explosives, such as hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) and 2,4,6-
trinitrotoluene (TNT), is a crucial environmental problem. Nitroaromatics are toxic and classified
as Group C, possible human carcinogens (Talmage et al., 1999). In the past, their methods of
production and storage led to wide dispersion of explosives in the environment. Wastewater
resulting from the production of explosives was collected in lagoons to allow solid materials to
30 settle prior to release to rivers and streams (Harvey et al., 1990). Explosives and residues have
accumulated in high concentrations in restricted areas. On the other hand, storage and tests have
led to dispersion of explosives and explosion residues over large areas with a low rate of
contamination. Conventional methods to remediate sites contaminated by explosives, such as
excavation followed by incineration or landfilling are too expensive and are not suitable for low
35 concentrations over large contaminated areas (Sung et al., 2004). Phytoremediation is an
emerging technology that uses plants to uptake, accumulate, degrade and detoxify organic and
inorganic pollutants. This method is less expensive than others and is well accepted by the
general public (Boyajian and Carreira, 1997). The uptake and the fate of the pollutant in plants
are important criteria to evaluate the efficiency of phytoremediation.

40 The uptake of an organic compound by plants depends on many characteristics, the main factor
being the \log_{10} octanol-water partition coefficient ($\log K_{ow}$). Briggs et al. (Briggs et al., 1982)
determined that an organic compound with a $\log K_{ow}$ between 0 and 2.5 would be uptaken by
plants. The $\log K_{ow}$ of RDX and TNT are respectively 0.87 and 1.6 (Burken and Schnoor, 1998;
Talmage et al., 1999). Thus, plants should be able to uptake RDX and TNT. Several studies have
45 evidenced the ability of plants to uptake RDX but these studies were almost exclusively
hydroponic (Best et al., 2005; Bhadra et al., 2001; Harvey et al., 1991; Price et al., 2002;
Thompson et al., 1999). Similar experiments have shown that many plants were also able to
uptake TNT from hydroponic solutions (Best et al., 1999; Kurumata et al., 2005; Snellinx et al.,
2002; Thompson et al., 1998). The amounts of explosives recovered in plants were good enough

50 to justify considering the use of phytoremediation processes but these results need to be confirmed in long-term experiments and with contaminated soil. Moreover, accumulation of RDX can lead to phytotoxic symptoms (Vila et al., 2006).

The fate of explosives in plants has received considerable attention. RDX has limited metabolism in plants (Harvey et al., 1991). A few experiments have evidenced slight formation of metabolites from RDX but these metabolites have not yet been identified (Van Aken et al., 2004). A recent study (Just and Schnoor, 2004) showed photochemical degradation resulting in the mineralization of RDX by phytophotolysis in cell culture. Metabolites arising from phytophotolysis or from microorganisms in soils (MNX, DNX, TNX) (Snellinx et al., 2002) have not been observed in whole plant experiments. In contrast, TNT was rapidly reduced into hydroxylamines or amines and then conjugated to sugars by plants (Bhadra et al., 1999; Subramanian et al., 2006; Vila et al., 2005).

Best et al. (1999) suggested that RDX uptake was lower than that of TNT in aquatic and wetland plants. Burken (Burken, 2003) studied the uptake of RDX and TNT by hybrid poplar trees after only 2 days of hydroponic culture. Their results showed that the two explosives had a different fate in plants: RDX was translocated to aerial parts whereas TNT was located only in roots and was not translocated to leaves. Their observations have not been confirmed in long-term experiments.

The objective of this study was to evaluate the ability of agronomic plants to take up RDX and TNT from freshly contaminated soil. Investigations were carried out on agronomic plants because of their high growth capacity. Maize, rice, wheat and soybean were the monocots and dicots used in our experiments. The metabolic fate of the two explosives in these plants was also studied. Information from this study may encourage further studies on phytoremediation processes.

Material and methods

75 *Chemicals*

Analytical grade (>99% purity) RDX was obtained from Eurenco (Sorgues, France) in the form of 1% contaminated sand with 25% humidity. RDX metabolites (MNX, DNX, TNX) were purchased from SRI International (Menlo Park, CA). The [U-¹⁴C]RDX obtained from Perkin Elmer Life Sciences (Courtaboeuf, France) was 98% pure, and exhibited a specific activity of 9.24 mCi mmol⁻¹. Unlabeled TNT was obtained from SCP Science (Courtaboeuf, France). Sand was contaminated at 1% with unlabeled TNT. [methyl-¹⁴C]-2,4,6-Trinitrotoluene (specific activity = 14 mCi mmol⁻¹; radiochemical purity >97% as determined by radio-HPLC analysis) was purchased from Moravек Biochemical (Brea, CA). Other chemicals used in the experiments were analytical grade reagents purchased from Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain).

85

Soil contamination

Sand with RDX or TNT was labeled with [¹⁴C]-explosives to obtain 120 mg and 5 μCi per jar. Compost (Nehaus NF U 44-551, pH 4, Geeste, Germany) was sieved through a 4 mm sieve. 320 g of artificial soil were mixed with 518 g of non-contaminated sand and 12 g of contaminated sand. The concentration of each explosive in the soil was 138 mg per kg according to preliminary phytotoxicity tests on TNT (data not shown) and RDX (Vila et al., 2006).

90

Plant materials and growth conditions

Maize (*Zea mays* cv Pavi), wheat (*Triticum aestivum* cv Apache), rice (*Oriza sativa* L. var. carinam), and soybean (*Glycine max* cv Imari) were used. Experiments were conducted in a temperature-controlled room. Environmental conditions were an average day/night temperature of 24/21°C and a 16 h photoperiod. Seeds were sown directly in contaminated soils.

95

Uptake

100 Three seeds of maize or soybean, and ten seeds of wheat or rice were placed in each jar. The experiments were performed in triplicate. Plants were harvested 42 days after sowing and separated into leaves and roots. Each part was freeze-dried then ground. Radioactivity was measured after oxidative combustion of aliquots of about 20 mg in an oxidizer (Packard Instrument Co, Downers Grove, IL). The resulting $^{14}\text{CO}_2$ was trapped in a scintillation mixture
105 (Carbo-Sorb and Permafluor, Packard) then counted by liquid scintillation in a Tricarb 2200 CA scintillation counter (Packard). Amounts of residues were calculated from the specific activity of RDX or TNT in soils, as equivalent parent compound.

Soluble and bound residues

110 Ground leaves and roots were extracted with acetonitrile/water (1:1, v/v) in the case of plants cultivated on soil contaminated with RDX, and with methanol/dichloromethane/water (2:1:0.8, v/v/v) in the case of soil contaminated with TNT (4 ml/g dry weight). They were stored overnight at 4°C. The homogenates were then centrifuged at 10 000 g for 10 min, and the pellets were washed twice in the solvent mixture. The three supernatants containing the soluble residues were
115 combined and counted by liquid scintillation. The residual materials, consisting of the unextractable residues, were freeze-dried for 24 h to remove organic solvents and water. Radioactivity of the residual materials was measured after oxidative combustion in an oxidizer.

Chromatography

120 The extracts were analyzed by reverse-phase HPLC with a HP 1100 liquid chromatograph (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). Radioactivity was monitored with an on-line Flo-One β A500 scintillation detector (Packard), using Flo-Scint II as scintillation counting cocktail (Packard, Downers Grove, IL). Separation was carried out on a C18 Bischoff reverse-phase

column (Prontosil Eurobond, 4.6 mm x 250 mm, 5 μ m) with a guard cartridge. Elution was
125 performed at 40°C at a flow rate of 1 ml/min. Analysis of both compounds was performed with
the same gradient. The column was equilibrated with 100% of solvent A (acetonitrile/water, 3:97,
v/v). Elution conditions were as follows: a 20 min linear increase of solvent B (acetonitrile/water,
40:60, v/v) from 0 to 100% followed by 100% solvent B for 10 min. In these conditions, retention
times of RDX and TNT were respectively 17 and 24 min.

130

Results and Discussion

Uptake, translocation and metabolism of RDX

The uptake of RDX in agronomic plants was assessed with [¹⁴C]RDX and 138 mg of RDX per kg
of soil. The four plants were able to grow in these conditions and took up RDX from soil. RDX
135 distribution between roots and leaves was determined as shown in Figure 1. Most ¹⁴C was found
in aerial parts, with >80% translocated into leaves. Our results are in agreement with those of
Harvey et al. (1991) who found that 86% of the [¹⁴C]RDX taken up into leaves of bush bean 7
days after application in a hydroponic treatment. Amounts of RDX residues in aerial parts varied,
ranging from 3.71 mg g⁻¹ dry wt (DW) in rice to 64.54 mg g⁻¹ DW in wheat (Figure 2). Rice
140 accumulated the lowest amounts of RDX in comparison to the other crop plants tested.

Thompson et al. (1999) obtained RDX concentrations ranging from 350 to 720 μ g g⁻¹ in the leaf
tissues of poplar trees after 7 days of hydroponic culture and Best et al. (1999) obtained 0.546 mg
RDX per g DW of *Elodea* after 13 days. These rates of accumulation appear to be lower than our
results but the conditions and times of exposure in the two experiments were too different to
145 allow any conclusions to be drawn.

The ratio of soluble to bound residues of RDX varied with plant parts and species (Figure 3). In
aerial parts of maize, soybean, and rice, up to 70% of the radioactivity was extractable as soluble
residues. In wheat, 56% of the radioactivity in aerial parts was soluble. HPLC analysis of extracts

of aerial parts revealed weak degradation of RDX (Figure 4). More than 90% of soluble residues
150 was detected as the parent compound. No known RDX degradation products, such as MNX,
DNX, and TNX, were found. The high polarity of metabolites prevented their purification and
identification.

Wheat, rice and soybean displayed phytotoxic symptoms, bleaching and necrosis (Figure 5), after
42 days of growth on soil contaminated with RDX. As early as 21 days, soybean leaves showed
155 necroses located on leaf blade margins. As described for rice (Vila et al., 2006), phytotoxic
symptoms were located at the extremities of wheat leaves. Limited RDX metabolism in plants has
been observed in previous studies (Harvey et al., 1991; Vila et al., 2006) and accumulated
radioactivity in leaves was mainly RDX. As shown for rice (Vila et al., 2006), the necroses
observed could result from this high accumulation of RDX. Adverse developmental effects like
160 bleaching and necrotic spots have also been observed by Windfield et al. (Winfield et al., 2004).
In other studies (Rocheleau et al., 2005), no adverse effects of RDX were observed at 10,000 mg
kg⁻¹ on the terrestrial plants tested (alfalfa, Japanese millet, corn, lettuce and ryegrass). This lack
of phytotoxicity could result from the time of culture, which did not exceed 19 days, depending
on plant species. If the plants tested did not accumulate high quantities of RDX, no adverse
165 effects would be observed. Long-term experiments allow plants to accumulate RDX in their
aerial parts and lead to necrosis symptoms. In soybean, the high rate of accumulation finally
resulted in the abscission of leaves with many necrotic areas. This phenomenon could lead to
renewed contamination of soil and could also contribute to further dispersing pollution. In
contrast, owing to a low rate of RDX accumulation, maize showed no phytotoxic symptoms. In
170 wheat, necroses did not cause leaves to fall. In this context, despite necroses on leaf extremities,
wheat was able to accumulate large quantities of RDX in its aerial parts without a decrease of its
growth (data not shown).

Uptake, translocation and metabolism of TNT

175 All the plants except rice were able to grow on soil freshly contaminated with TNT. The growth rate of rice was lower when it was cultivated on soil with TNT than with RDX or with non-contaminated soil (data not shown). This observation is in agreement with the literature where RDX toxicity is reported to be considerably lower than TNT toxicity (Hannink et al., 2002). The uptake and fate of TNT were determined with [¹⁴C]TNT and unlabeled TNT. All four
180 agronomic plants took up radioactivity. In all the plants, most TNT residues were located in the roots. A small proportion - less than 25% - was translocated into aerial parts (Figure 1). The percentage translocated to the leaves was similar in the four plants. The concentration of [¹⁴C]TNT residues in different plant parts is shown in Figure 6. In wheat, roots accumulated 7 times more than leaves, 2.83 mg g⁻¹ and 0.48 mg g⁻¹ respectively.

185 In roots, except rice, more than 70% of radioactivity was not extractable (Figure 7). Analysis of extracts by radio HPLC showed that TNT was completely metabolized (Figure 4). HPLC radiochromatograms were qualitatively and quantitatively different depending on the plant species. Many polar peaks appeared but it was not possible to identify them. After 42 days, TNT was below detection limits. In our previous work (Vila et al., 2005), TNT metabolites conjugated
190 with mono- or di-glycoside were identified in cell cultures after 5 days. They showed polarities lower than those of the new metabolites observed in plants. The latter could thus be higher saccharide derivatives. In conclusion, TNT was metabolized to more polar products, which would be compartmented in vacuoles or cell wall matrix.

Comparison between RDX and TNT

195 In the four plant species studied, RDX uptake was significantly higher than that of TNT and the fate of the two compounds in the plants was very different. Even though TNT has a more favorable log K_{ow} for translocation than RDX (1.6 and 0.87 respectively), TNT remained in the

roots whereas RDX was mainly translocated to shoots. As RDX was not metabolized, the
200 difference in their fate after absorption by plants could be related to their metabolic reactivity.
TNT was rapidly metabolized to high polar compounds, probably stored in vacuoles, and to
unextractable residues sequestered in cell walls. In spite of the fact that its log K_{ow} is optimal for
translocation (Briggs et al., 1982), weak uptake associated with a high metabolic rate led to the
sequestration of TNT residues in roots. Formation of bound residues increased TNT
205 immobilization in roots. In the case of RDX, the presence of unextractable residues was
surprising because no intermediary metabolites, such as primary metabolites or conjugates, were
found. This could be due to direct sequestration of RDX in the cell wall matrix. More rapid
formation of unextractable residues than of primary or secondary metabolites could also explain
the apparent absence of soluble metabolites.

210
To remediate, and to be able to act on pollutants, plants must be in direct contact with them
(Pilon-Smits and Freeman, 2006). The bioavailability of the explosive is consequently important
for the efficiency of its remediation. As for plant uptake, bioavailability depends on the chemical
properties of the explosive, but also on the characteristics of the soil (concentration of organic
215 matter, size of particles) and on the age of contamination. The latter is a complicating factor for *in*
situ studies because explosives could be strongly adsorbed to the soil. The aging of the
contamination reinforces the adsorption that consequently reduces bioavailability. In the soils that
were contaminated many years ago, nominal concentration and bioavailability were not
correlated (Alexander, 2000). In our study with freshly contaminated soils, RDX or TNT was
220 added to an uncontaminated soil thoroughly mixed to known starting concentrations and plants
were able to remediate this pollution. RDX was phytoextracted whereas TNT was phyto-
degraded then -immobilized. Nevertheless further studies must be conducted to investigate the
effect of the contamination age on the ability of plants to uptake pollutants.

225 **Conclusion**

RDX and TNT have a fate and removal rates markedly different in plants. RDX appeared to be more recalcitrant to plant metabolism than TNT, and it was translocated to the extremities of aerial parts in its parent form. Crop plants have a high capacity to uptake and accumulate RDX in their aerial parts. The ability of soybean and likely other dicots to accumulate RDX was lessened
230 by leaf fall, which lead to dispersion of explosives. For this reason, monocots appear more suitable than dicots for RDX contaminated soil uptake. Plants growing on soil freshly contaminated with RDX have uptaken and translocated RDX to aerial parts but no metabolism occurred. Thus, plants tempted to decrease toxicity of the explosive by compartmentation in vacuoles and cell wall. For TNT, accumulation rates in roots and translocation rates to aerial parts
235 are less favorable; nevertheless the high rate of metabolism could be sufficient to envisage the use of plants to decrease TNT contamination. Plant strategy used to grow on soils contaminated with TNT was based on metabolization and immobilization of TNT in roots.

Acknowledgements

240 Support for this research was provided by the *Délégation Générale de l'Armement* (PEA 033603). We would like to thank J.C. Evrard (*Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*, Montpellier, France) for providing the rice seeds. Thanks are due to Daphne Goodfellow for critical reading of the English.

245 **Figures**

Fig 1: Distribution of RDX and TNT residues in aerial parts of plants cultivated for 42 days on soil contaminated with explosives. Results are expressed as a percentage of radioactivity uptaken.

Fig 2: Concentration of equivalent RDX in roots and aerial parts of plants cultivated for 42 days on soil contaminated with 138 mg RDX per kg. Results are expressed as mg equivalent parent
250 compound/g (DW) of RDX residues. n = 3.

Fig 3: Distribution of radioactivity between soluble and unextractable residues in different parts of plants cultivated on soil contaminated with RDX. Results are expressed as a percentage of soluble residues.

Fig 4: HPLC radio-chromatogram of extracts from wheat exposed for 42 days. (a) Aerial parts of
255 wheat cultivated on soil contaminated with RDX, and (b) roots of wheat cultivated on soil contaminated with TNT.

Fig 5: Appearance of necrosis on soybean leaves cultivated on soil contaminated with RDX, after 21 and 42 days of growth.

Fig 6: Concentration of equivalent TNT in roots and aerial parts of plants cultivated for 42 days
260 on soil contaminated with 138 mg of TNT per kg. Results are expressed as mg equivalent parent compound/g (DW) of TNT residues. n = 3.

Fig 7: Distribution of radioactivity between soluble and unextractable residues in different parts of plants cultivated on soil contaminated with TNT. Results are expressed as a percentage of unextractable residues.

265

References

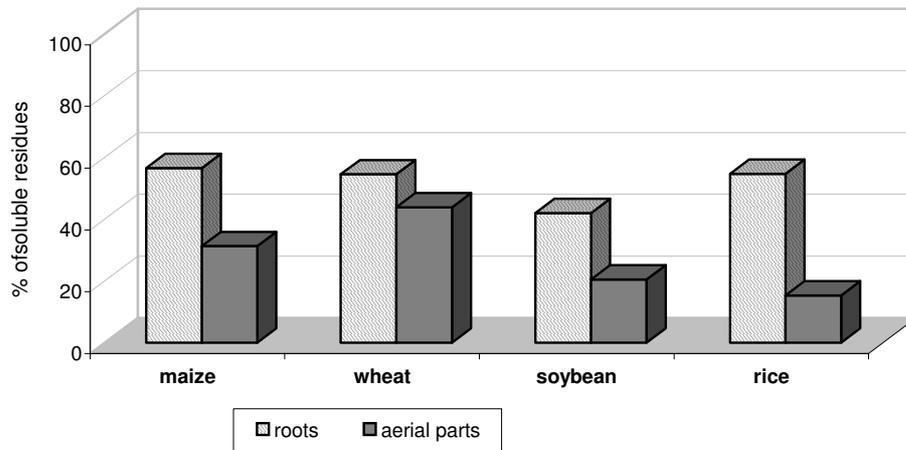
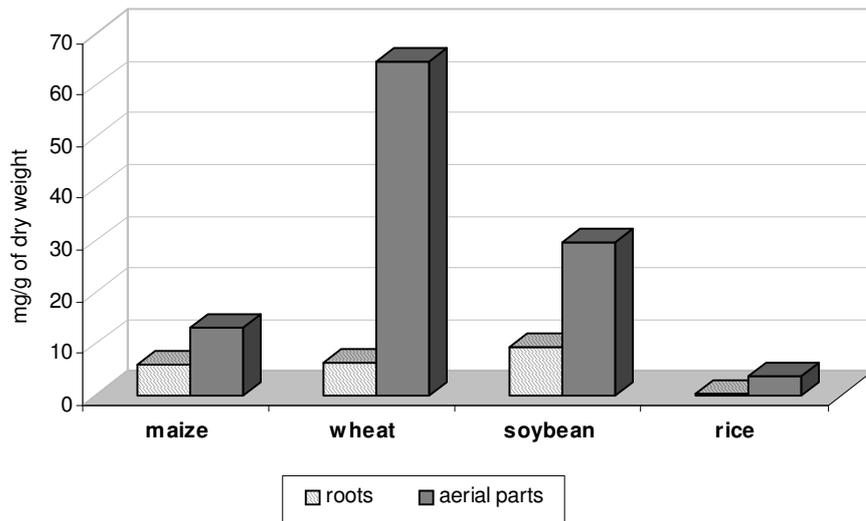
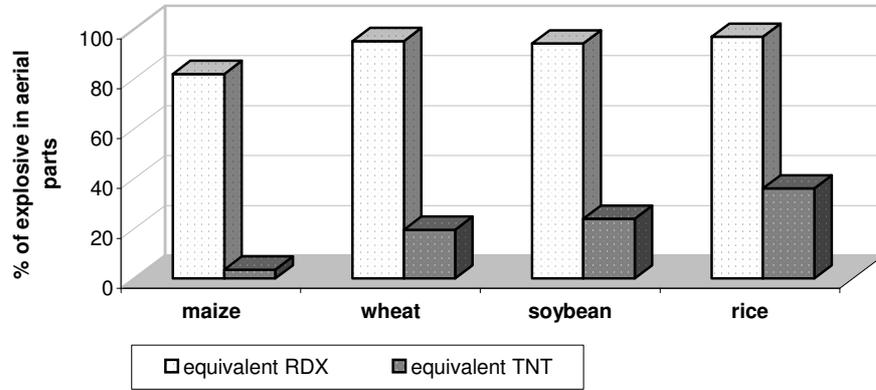
Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology* 34, 4259-4265.

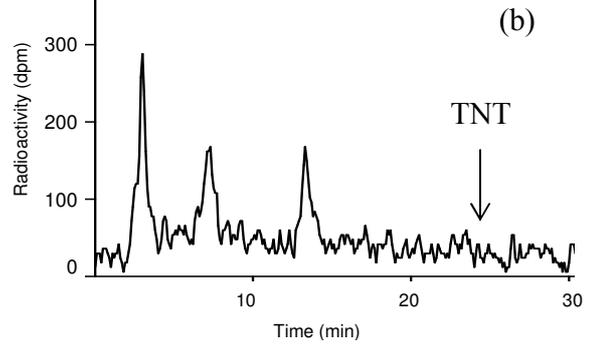
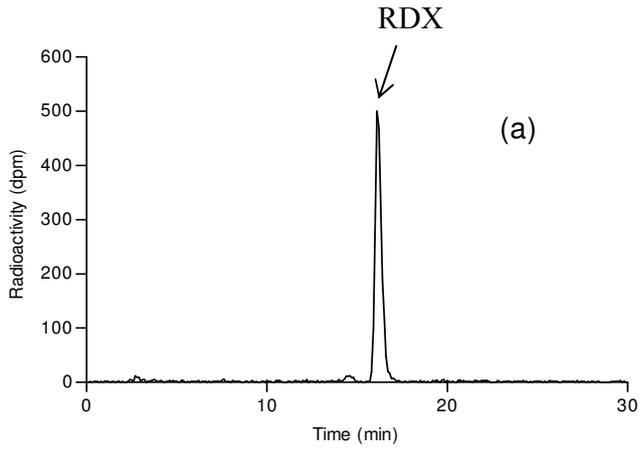
Best, E.P.H., Kvesitadze, G., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T., 2005. Plant processes important
270 for the transformation and degradation of explosives contaminants. *Zeitschrift fur Naturforschung* 60c, 340-348.

Best, E.P.H., Sprecher, S.L., Larson, S.L., Fredrickson, H.L., Bader, D.F., 1999. Environmental behavior of explosives in groundwater from the Milan Army ammunition plant in aquatic and

- 275 wetland plant treatments. Uptake and fate of TNT and RDX in plants. *Chemosphere* 39, 2057-2072.
- Bhadra, R., Wayment, D.G., Hughes, J.B., Shanks, J.V., 1999. Confirmation of conjugation processes during TNT metabolism by axenic plant roots. *Environmental Science and Technology* 33, 446-452.
- 280 Bhadra, R., Wayment, D.G., Williams, R.K., Barman, S.N., Stone, M.B., Hughes, J.B., Shanks, J.V., 2001. Studies on plant-mediated fate of the explosives RDX and HMX. *Chemosphere* 44, 1259-1264.
- Boyajian, G.E., Carreira, L.H., 1997. Phytoremediation: a clean transition from laboratory to marketplace? *Nature Biotechnology* 15, 127-128.
- 285 Briggs, G.G., Bromilow, R.H., Evans, A.A., 1982. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pesticide Science* 13, 495-504.
- Burken, J.G., 2003. Uptake and metabolism of organic compounds: green-liver model, in: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Eds.), *Phytoremediation - Transformation and control of contaminants*. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 59-84.
- 290 Burken, J.G., Schnoor, J.L., 1998. Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environmental Science and Technology* 32, 3379-7785.
- Hannink, N., Rosser, S.J., Bruce, N.C., 2002. Phytoremediation of explosives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21, 511-538.
- 295 Harvey, S.D., Fellows, R.J., Cataldo, D.A., Bean, R.M., 1990. Analysis of 2,4,6-trinitrotoluene and its transformation products in soils and plant tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 518, 361-374.
- Harvey, S.D., Fellows, R.J., Cataldo, D.A., Bean, R.M., 1991. Fate of the explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in soil and bioaccumulation in bush bean hydroponic plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 845-855.
- 300 Just, C.L., Schnoor, J.L., 2004. Phytophotolysis of Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in leaves of Reed Canary Grass. *Environmental Science & Technology* 38, 290-295.
- Kurumata, M., Takahashi, M., Sakamoto, A., Ramos, J.L., Nepovim, A., Vanek, T., Hirata, T., Morikawa, H., 2005. Tolerance to, and uptake and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) are enhanced by the expression of a bacterial nitroreductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 60, 272-278.
- 305 Pilon-Smits, E.A.H., Freeman, J.L., 2006. Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerations. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4, 203-210.

- Price, R.A., Pennington, J.C., Larson, S.L., Neumann, D., Hayes, C.A., 2002. Uptake of RDX and TNT by agronomic plants. *Soil and Sediment Contamination* 11, 307-326.
- 310 Rocheleau, S., Martel, M., Bardai, G., Sarrazin, M., Dodard, S., Paquet, L., Corriveau, A., Hawari, J., Gong, P., Sunahara, G.I. Biotechnology Research Institute, 2005. Toxicity of nitro-heterocyclic and nitroaromatic energetic materials to terrestrial plants in a natural sandy loam soil. Arlington, USA.
- 315 Snellinx, Z., Nepovilm, A., Taghavi, S., Vangrosveld, J., Vanek, T., Van Der Lelie, D., 2002. Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. *Environmental Science and Pollution Research International* 9, 48-61.
- Subramanian, M., Oliver, D.J., Shanks, J.V., 2006. TNT phytotransformation pathway characteristics in *Arabidopsis*: Role of aromatic hydroxylamines. *Biotechnology Progress* 22, 208-216.
- 320 Sung, K., Munster, C.L., Yavuz Corapcioglu, M., Drew, M.C., Park, S., Rhykerd, R., 2004. Phytoremediation and modeling of contaminated soil using eastern gamagrass and annual ryegrass. *Water, Air and Soil Pollution* 159, 175-195.
- Talmage, S.S., Opresko, D.M., Maxwell, C.J., Welsh, C.J.E., Cretella, F.M., Reno, P.H., Daniel, F.B., 1999. Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 161, 1-156.
- 325 Thompson, P.L., Ramer, L.A., Schnoor, J.L., 1998. Uptake and transformation of TNT by hybrid poplar trees. *Environmental Science and Technology* 32, 975-980.
- Thompson, P.L., Ramer, L.A., Schnoor, J.L., 1999. Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine translocation in poplar trees. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 279-284.
- 330 Van Aken, B., Yoon, J.M., Just, C.L., Schnoor, J.L., 2004. Metabolism and mineralisation of Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine inside poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN-34). *Environmental Science & Technology* 38, 4572-4579.
- Vila, M., Mehier, S., Pascal-Lorber, S., Laurent, F., 2006. Phytotoxicity to and uptake of RDX by rice. *Environmental Pollution* (in press), DOI 10.1016/j.envpol.2006.05.009.
- 335 Vila, M., Pascal-Lorber, S., Rathahao, E., Debrauwer, L., Canlet, C., Laurent, F., 2005. Metabolism of [¹⁴C]-2,4,6-trinitrotoluene in tobacco cell suspension cultures. *Environmental Science & Technology* 39, 663-672.
- 340 Winfield, L.E., Rodgers, J.H., D'Surney, S.J., 2004. The responses of selected terrestrial plants to short (< 12 days) and long term (2, 4 and 6 weeks) hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) exposure. Part I: Growth and developmental effects. *Ecotoxicology* 13, 335-347.





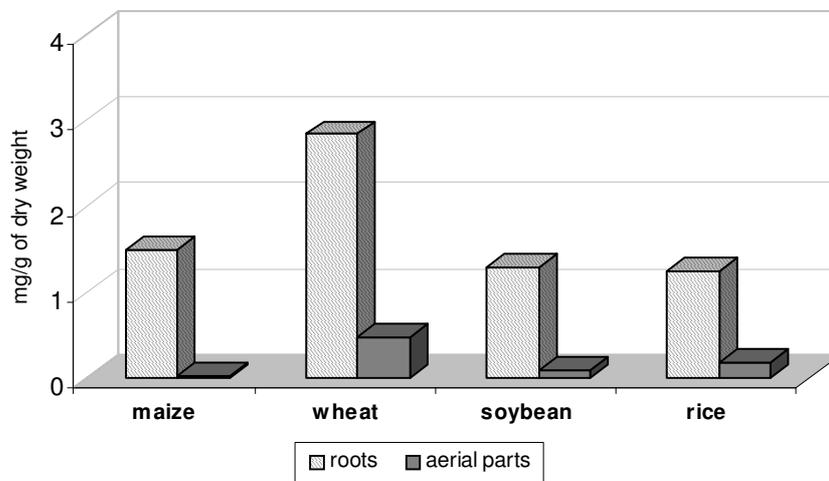
Non-contaminated soil

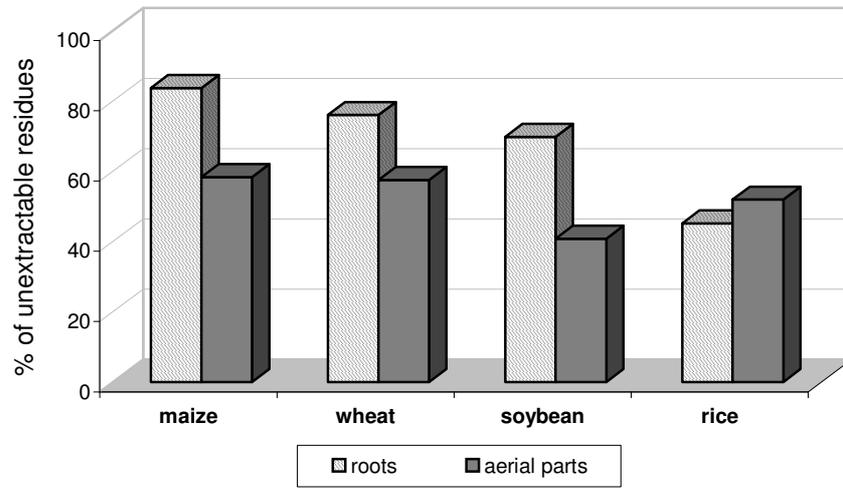
RDX amended soil

21 days



42 days





CHAPITRE III

ABSORPTION ET TRANSFERT DES EXPLOSIFS CHEZ LES PLANTES HELOPHYTES

Les plantes agronomiques se sont révélées efficaces pour concentrer les explosifs mais elles ne sont pas toujours adaptées au type de sites contaminés. Dans le cas d'une contamination due au lagunage des eaux usées d'usines de production d'explosifs, le riz est adapté mais d'autres plantes lacustres connues pour leur capacité à épurer des systèmes hydriques peuvent être envisagées. Les études précédentes sur le RDX et le TNT chez les plantes cultivées ont montré que les deux composés avaient des comportements différents. Nous avons alors testé plusieurs plantes héliophytes pour leur absorption du RDX puis, après avoir affiné le choix des plantes, nous avons mesuré l'évolution de l'absorption et du transfert des deux explosifs au cours du temps.

III.1 Absorption du RDX par les plantes lacustres

Les plantes lacustres testées dans cette première expérimentation sont la massette (*Typha latifolia*), le scirpe lacustre (*Scirpus lacustris*), l'iris d'eau (*Iris pseudoacorus*), le phalaris roseau (*Phalaris arundinacea*), le roseau (*Phragmites communis*) et le carex (*Carex riparia*). Ces plantes ont la capacité de croître dans des conditions correspondant à celles retrouvées dans les lagunes contaminées. Elles sont particulièrement adaptées à des milieux de transition entre le terrestre et l'aquatique. Elles couvrent parfois de vastes marais peu profonds. Ces plantes sont les principales plantes utilisées dans les stations d'épuration par filtre végétal. Leurs capacités épuratoires n'ont toutefois été mises en évidence que pour les nitrates et les phosphates mais pas pour les composés organiques (Ciria *et al.*, 2005). Ces différentes caractéristiques nous ont tout de même conduit à les envisager dans un processus de phyto-dépollution des lagunes.

Les plantes ont été cultivées sur des sols contaminés avec 500 et 1000 mg de RDX/kg. Ces concentrations sont en deçà des concentrations retrouvées sur ces types de sites mais à 1000 mg/kg la phase aqueuse étant saturée en RDX dans nos conditions de culture, il n'est pas nécessaire dans un premier temps de tester des concentrations plus élevées.

III.1.1 Méthodes et conditions de culture

A l'instar des expérimentations précédentes, l'utilisation de RDX radiomarqué a permis de suivre l'absorption et la distribution du RDX dans la plante par combustion des échantillons puis mesure de la radioactivité par comptage en scintillation liquide. Le RDX non radiomarqué a été fourni par Eurenco (Sorgues, France) sous forme de sable fin contaminé à 1%, humidifié à 25%, ce sable a été contaminé avec le RDX radiomarqué sous forme de solution acétonique.

Les plantes ont été achetées chez Alisma (Taurignan-Castet, France) à l'état de plantules de 10 cm maximum. Après transplantation dans le sol contaminé, elles sont cultivées durant huit semaines dans une armoire de culture contrôlée avec une température moyenne de 24°C le jour et 21°C la nuit et une durée de jour de 16 h. Les sols ont été préparés dans des pots non percés en mélangeant le sable contaminé, du sable non contaminé et du terreau tamisé dans les quantités suivantes :

Concentration finale en RDX	Quantité de sable fin contaminé à 1% de RDX radiomarqué (g)	Quantité de sable moyen (g)	Quantité de terreau tamisé sec (g)	Ratio total
500 mg/kg	20	230	150	0,2 g de RDX pour 400 g de sol
1000 mg/kg	25	37	188	0,25 g de RDX pour 250 g de sol

Les plantes ont été arrosées quotidiennement pour maintenir l'humidité à saturation. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque plante.

III.1.2 Résultats et discussion

Le roseau n'a pas pu être testé à 1000 mg/kg. Toutes les plantes testées ont été capables de pousser sur les sols contaminés et d'absorber du RDX. Les quantités et les concentrations retrouvées dans les différentes parties des plantes sont plus de deux fois supérieures sur des sols contaminés à 1000 mg/kg qu'à 500 mg/kg (Figure III.1). Le transport des polluants organiques neutres étant un transport passif, ce dernier est proportionnel à la concentration dans la phase aqueuse du sol. Ainsi, les variations d'absorption par les plantes peuvent être dues à une plus grande disponibilité de l'explosif. En effet, à 500 mg/kg, il y a a priori deux fois moins de RDX dans la phase aqueuse qu'à 1000 mg/kg. La phase aqueuse représente la partie disponible pour la

plante. La différence dans l'absorption du RDX en fonction de sa concentration dans le sol a déjà été observée dans la publication 1.

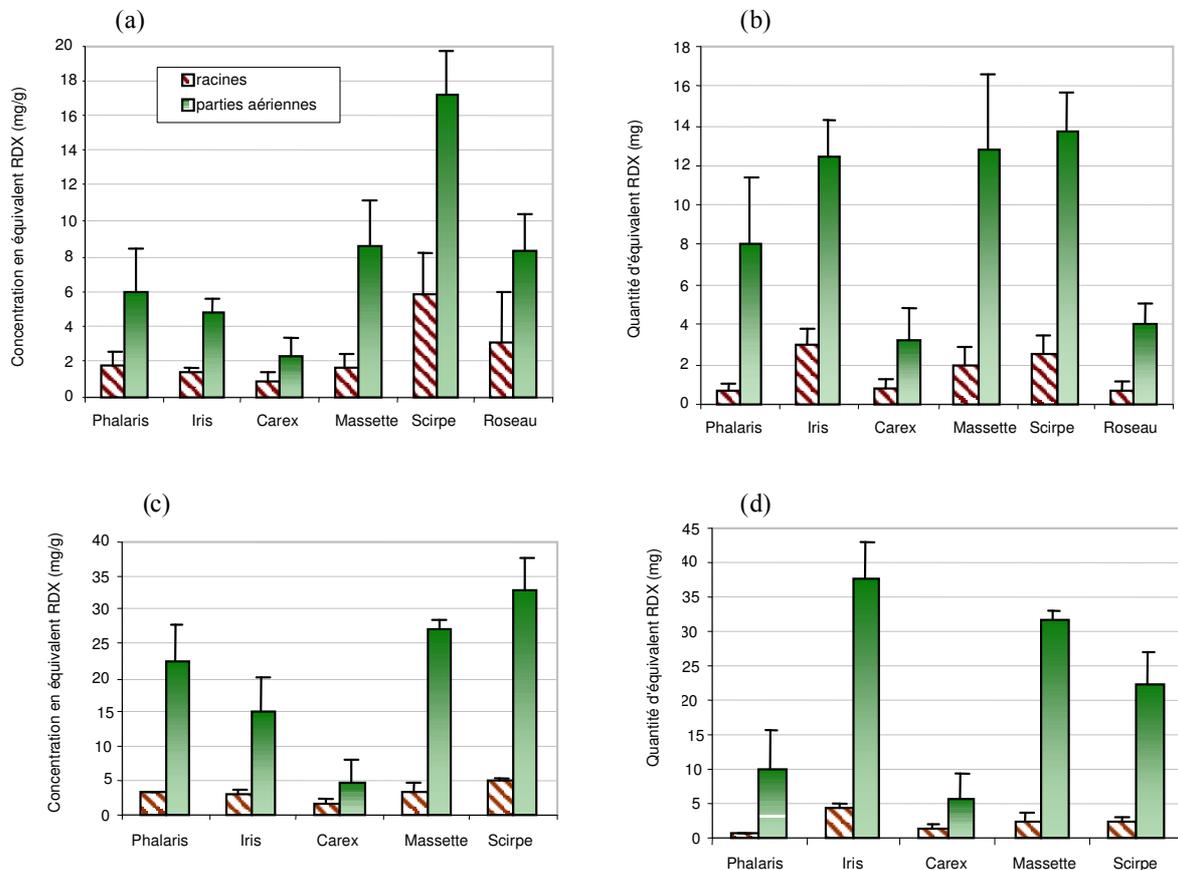


Figure III.1. Absorption et transfert du RDX dans les parties aériennes et les racines de chaque plante cultivée durant 8 semaines sur des sols reconstitués contaminés à 500 mg/kg, (a) en concentrations de RDX (mg/g) ou (b) en quantités de RDX par plante (mg) et sur des sols contaminés à 1000 mg/kg, (c) en concentrations de RDX (mg/g) ou (d) en quantités de RDX par plante (mg). n=3

Les plantes testées ont absorbé des quantités variables de RDX. En effet, les concentrations retrouvées dans les parties aériennes du carex sont au moins trois fois plus faibles que celles de l'iris d'eau et six fois plus faibles que le scirpe lacustre. Ces faibles concentrations ne sont pas compensées par une forte production de biomasse puisque la quantité totale absorbée par plante ne dépasse pas 7 mg de RDX avec un sol contaminé à 1000 mg/kg. Le carex ne présente pas des

capacités d'absorption suffisantes pour être envisagé dans un processus de phyto-dépollution. A contrario, les iris d'eau concentrent peu l'explosif mais la forte production de biomasse leur permet d'absorber des quantités totales de RDX aussi élevée que le scirpe lacustre ou la massette. Avec une accumulation de 37 mg de RDX dans les parties aériennes, les iris d'eau peuvent être envisagés dans un processus de phyto-dépollution du RDX. Malgré une plus faible production de biomasse, le scirpe lacustre a une grande capacité à accumuler l'explosif (33 mg/g de poids sec à 1000 mg/kg).

Quelle que soit la plante, la majorité de la radioactivité est localisée dans les parties aériennes dans lesquelles une quantité correspondant à plus de 75% de la radioactivité totale de la plante est retrouvée. Dès qu'il est absorbé, le RDX est transféré vers les parties aériennes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec les plantes cultivées et ceux de Harvey *et al.* (1991) et Thompson *et al.* (1999) qui ont obtenu respectivement 86% et 60% de transfert avec des pois et des peupliers en culture hydroponique, les plantes étant âgées seulement de sept jours. De même que pour les expérimentations présentées dans les publications 1 et 3, le RDX est accumulé par les plantes à des taux plus élevés que ceux rapportés dans la littérature (Best *et al.*, 1997 ; Harvey *et al.*, 1991 ; Price *et al.*, 2002 ; Thompson *et al.*, 1999 ; Yoon *et al.*, 2002).

Sur ces plantes, aucun effet sur la croissance ni aucune modification de l'aspect visuel n'ont été observés quelle que soit la concentration de RDX dans le sol. Les plantes aquatiques testées semblent donc plus tolérantes aux fortes concentrations dans le sol que les plantes agronomiques. Toutefois, pour le blé qui présentait le plus de nécroses, les concentrations en RDX dans les parties aériennes étaient deux fois plus grandes que pour les plantes aquatiques. Ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle les nécroses sont liées à l'accumulation du RDX et non à une tolérance différente en fonction du type de plante.

Le scirpe lacustre, l'iris d'eau et la massette ont une forte production de biomasse à l'hectare, entre 18 et 30 tonnes hectare après 5 mois de culture (données ALISMA). Ainsi, un hectare de massette pourrait accumuler jusqu'à 800 kg de RDX, 600 kg pour le scirpe lacustre et 420 kg pour l'iris d'eau. Ces calculs ne sont basés que sur l'expérimentation durant huit semaines, la concentration en RDX dans ces plantes peut ne pas être constante au cours du temps. Toutefois, la forte capacité à accumuler le RDX couplée à leur importante production de biomasse nous a conduit à choisir ces plantes pour les expérimentations ultérieures sur la cinétique d'absorption des explosifs.

III.2 Cinétique d'absorption et de transfert des explosifs chez les plantes lacustres

Lors des expérimentations précédentes, il a été démontré que les plantes lacustres étaient capables d'absorber le RDX et de le transférer vers leurs parties aériennes. Toutefois, cette absorption n'a été mesurée qu'au bout de 8 semaines et uniquement pour le RDX. Compte tenu des résultats obtenus précédemment, nous avons choisi 3 plantes pour conduire ces expérimentations de cinétique et de transfert : l'iris d'eau, la massette et le scirpe lacustre. Nous avons aussi testé ces plantes pour leur capacité à absorber et accumuler le TNT. Ces expériences ont été réalisées en analysant l'évolution de l'absorption du TNT et du RDX en fonction du temps de culture sur les sols contaminés séparément par chaque explosif.

III.2.1 Protocole expérimental

Les symptômes phytotoxiques observés chez les plantes agronomiques n'ayant pas été observés chez les plantes aquatiques, la contamination du sol a été fixée à 1000 mg de RDX/kg. Pour le TNT, elle était de 300 mg par kg de sol. Les sols ont été préparés à partir de sable contaminé à 1% de RDX radiomarqué et à 2% de TNT radiomarqué. Les mélanges sont indiqués dans le tableau suivant :

Explosif	Quantité de sable fin contaminé par l'explosif (g)	Quantité de sable moyen (g)	Quantité de terreau tamisé sec (g)	Quantité totale d'explosif	Concentration finale (mg/kg)
RDX	100	525	375	1 g	1000
TNT	15	610	375	0,3 g	300

Les différentes plantes (massette, iris d'eau et scirpe lacustre) ont été cultivées dans une chambre de culture dans les mêmes conditions que celles utilisées pour conduire les expérimentations présentées précédemment. Les récoltes ont été réalisées après 15 jours, 1 mois, 1 mois et demi, 2 mois et 3 mois de culture. Un témoin sans contamination a été réalisé sur trois mois de culture. Les échantillons récoltés ont été traités selon un protocole identique à celui utilisé dans les expérimentations précédentes : lyophilisation, broyage, combustion à l'oxidizer suivi d'un comptage de la radioactivité par comptage en scintillation liquide. A la différence de précédemment, les plantes n'ont été transplantées dans les sols contaminés qu'après deux mois de

culture en petits pots sur des sols non contaminés, les plantes mesuraient alors une quarantaine de centimètres.

III.2.2 Cinétique d'absorption du RDX

Quel que soit le temps de culture considéré, l'analyse des plantes révèle que les concentrations absorbées par ces plantes sont plus faibles que celles observées dans les expérimentations précédentes (Figure III.2).

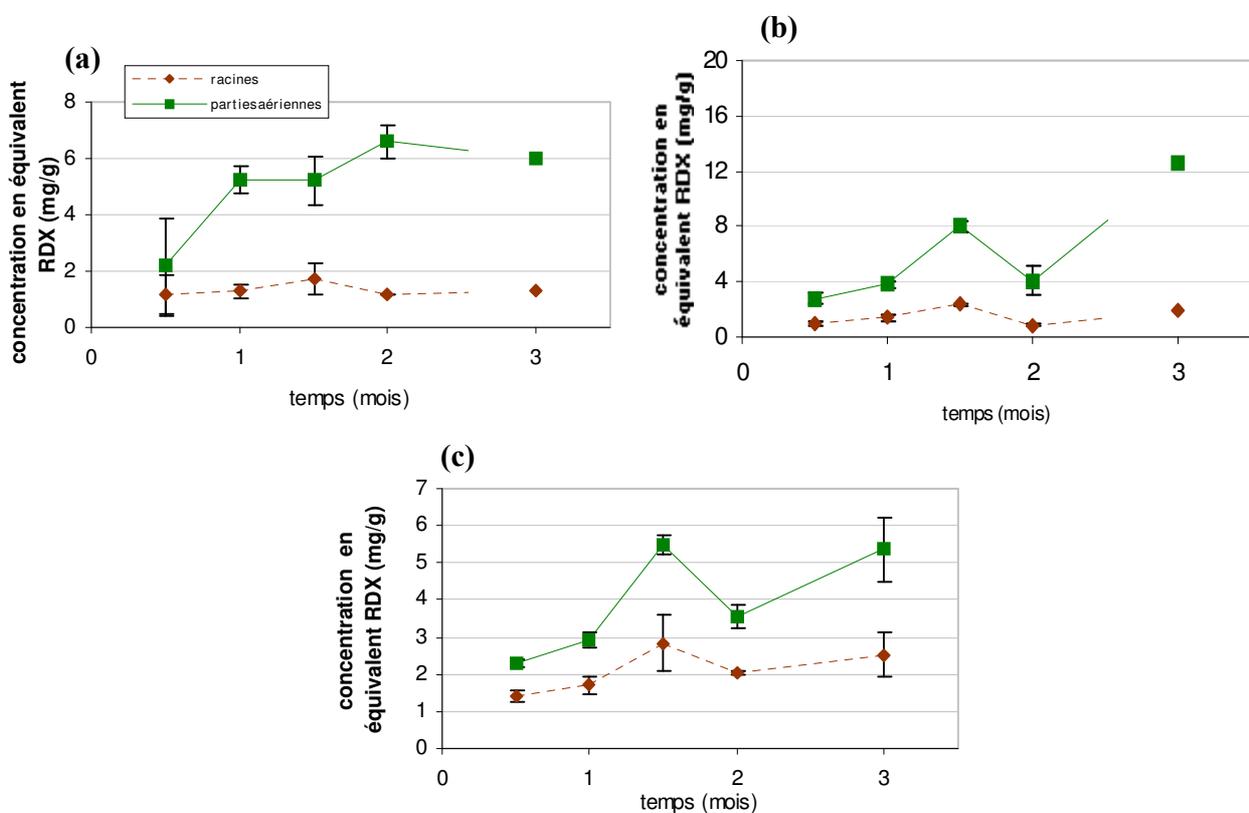


Figure III.2. Absorption du RDX et transfert vers les parties aériennes en fonction du temps de culture sur un sol contaminé à 1000 mg/kg. Concentration en équivalent RDX (a) chez la massette, (b) chez le scirpe lacustre et (c) chez l'iris d'eau.

Ces résultats varient en fonction du type de plante et les écart-types peuvent atteindre 50% de la concentration. Ils ne permettent pas de conclure sur l'effet d'un temps de culture long sur

l'absorption du RDX. Toutefois, plusieurs observations peuvent être faites à partir de ces résultats. Tout d'abord, les quantités mesurées dans les parties aériennes sont beaucoup plus importantes que celles mesurées dans les racines. Elles sont jusqu'à 10 fois supérieures. Après absorption, le RDX est majoritairement transféré dans les parties aériennes. Les concentrations et les quantités de RDX sont faibles après 15 jours de culture et elles ont tendance à augmenter aux temps plus longs de culture. Ceci est surtout valable pour la massette et le scirpe lacustre.

Bien que les concentrations mesurées soient effectivement plus faibles que celles mesurées lors de l'expérimentation précédente, les quantités totales sont du même ordre de grandeur après trois mois de culture sur sol contaminé. Cette différence de concentration peut être expliquée par le fait que les plantes étaient beaucoup plus grandes au début de l'expérimentation. Leur croissance a ainsi été plus faible que celle mesurée chez des plantes plus jeunes, particulièrement dans le cas de l'iris d'eau. Au bout de trois mois de culture, l'iris d'eau a présenté de faibles taux d'absorption en lien avec une faible croissance. Celle-ci était certainement liée aux conditions de culture, les iris d'eau étaient plus grands au moment de la transplantation que les autres plantes et le volume de sol n'était sans doute pas adapté pour une bonne croissance. Les iris d'eau sont restés dans un état quasi végétatif, sans croissance significative.

III.2.3 Cinétique d'absorption du TNT

D'une manière générale, toutes les plantes ont absorbé de faibles quantités de TNT, inférieures à 12 mg par plante, et la plus grande partie de la radioactivité absorbée, plus de 75%, reste localisée dans les racines (Figure III.3).

L'analyse des plantes cultivées sur des sols contaminés par 300 mg de TNT/kg a donné des résultats assez surprenants. En effet, les concentrations obtenues ne varient pas significativement avec le temps de culture pour une même plante, sauf pour l'iris d'eau pour lequel les quantités et les concentrations après un mois de culture sont deux fois plus importantes que pour les autres temps, même si l'écart-type pour ce temps est assez important. Les variations observées graphiquement semblent plus due à la variabilité mesurée entre les plantes qu'à un effet du temps de culture.

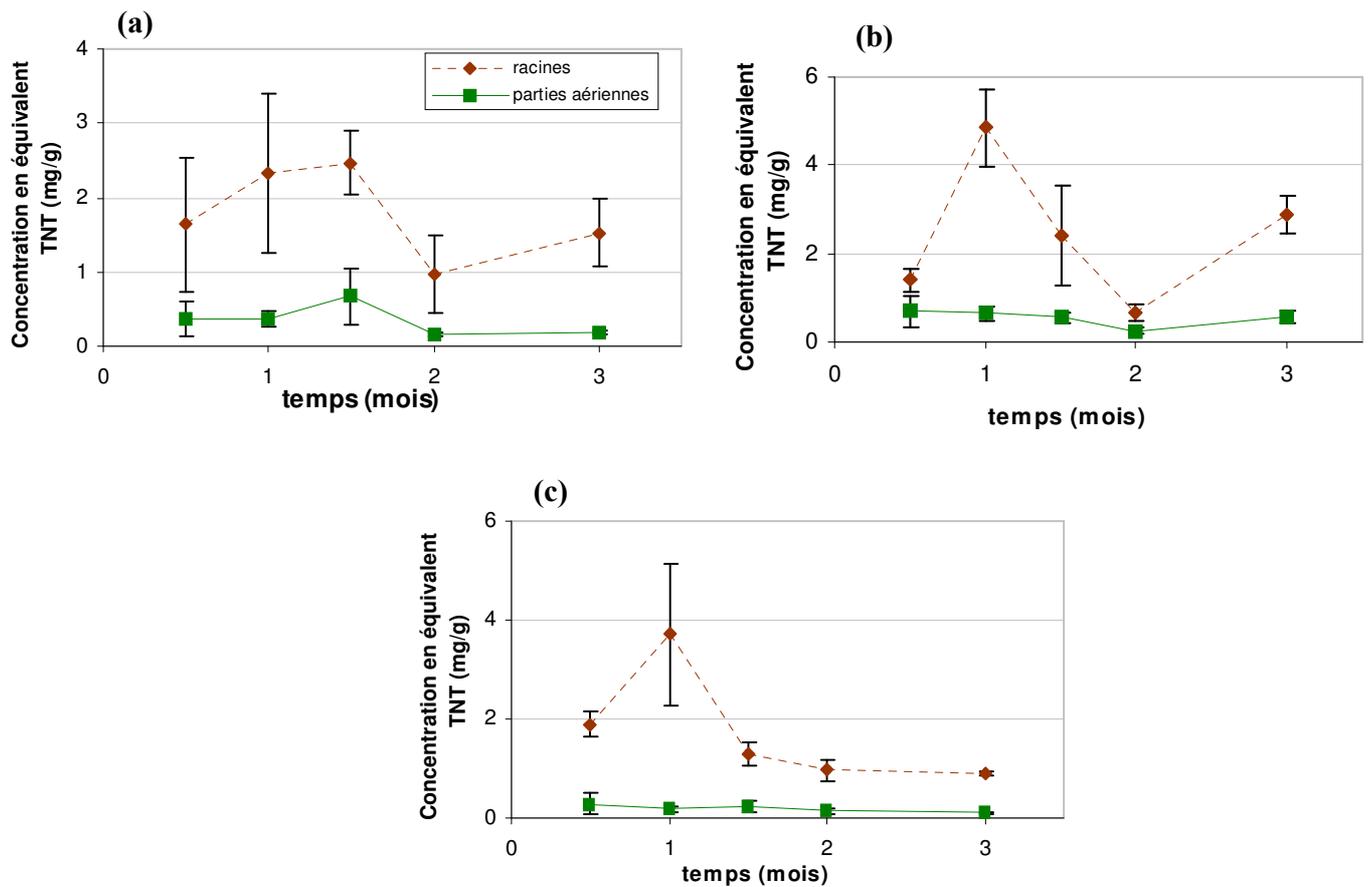


Figure III.3. Absorption du TNT et transfert des résidus vers les parties aériennes en fonction du temps de culture sur un sol contaminé à 300 mg/kg. Concentrations équivalent TNT (mg/g), (a) chez la massette, (b) chez le scirpe lacustre et (c) chez l'iris d'eau.

Les concentrations en équivalent TNT ne semblent pas dépendantes du temps de culture. Toutefois, pour les mêmes raisons que celles présentées pour l'expérimentation avec le RDX, les plantes ont peu poussé au cours de cette expérimentation. La petite taille des plantes mais aussi leur moindre capacité à absorber le TNT seraient alors responsables de la faible accumulation de TNT.

III.2.4 Discussion

Ces expérimentations ont permis de confirmer les résultats obtenus précédemment sur les plantes agronomiques concernant le transfert du RDX et du TNT. En effet, les plantes lacustres

accumulent, elles aussi, de grandes quantités de RDX dans les parties aériennes alors que le TNT est peu absorbé au niveau des racines et est très peu transféré vers les parties aériennes.

Toutefois, le but de ces expérimentations était de déterminer la cinétique d'absorption de ces deux explosifs par les plantes lacustres. Or, il semble que leur vitesse d'absorption reste quasiment constante, en dehors de points aberrants montrant une grande variabilité vraisemblablement liée aux conditions de culture. La période de culture n'influencerait pas la vitesse d'absorption du composé. La quantité d'explosifs accumulés dans les plantes est, par conséquent, fortement lié à la croissance de la plante.

Dans le cadre de la mise en place d'un processus de phyto-dépollution, les plantes lacustres peuvent être utilisées si le site est approprié à leur culture. Pour optimiser les quantités d'explosifs absorbées en fonction de la masse produite, il faudrait privilégier des cultures longues qui seraient stoppées lorsque la vitesse de croissance des plantes commence à diminuer. La croissance maximale des plantes lacustres testées est atteinte après cinq mois de culture, la production de biomasse variant alors de 18,4 à 30 tonnes par hectare (données ALISMA). Dans ces conditions de culture, il serait alors possible d'accumuler jusqu'à 230 kg d'équivalent RDX et 10 kg d'équivalent TNT dans les parties aériennes de scirpe lacustre. Ces calculs sont basés sur les expérimentations avec une contamination à 1000 mg/kg de RDX et 300 mg/kg de TNT. Les rendements pour le TNT ne semblent pas suffisants pour envisager la phyto-extraction comme seule méthode de dépollution. Les rendements pour le RDX sont trois fois plus faibles que dans l'expérimentation précédente confirmant les limites dues à une transplantation tardif des plantes sur le sol contaminé.

III.3 Cinétique d'absorption du RDX chez la canne de Provence

La canne de Provence (*Arundo donax*) est une plante adaptée aux sites humides et qui en outre supporte des changements climatiques importants, des périodes de sécheresse et un froid modéré. Elle a une croissance très rapide mais les graines sont stériles et sa multiplication ne se fait que par boutures de segments de rhizomes ou par rejets. Cette plante n'avait pas été testée précédemment du fait des difficultés pour obtenir des plantules de taille réduite. Toutefois, son fort développement nous a paru intéressant à exploiter dans un objectif d'extraction de grandes quantités de RDX. Ainsi, nous avons testé la capacité de la canne de Provence à pousser sur un

sol contaminé à 1000 mg/kg et à accumuler le RDX. L'expérimentation mise en place avait aussi pour but d'étudier la distribution du RDX à l'intérieur des parties aériennes et son évolution au cours du temps.

III.3.1 Protocole expérimental

La taille des boutures dont nous disposions ne nous ont pas permis de mettre en place des études de transfert dans les mêmes conditions que celles utilisées précédemment avec des répétitions. Une bouture a été plantée dans du terreau très humide et après deux mois, des repousses sont sorties de terre. La bouture portant 4 repousses d'environ 10 cm, a été transplantée dans un sol contaminé (1000 mg/kg) avec du RDX radiomarqué. Les plantes ont été récoltées au bout de 7, 8, 9 et 10 semaines. Après récolte, la croissance des plantes a été mesurée, les feuilles ont été broyées séparément puis la répartition de la radioactivité a été analysée après combustion.

III.3.2 Résultats et discussion

La mesure de la radioactivité dans les feuilles a permis de déterminer les quantités d'équivalent RDX dans chaque feuille. Les feuilles les plus vieilles à savoir les plus basses, c'est à dire portant les plus petits numéros, sont celles qui ont concentré le plus le RDX (Figure III.4). Avec des concentrations plus faibles, les feuilles médianes (n°4, 5, 6, 7 et 8) ont accumulé plus de RDX que les feuilles les plus âgées car elles ont un développement plus important. En fonction du temps de culture, la répartition de la radioactivité dans la plante n'est pas modifiée. Il semble que la concentration dans les feuilles dépende de l'âge et pas de la taille ou de la variation du stade de croissance. Après absorption, le RDX est distribué à l'intérieur de la plante par l'intermédiaire du flux de transpiration. Il s'accumule ainsi à l'extrémité des feuilles selon un gradient basipétale. Plus les feuilles sont âgées, plus elles accumulent du RDX. Les quantités retrouvées dans chaque feuille dépendent ensuite de leur surface foliaire qui détermine le flux hydrique dans la plante.

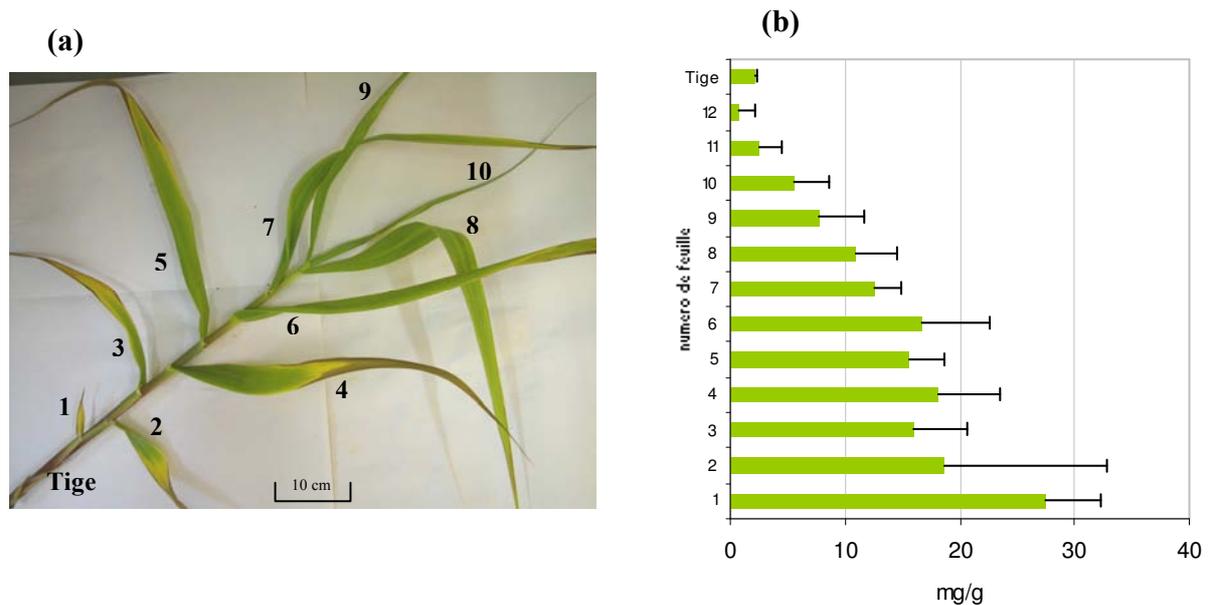


Figure III.4. Analyse des cannes de Provence en séparant chaque feuille. (a) Photographie montrant la numérotation des feuilles d'une repousse de canne de Provence cultivée durant 8 semaines sur un sol contaminé au RDX. (b) Concentration en RDX (mg/g de poids sec) dans chaque feuille (moyenne sur les 4 temps de culture).

La canne de Provence a accumulé des quantités de RDX plus faibles que les plantes agronomiques ou que certaines plantes lacustres. La valeur maximale est de 7,12 mg/g de poids sec après 10 semaines de culture sur un sol contaminé par du RDX. Le facteur de bioconcentration est alors de 7,12. Les différences de concentrations pour chaque repousse en fonction du temps de culture pourraient s'expliquer par une différence de taille car au niveau de la totalité des parties aériennes, les concentrations ne variaient qu'entre 5,1 et 7,1 mg/g. Lors de cette étude, il n'a pas été possible d'observer de saturation des mécanismes d'absorption. Les variations dans les concentrations absorbées semble liées aux variations de la taille de chaque repousse. Sur la période étudiée, il n'est pas possible de dégager de tendance sur l'évolution de l'absorption du RDX.

Cependant, des zones nécrosées ont été observées à l'extrémité de certaines feuilles de canne de Provence cultivée sur un sol contaminé par du RDX (Figure III.4.a). Les feuilles 3, 4, 5 et 6 ont été les plus atteintes quel que soit le temps de culture. La canne de Provence est relativement

sensible au RDX puisque les autres plantes lacustres n'ont pas développé de signes de phytotoxicité alors que les concentrations en RDX accumulées étaient plus élevées.

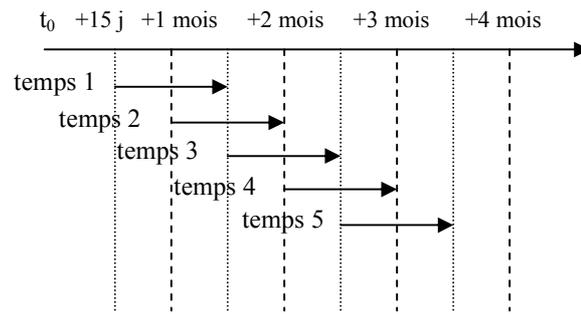
Cette étude a permis d'élucider en partie les mécanismes de distribution du RDX dans la plante. Toutefois, la croissance de cette plante est limitée, le rendement sur une année est d'environ 10 tonnes de matière sèche par hectare (données INRA). La quantité de RDX accumulée serait alors de 71 kg par hectare. Il ne semble pas judicieux d'utiliser la canne de Provence dans un objectif de dépollution de sites contaminés par du RDX. En effet, les autres plantes lacustres testées accumulent de plus grandes quantités de RDX et sont plus tolérantes.

III.4 Optimisation de l'absorption du RDX par le riz en fonction du stade de croissance

Au vu des résultats précédents, le riz est une plante aquatique à croissance rapide qui présente de grandes capacités d'accumulation du RDX dans les parties aériennes au regard des autres plantes lacustres. Des symptômes de phytotoxicité ont été observés chez les plants de riz accumulant le RDX. L'absorption du RDX étant fortement liée au flux de transpiration et les chloroses se transformant en nécroses doivent modifier alors ces flux de transpiration. Elles peuvent ainsi affecter profondément la capacité du riz à accumuler le RDX. Toutefois, il peut être possible de diminuer l'impact de ces nécroses et d'optimiser l'accumulation en transplantant des plantules de riz à un stade plus favorable et en réalisant des cultures sur des temps plus courts. La transplantation permettrait aussi de limiter les pertes au moment de la germination en réalisant cette dernière en nursery.

III.4.1 Protocole expérimental

Les semences de riz ont été plantées dans du terreau acide (pH 4). A partir de 15 jours et tous les 15 jours, cinq plantes par pot, avec trois répétitions par temps, ont été transférées dans un sol reconstitué contaminé à 1000 mg/kg de RDX radiomarqué. Les sols ont été préparés en mélangeant 100 g de terreau acide, 125 g de sable moyen et 25 g de sable fin contaminé à 1% de RDX radiomarqué. Ces plantes ont été récoltées au bout d'un mois de culture sur le sol ainsi contaminé, en suivant le protocole suivant :



Après récolte, les plantes aux différents stades ont été lyophilisées, broyées et la radioactivité a été analysée par combustion à l'aide d'un oxidizer pour déterminer la quantité de RDX accumulée pendant 1 mois de culture.



III.4.2 Résultats et discussion

Lors de leur récolte, les plantes du premier stade présentaient des chloroses généralisées qui étaient plus prononcées aux extrémités. Aux stades suivants, des chloroses et des nécroses ont été observées mais restaient localisées uniquement aux extrémités.

En dehors des considérations sur les quantités de RDX accumulées dans les plantes, il semble que les plantes soient plus sensibles au transfert 15 jours après plantation (Figure III.5). Ces plantules ont été plus affectées par le repiquage et leur réadaptation n'a pas été possible en 1 mois pour retrouver un niveau de croissance normal. Les plantes qui n'avaient été mises en nursery que durant 15 jours et récoltées après un mois de culture ne mesurent alors que quelques centimètres. Le repiquage après seulement 15 jours ne semble donc pas envisageable pour un processus efficace de phyto-dépollution.

Figure III.5. Photographies du riz au temps 1 (gauche) et au temps 5 (droite).

L'analyse des différentes parties des plantes a permis de mettre en évidence des variations de concentrations de RDX en fonction du stade auquel la plante est repiquée dans le sol contaminé (Figure III.6). Comme dans les expérimentations précédentes, le RDX est absorbé en quantité plus importante que le TNT et la majeure partie du RDX absorbé est transférée vers les parties aériennes. Toutefois, les quantités et les concentrations obtenues dans les plantes sont plus faibles que celles mesurées lors des expérimentations conduites sur riz aux mêmes concentrations mais sur 40 jours de culture. Au temps 1, les concentrations sont évaluées à près de 14,2 mg/g alors que les concentrations aux autres temps sont plus faibles, environ 5 mg/g. Toutefois, au temps 1, les plantes sont très petites et les quantités accumulées sont donc très faibles : 1,2 mg pour 5 pieds. Aux autres temps, les plantes ont une concentration en RDX sensiblement constante mais les tailles des plantes vont croissant. Les temps les plus tardifs ont donc permis d'accumuler de plus grandes quantités de RDX dans les parties aériennes.

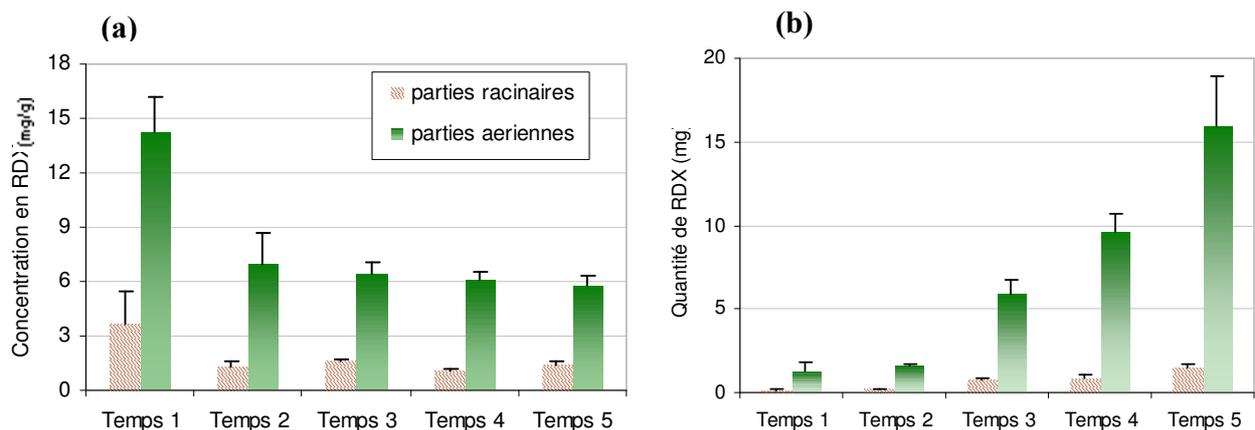


Figure III.6. Absorption et transfert du RDX chez le riz en fonction du stade du repiquage dans le sol contaminé. Exprimé (a) en concentration de RDX (mg/g) et (b) en quantité de RDX pour 5 pieds (mg).

Ces résultats confirment les observations précédentes faites sur le type de transfert du RDX. Il est dépendant du flux de transpiration qui est, lui-même, proportionnel à la surface foliaire. Plus les plantes sont grandes, plus elles absorbent de grandes quantités d'eau du sol et donc de RDX dissous dans la phase aqueuse. Pour optimiser l'accumulation du RDX dans un processus de

phyto-dépollution, il faut donc privilégier la prégermination en nursery et la préculture sur un sol non contaminé sur une période d'environ 2 mois avant implantation sur le site à dépolluer.

III.5 Discussion

Les plantes lacustres sont adaptées aux sites lagunaires de décantation présents à proximité des usines chimiques. Par l'étude conduite sur certaines de ces plantes, nous avons pu évaluer leur capacité à accumuler le RDX. Dans nos conditions d'expérimentation, les plantes qui présentent les meilleures capacités à accumuler des quantités significatives de RDX sont moins performantes que les plantes agronomiques. Aucun symptôme de phytotoxicité n'a été observé chez ces plantes lacustres, certainement à cause des faibles concentrations de RDX retrouvées dans leurs parties aériennes. Ces concentrations sont même plus faibles que celles mesurées chez le maïs qui ne présente pas de symptôme de phytotoxicité. Toutefois, pour un rendement d'extraction similaire, ces plantes produisent deux fois plus de biomasse, compensant la faible concentration. Le traitement de cette importante biomasse peut représenter un frein dans l'utilisation des plantes lacustres.

Les études sur le transfert du RDX à différents temps de culture ont montré qu'il fallait privilégier des temps de culture longs. Tant que la plante croît, elle continue à absorber des quantités importantes de RDX mais une fois que sa taille finale atteinte, l'absorption est plus faible. Il faut donc favoriser les rotations culturales plus courtes pour obtenir une concentration importante de RDX pour une faible quantité de matière à détruire. De plus, le repiquage de plantules cultivées hors site permettrait de limiter ces temps de culture sur le site à la période végétative la plus favorable à l'accumulation.

Comme chez les plantes agronomiques, les plantes lacustres envisagées n'ont pas accumulé de grandes quantités de TNT. Les quantités absorbées sont beaucoup plus faibles que celles mesurées pour le RDX et la majeure partie de la quantité absorbée est stockée dans les racines. L'efficacité d'absorption lors d'un processus de phyto-dépollution sera beaucoup plus faible pour le TNT que pour le RDX. Le faible transfert du TNT vers les parties aériennes peut être dû à la dégradation du TNT dès son absorption par la plante. Même s'il ne semble pas possible d'envisager une phyto-extraction du TNT, l'implantation de végétaux peut agir indirectement sur la contamination en limitant l'érosion du site en cas d'assèchement des lagunes mais aussi en

favorisant la croissance microbienne dans le sol grâce aux exsudats (Anderson *et al.*, 1994 ; Newman et Reynolds, 2005). Le TNT étant biodégradé par certains micro-organismes, les plantes permettraient donc indirectement de dégrader le TNT présent dans la rhizosphère.

Le RDX et le TNT ont été testés séparément, il faudrait maintenant tester les deux simultanément pour vérifier si les taux d'absorption et de transfert ne sont pas modifiés. En effet, les deux explosifs sont souvent présents de façon conjointe sur les sites pollués. Il semble peu vraisemblable qu'un effet soit observé car les composés organiques neutres sont absorbés dans la plante et transportés par des mécanismes passifs (Bromilow et Chamberlain, 1995). Ainsi, s'il n'y a pas de phénomènes toxiques nuisant à la croissance de la plante, l'absorption d'un premier explosif ne devrait pas avoir d'effet sur l'absorption du second.

Toutes ces expérimentations permettent de choisir des plantes qui seront ensuite testées avec des sols contaminés depuis longtemps et possédant d'autres contaminations qui peuvent avoir un effet sur l'absorption des explosifs. En effet, les sites possèdent de multiples contaminations depuis plusieurs dizaines d'années. Ces études devraient permettre de tester les capacités des plantes dans des conditions se rapprochant des cas réels pour lesquels les opérations de dépollution se posent.

CHAPITRE IV

METABOLISME DES EXPLOSIFS PAR DES CULTURES CELLULAIRES

De nombreuses études ont démontré que le TNT est rapidement métabolisé après son absorption par les plantes (Bhadra *et al.*, 1999a ; Bhadra *et al.*, 1999b ; Gorge *et al.*, 1994 ; Hughes *et al.*, 1997 ; Larson, 1997 ; Nepovim *et al.*, 2005 ; Thompson *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 2003 ; Wayment *et al.*, 1999) alors que le RDX est principalement retrouvé sous forme parentale (Bhadra *et al.*, 2001 ; Harvey *et al.*, 1991 ; Larson, 1997 ; Subramanian et Shanks, 2003 ; Thompson *et al.*, 1999). Toutefois, des métabolites du RDX ont été observés mais dans de rares études et uniquement sur culture tissulaire (Just et Schnoor, 2004). Aucune autre étude n'a depuis confirmé cette voie métabolique sur plantes entières ou sur d'autres cultures cellulaires. En revanche, l'analyse de plantes cultivées en milieu hydroponique contaminé avec du TNT a montré que ce composé était rapidement réduit (Bhadra *et al.*, 1999b). Après cinq jours, il ne restait plus de TNT mais seulement des sucres en C6 conjugués à l'aminodinitrotoluène (ADNT) ont été identifiés parmi les métabolites.

Dans les études d'absorption et de transfert, nous avons aussi étudié la métabolisation des explosifs. Le RDX est très peu métabolisé mais la présence de résidus inextractibles permet de suspecter la présence d'une bioactivation métabolique. Le TNT est totalement transformé après absorption par les plantes. Nous avons observé la formation de nombreux métabolites mais les faibles quantités obtenues dans les plantes entières ne permettent pas leur identification au plan structural. Or, l'étude du métabolisme est essentielle pour connaître le devenir des composés dans la plante, certains pouvant être toxiques. En effet, la plante peut métaboliser les composés pour les rendre inactifs dans la majorité des cas ou les séquestrer, ce qui permet de limiter l'interaction avec le fonctionnement cellulaire général. Il est ainsi essentiel de connaître le devenir d'un composé dans la plante pour prévoir le traitement ultérieur des cultures. En effet, si le composé est détoxiqué dès son absorption par la plante, il ne sera pas nécessaire de traiter les plantes après accumulation du polluant puisqu'il n'y aura plus de risque de dispersion d'un composé toxique. L'étude du métabolisme peut aussi permettre de réaliser le suivi du polluant dans la plante s'il est métabolisé en un ou plusieurs métabolites stables dès son absorption. En effet, pour effectuer un suivi de la dépollution, il ne sera pas utile de doser le polluant parent dans les plantes s'il est totalement dégradé mais il faudra alors doser les métabolites.

L'étude du métabolisme est facilitée par l'expérimentation sur cultures cellulaires. L'utilisation de cellules permet en effet d'obtenir de grandes quantités de métabolites, ce qui facilite l'analyse structurale ultérieure. Toutefois, les cultures végétales en suspension n'ont pas ou peu de parois

végétales. Or, dans les études précédentes, le métabolisme du TNT et du RDX a abouti à une formation élevée de résidus inextractibles, plus de 50% de la radioactivité absorbée par les plantes. Lors du métabolisme dans les végétaux, les xénobiotiques peuvent d'abord être transformés en composés réactifs, puis conjugués à des sucres et enfin stockés (Sandermann, 1992). Ce stockage peut se faire soit sous forme soluble dans les organites dédiés à cette fonction (vacuoles) soit sous forme liée aux constituants de la paroi. L'absence de parois cellulaires - ou la faible proportion qu'elles représentent - peut ainsi modifier le profil métabolique d'un composé en limitant fortement la formation de résidus liés. Ceci peut permettre l'accumulation de métabolites à l'intérieur des cellules ou dans le milieu de culture après excrétion.

L'étude du métabolisme du TNT et du RDX a donc été effectuée sur des cultures cellulaires en suspension de tabac pour les deux explosifs et de riz pour le RDX uniquement.

IV.1 Métabolisme du TNT chez les cellules de tabac

IV.1.1 Identification des métabolites principaux

Publication 4 : *Metabolism of [¹⁴C]-2,4,6-trinitrotoluene in tobacco cell suspension cultures.*
(Environmental Science and Technology, 2005)

Pour différents aspects techniques, le métabolisme du TNT n'a pas été totalement élucidé dans les précédentes études (Bhadra *et al.*, 1999b ; Hughes *et al.*, 1997 ; Larson, 1997 ; Nepovim *et al.*, 2005 ; Wayment *et al.*, 1999). En effet, les métabolites étaient purifiés par une extraction en condition acide, ce qui a pour effet dégrader la liaison entre la partie aglycone et les sucres mais aussi les composés instables. Ainsi, l'ADNT identifié était l'unique métabolite. Afin d'étudier plus précisément le métabolisme dit de phase I et II du TNT, nous avons contaminé des cultures de tabac en suspension avec du TNT radiomarqué. La contamination avec le TNT a duré 120 h. En parallèle, une étude cinétique a été conduite. L'identification des métabolites a été réalisée par hydrolyse enzymatique ou chimique en milieu acide, par des analyses en spectrométrie de masse et en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et du carbone 13. Après 12 h d'incubation dans le milieu, le 2- et le 4-ADNT sont détectés dans le milieu et après 24 h d'incubation, le TNT a totalement disparu du milieu et des cellules. Les quatre principaux

métabolites accumulés durant 120 h ont été analysés. La différence d'unité de masse de 16 avec un ADNT conjugué a permis de déterminer qu'il s'agissait d'hydroxylamino-dinitrotoluène (HADNT) conjugué à un ou deux dérivés glycopyranoses. Toutefois, des métabolites très polaires présents en trop faible quantité n'ont pas pu être purifiés et identifiés. La position de la conjugaison et l'identification de l'isomère ainsi que du sucre ont été réalisées par RMN. Après pénétration dans les cellules, le TNT est rapidement réduit en 2- et 4-HADNT qui sont conjugués à des sucres (Figure IV.1). Il n'y a pas de TNT et d'HADNT dans les cellules après 3h de culture. L'ADNT retrouvé dans le milieu de culture cellulaire peut provenir soit d'HADNT excrété hors des cellules et réduit en ADNT en milieu acide, soit de TNT biotransformé dans le milieu par des enzymes végétales excrétées dans le milieu. L'ADNT peut aussi être formé dans les cellules puis excrété lorsqu'il n'est pas pris en charge par les enzymes de conjugaison.

Cette publication est la première qui identifie des dérivés hydroxylamines conjugués à des sucres, la fonction hydroxyle étant seule engagée dans la conjugaison et non la fonction amine. Toutefois, la présence d'autres métabolites non identifiés suggère que d'autres voies métaboliques soient impliquées dans le devenir du TNT. De plus, la quantité de ces métabolites augmente au cours du temps, tendant à montrer ainsi que les dérivés HADNT obtenus ne seraient que des intermédiaires. Le devenir de ces dérivés de type hydroxylamines est important à caractériser car ils sont capables en condition aérobie, de former des dimères possédant un groupement azoxy, ceux-ci étant stables et toxiques (Honeycutt *et al.*, 1996). La connaissance du devenir des métabolites primaires que sont les HADNT et les ADNT est essentielle dans l'élucidation des mécanismes de détoxification employés par la plante.

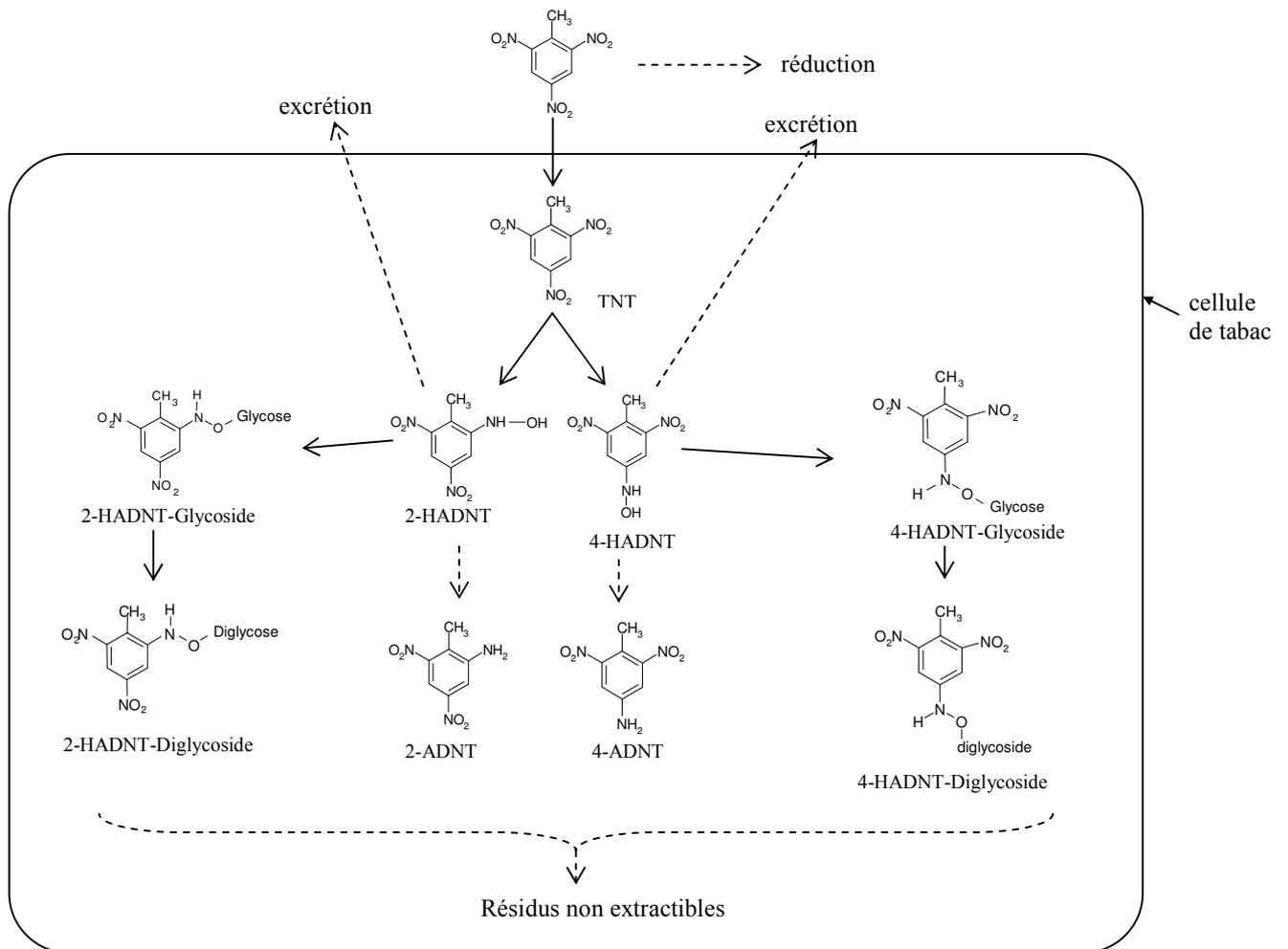


Figure IV.1. Proposition de voies métaboliques de transformation du TNT dans les cultures cellulaires de tabac. (les hypothèses sont représentées en traits pointillés)

IV.1.2 Inactivation des métabolites primaires du TNT dans les cellules de tabac

Les métabolites du TNT observés lors de la pénétration dans les cellules de tabac peuvent être aussi toxiques que le TNT. Les premières transformations réalisées par les plantes ne sont donc pas suffisantes pour détoxifier les sols contaminés par le TNT. Les composés hydroxylamines peuvent former majoritairement des dérivés conjugués et peu de dimères avec un groupement azoxy, la plante diminuera alors la toxicité des produits en les séquestrant dans des compartiments cellulaires. Pour connaître les voies métaboliques des principaux métabolites primaires du TNT, nous avons étudié le devenir de ces métabolites dans les cellules de tabac.

Les métabolites analysés sont le 2-HADNT, le 4-HADNT, le 2-ADNT et le 4-ADNT. L'incubation a duré seulement 12 h pour permettre d'identifier les métabolites intermédiaires. En effet, après 24 h, la majorité des métabolites sont des composés très polaires, présents en trop faible quantité pour permettre leur identification. Ces deux caractéristiques font qu'ils sont difficiles à purifier. Il peut s'agir de composés conjugués de façon simple ou multiple à des sucres variés. Les métabolites ont été incubés séparément dans les cellules de tabac. La contamination des milieux a été réalisée uniquement avec des métabolites non radiomarqués. La détection des métabolites a été réalisée en UV à 230 nm. Les conditions de culture et les méthodes d'extraction sont les mêmes que celles employées dans la publication 4 (*Metabolism of [¹⁴C]-2,4,6-trinitrotoluene in tobacco cell suspension cultures*). Les métabolites ont ensuite été collectés puis analysés en spectrométrie de masse et en spectrométrie RMN pour ceux qui ont été obtenus en quantité suffisante.

Les profils métaboliques obtenus lors de cette expérimentation sont représentés sur la figure IV.2. Les résultats de l'analyse en spectrométrie de masse et en RMN des pics sont indiqués sur les chromatogrammes. La différence d'unité de masse de 16 entre un conjugué à l'ADNT et un conjugué à l'HADNT, due à la présence d'un groupement hydroxyle, a permis de différencier nettement ces deux types de métabolites.

L'incubation de cellules avec le 4-HADNT a conduit principalement à la formation de conjugués de 4-HADNT et de 4-ADNT. Dans ce cas, une étape de réduction de l'HADNT a précédé la formation du conjugué. L'ajout de 2-ADNT et de 4-ADNT dans les milieux de culture a permis l'obtention d'ADNT conjugués à des sucres mais pas d'HADNT conjugués. La réaction de réduction ne semble pas réversible dans les cultures cellulaires de tabac. En effet, aucun HADNT n'a été détecté en quantité suffisante pour être purifié. Pourtant, des réactions de *N*-hydroxylation ont été observées chez les végétaux et chez les animaux (Celenza, 2001 ; Katagi et Mikami, 2000 ; Zalko *et al.*, 1998).

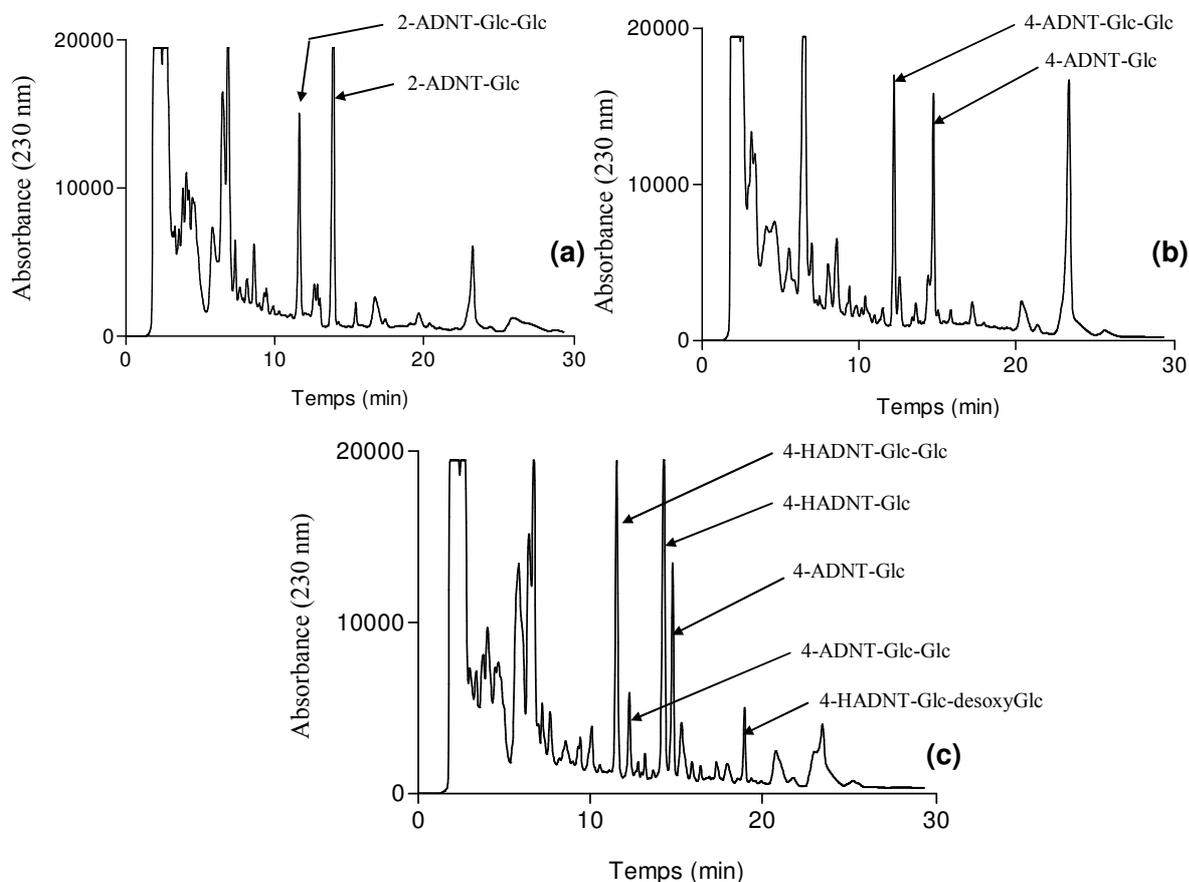


Figure IV.2. CLHP chromatogrammes obtenus après incubation des cellules durant 12 h avec du (a) 2-ADNT, du (b) 4-ADNT et du (c) 4-HADNT. Glc : glycoside

Les conjugaisons sont des réactions réversibles, c'est la raison pour laquelle les HADNT conjugués présents dans le milieu cellulaire pourraient être déconjugués et subir une nouvelle réduction pour former des ADNT qui seront à leur tour conjugués ou réduits pour former des diaminonitrotoluènes. Aucun composé portant un groupement azoxy n'a été identifié. Dans les cellules, les HADNT semblent pris en charge pour être conjugués ou réduits sans pouvoir être dimérisés. Les conditions dans les cellules ne sont peut être pas favorables à cette dimérisation.

Ces deux études à partir du TNT et de ses métabolites primaires, l'HADNT et l'ADNT, suggèrent que la vitesse de glycosylation soit plus rapide que les réactions de réduction. En effet, après pénétration dans les cellules, les HADNT conjugués sont les métabolites majoritaires.

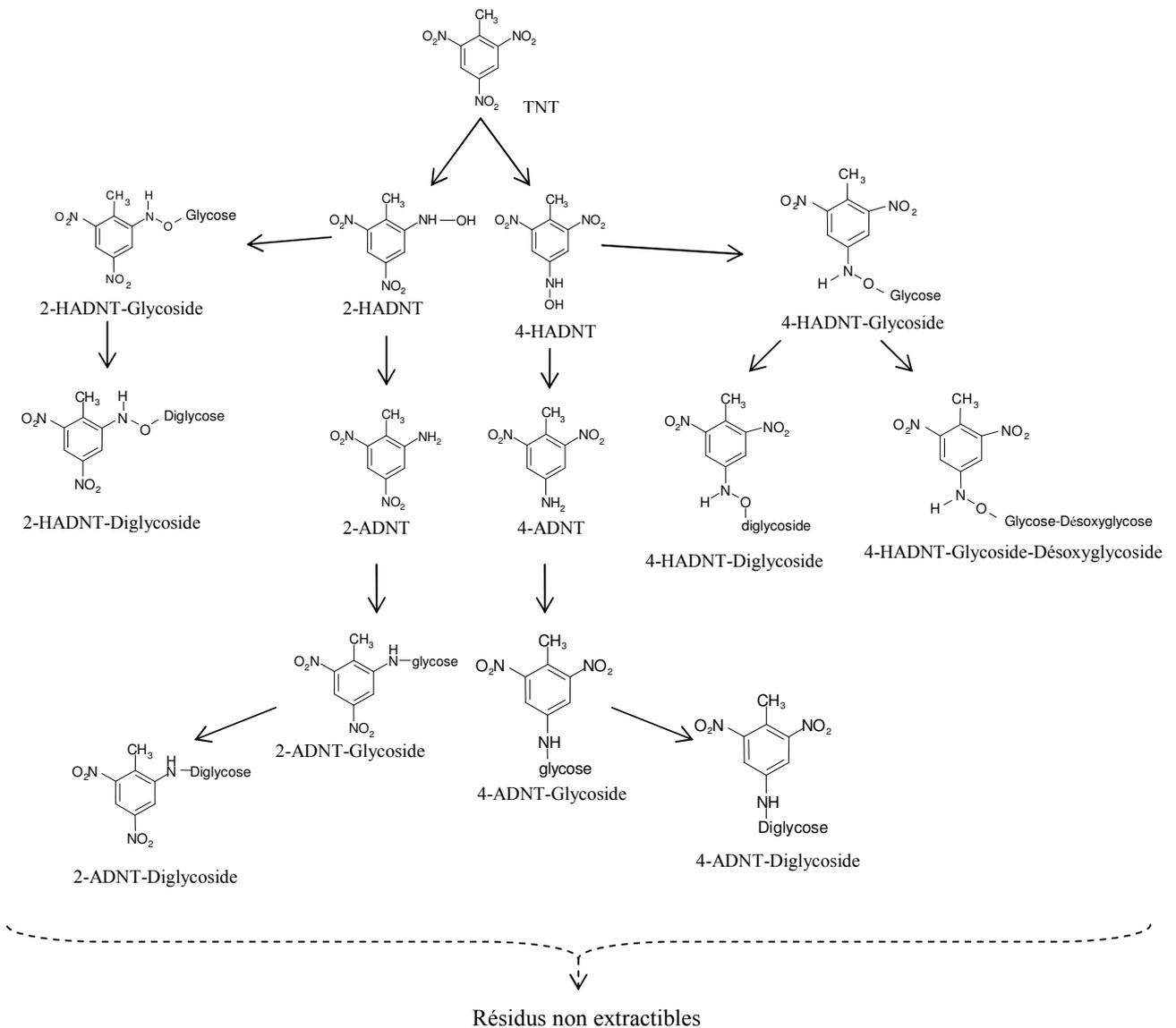


Figure IV.3. Voies métaboliques de transformation du TNT dans les cultures cellulaires de tabac.

IV.2 Métabolisme du RDX chez les cellules de tabac

Chez le végétal, le métabolisme du RDX a été étudié sur des cultures cellulaires ou tissulaires (Bhadra *et al.*, 2001 ; Larson *et al.*, 1999 ; Thorne, 1999). Ce métabolisme est très limité qualitativement (Harvey *et al.*, 1991). Par contre, la biodégradation du RDX par les micro-organismes permet d'aboutir à la minéralisation complète du RDX (Adrian et Sutherland, 1998 ; Lee et Brodman, 2004 ; Snellinx *et al.*, 2002). Les conditions nécessaires étant complexes à

mettre en œuvre, les principaux métabolites identifiés lors d'études en condition anaérobie avec des micro-organismes sont le mononitroso (MNX), le dinitroso (DNX) et le trinitroso (TNX). Lors des précédentes expérimentations sur plantes entières (cf chapitre II), une grande quantité de résidus non extractibles a été obtenue quel que soit le type de plantes étudiées. Pourtant, seul le RDX et un faible pourcentage de métabolites ont été observés dans ces études. Or, d'après le concept du "green liver" (Sandermann, 1994), la séquestration d'un composé non réactif sous forme de résidus liés nécessite l'activation de la molécule. L'obtention de résidus liés dans le cas du RDX est étonnante car très peu de métabolites ont été obtenus dans les extraits sur plantes entières. Les résidus liés peuvent donc être dus i) soit à un piégeage direct du RDX dans la paroi sans métabolisation préalable, ii) soit à une vitesse de réaction différente entre les étapes enzymatiques et la polymérisation avec les composés pariétaux. Dans la dernière hypothèse, la vitesse de formation des métabolites du RDX serait beaucoup plus faible que la vitesse de formation des résidus liés. A peine formés, les métabolites seraient transformés en résidus liés et ils ne pourraient pas être détectés dans les extraits cellulaires. Le travail sur culture cellulaire peut permettre d'explorer ces hypothèses. En effet, les cultures cellulaires développent une paroi cellulaire peu importante. La séquestration des métabolites sous forme de résidus liés peut alors être limitée et il deviendrait possible d'observer ces métabolites.

Les suspensions cellulaires de tabac ont été incubées durant 24 h et 120 h dans un milieu contaminé par du RDX radiomarqué. Après arrêt de l'expérience, les cellules ont été traitées séparément des milieux de culture. Ces derniers ont été analysés directement en radio-CLHP alors que les cellules ont d'abord été broyées puis soumises à une extraction (eau/acétonitrile, 50/50). Les extraits obtenus ont ensuite été analysés en radio-CLHP.

Le RDX retrouvé dans le milieu de culture montre qu'il a été peu dégradé. Après 24 h et 120 h, le RDX absorbé par les cellules a été très peu transformé. Au bout de 24 h, 91% de la radioactivité absorbée était sous forme de RDX et après 120 h, le RDX représentait encore 81%. Deux pics, plus polaires que le RDX, ont été obtenus (Figure IV.4). Leurs temps de rétention étaient de 3 et 7 minutes. Le pic à 3 min n'a pas pu être purifié pour permettre son analyse. D'autres conditions et d'autres colonnes ont été testées mais elles n'ont pas permis de retenir ce pic et d'augmenter son temps de rétention. Le métabolite à 7 min ne représentait que 2,5% de la

radioactivité absorbés dans les cellules. Les quantités recueillies n'étaient pas suffisantes pour permettre son analyse en spectrométrie de masse ou en RMN.

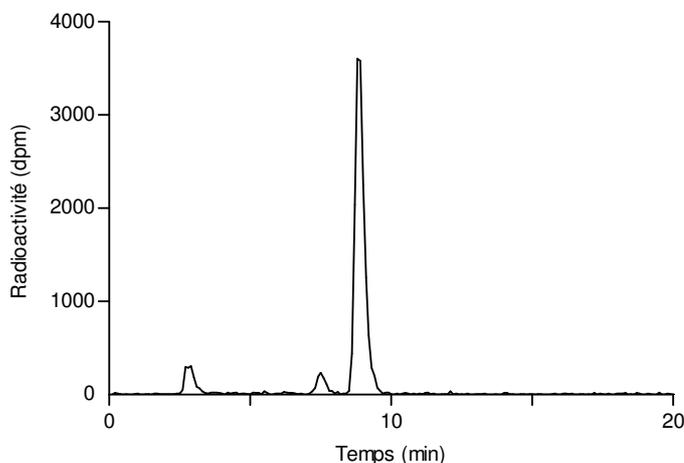


Figure IV.4. CLHP Radiochromatogramme d'extrait de cellules de tabac incubées durant 5 jours avec du RDX radiomarqué.

Seulement 20% du RDX est métabolisé mais seule l'identification de ces métabolites pourrait permettre d'élucider le mécanisme qui entre en jeu dans la séquestration pariétale du RDX. L'hypothèse d'un métabolisme très rapide est assez peu vraisemblable à cause de la faible quantité de métabolites observés. Dans le cas du TNT, l'expérimentation sur culture cellulaire végétale a permis d'identifier de nombreux métabolites transitoires non détectables lors d'expérimentations sur plantes entières. De ces résultats, l'hypothèse privilégiée serait donc celle d'un piégeage direct du RDX dans les parois cellulaires sans transformation ou conjugaison préalable (figure IV.5). L'incorporation directe d'un composé dans la matrice pariétale sans activation préalable lors des phases I ou II a déjà été observée pour des composés aromatiques ou aromatiques hétérocycliques possédant un groupement hydroxyle, carboxylique ou amine (Komoβα *et al.*, 1995). Le groupement nitré du RDX pourrait être transformé en formes réactives (NO^{\cdot} , NO_2^{\cdot}) par les peroxydases pariétales. Celles-ci pourraient alors être liées à la lignine. Par ailleurs, le RDX pourrait être encapsulé dans la paroi et resterait disponible en cas de dégradation des parois.

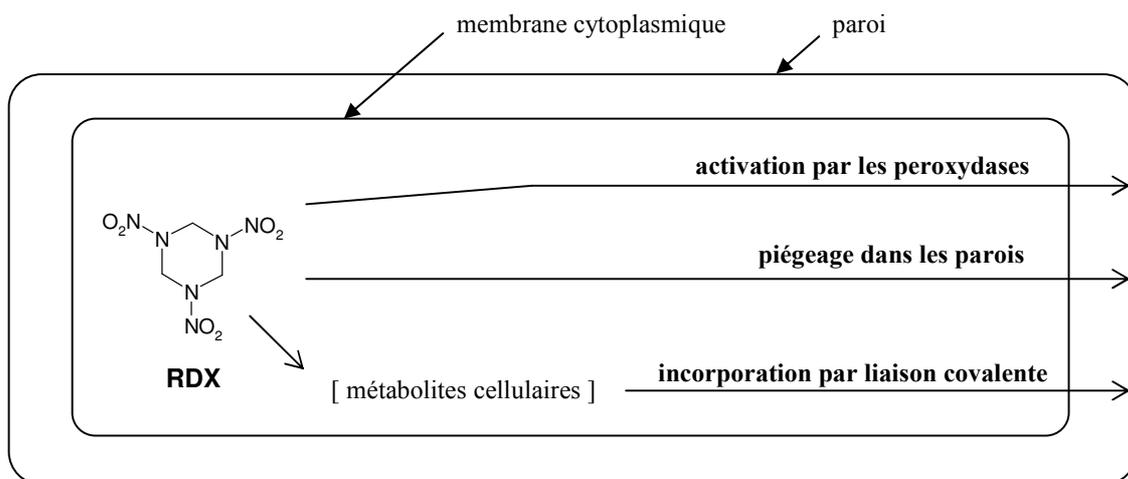


Figure IV.5. Hypothèses d'incorporation du RDX dans les parois cellulaires.

IV.3 Discussion

Comme nous avons observé dans les études sur les plantes agronomiques, confirmant ainsi les données bibliographiques, le TNT et le RDX n'ont pas le même devenir métabolique dans les cellules végétales. Le TNT est rapidement réduit dans les cellules alors que le RDX est très faiblement métabolisé. La formation rapide et en quantités importantes de résidus liés dans les plantes contaminées avec du TNT semble due à la vitesse de métabolisation du TNT qui forme rapidement des composés conjugués à des sucres qui seraient ensuite pris en charge pour être incorporés dans les parois cellulaires. Le TNT est rapidement métabolisé par des enzymes de type nitroréductase (Adamia *et al.*, 2006). Les métabolites formés tels que les HADNT et les ADNT peuvent être polymérisés aux constituants des parois cellulaires. Von der Trenck *et al.* (1981) ont montré que l'incorporation de la 4-chloroaniline se fait par une réaction d'addition nucléophile du NH_2 sur la lignine. Les ADNT possédant un groupement NH_2 , leur incorporation à la matrice pariétale peut se faire directement par le même type de réaction. Comme pour les ADNT, les HADNT ne sont pas retrouvés sous forme libre dans les cellules. Ils peuvent être conjugués ou incorporés dans les parois par leur groupement *N*-hydroxyle (Komořa *et al.*, 1995). Ils peuvent aussi être réduits en ADNT qui seront incorporés dans les parois cellulaires.

Etant aussi toxiques que le TNT, ces métabolites, les HADNT et les ADNT, représentent toujours un risque pour l'environnement. Le risque dû à la dimérisation des HADNT persiste même s'ils sont sous forme conjugués car cette liaison peut être hydrolysée. En effet, les dérivés

azoxy comme ceux formés lors de la dimérisation des HADNT sont considérés comme potentiellement cancérigènes (Kroes *et al.*, 2004). Ces composés nécessitent une étude toxicologique particulière pour déterminer les risques liés à leur entrée dans l'environnement. De plus, même s'ils sont non extractibles chimiquement, certains résidus liés peuvent être biodisponibles pour la faune (Mathew *et al.*, 1998).

Pour effectuer un suivi du TNT au cours d'un processus de phyto-dépollution, il ne faut donc pas uniquement doser le TNT mais aussi ses principaux métabolites. L'absorption du TNT par les plantes peut donc être quantifiée en extrayant les plantes en milieu acide. Les HADNT et ADNT conjugués seraient alors transformés en ADNT libre et le dosage du TNT et des ADNT permettrait de déterminer cette absorption. Une extraction en milieu très acide (HCl, 2N) pourrait aussi permettre d'extraire les résidus liés à la lignine par une liaison C-N-C. Cette quantification ne resterait toutefois qu'une estimation car la réduction d'un groupement nitré est la première étape de la transformation du TNT. La réduction des autres groupements nitrés ne serait alors pas détectée. Dans nos études sur cultures cellulaires de tabac, nous n'avons pas identifié de tels composés. Le dosage des ADNT après extraction en milieu acide serait alors plus représentatif de la quantité de TNT absorbé par la plante qu'un dosage du TNT uniquement. Cependant, une grande partie de métabolites, non identifiés, pourrait aussi entraîner une sous-estimation de la quantité de TNT absorbé par la plante.

De grandes quantités de RDX sont absorbées par les plantes et par les cellules végétales mais aucune voie métabolique n'a pu être mise en évidence même s'il semble que des métabolites soient formés. Présents en trop faible quantité, ils n'ont pas pu être purifiés et identifiés. Les quantités de résidus liés retrouvés dans les plantes agronomiques (jusqu'à 56% de la radioactivité dans les feuilles de maïs) suggèrent l'existence d'un métabolisme du RDX dans les plantes entières ou d'une incorporation directe par piégeage dans les parois sans activation de la molécule. Les nitroréductases mises en jeu pour la réduction des groupements nitrés du TNT ne semblent pas agir aussi efficacement sur les groupements nitrés du RDX. Cette différence est certainement due à la différence de cycle auquel sont liés les groupements nitrés. Dans le cas du TNT, il est lié à un cycle aromatique alors que pour le RDX, il est lié à un azote du noyau triazinique. En effet, sur des pesticides ayant des structures chimiques proches, la réduction des groupements nitrés n'est pas systématique et reste dépendante de la molécule et du type de liaison

(Katagi et Mikami, 2000). Toutefois, une récente étude de transgénèse réalisée en transformant *Arabidopsis thaliana* avec le gène bactérien *xplA* a permis d'obtenir une dégradation complète du RDX et une tolérance des plantes plus importante (Rylott *et al.*, 2006). Ce gène a été isolé chez *Rhodococcus rhodochrous* et semble coder pour une monooxygénase à cytochrome P450. Cette enzyme permet chez ces bactéries une dénitrification suivie d'une ouverture du cycle formant des nitrites, du formaldéhyde et du 2,4-diazabutanal. Le métabolisme du RDX chez ces plantes transformées n'a pas été étudié et ces métabolites n'ont ainsi pas pu être identifiés à ce jour. La transgénèse permet d'obtenir une dégradation du RDX. Toutefois, certains métabolites (tels que le formaldéhyde ou le 2,4-diazabutanal) sont toxiques bien qu'ils puissent être pris en charge par le métabolisme général de la plante. Des études complémentaires seraient alors nécessaires pour vérifier s'il n'y a pas d'accumulation dans la plante des métabolites toxiques. L'utilisation de plantes transgéniques semble prometteuse à condition que le RDX soit totalement dégradé et qu'il n'y ait pas d'accumulation de composés toxiques. De plus, l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés est toujours très controversée et de ce fait, elle semble difficilement compatible avec l'image de dépollution "verte" que véhicule la phyto-dépollution.

PUBLICATION 4 :

Metabolism of [^{14}C]-2,4,6-trinitrotoluene in tobacco cell suspension cultures

Vila M, Pascal-Lorber S, Rathahao E, Debrauwer L, Canlet C, and Laurent F

Environmental Science and Technology (2005) 39, 663-672

Metabolism of [¹⁴C]-2,4,6-Trinitrotoluene in Tobacco Cell Suspension Cultures

M. VILA, S. PASCAL-LORBER,
E. RATHAHAO, L. DEBRAUWER,
C. CANLET, AND F. LAURENT*

Institut National de la Recherche Agronomique,
UMR Xénobiotiques, 180 Chemin de Tournefeuille,
BP3, 31931 Toulouse, Cedex 9, France

The metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) was investigated in tobacco cell suspension cultures amended with [¹⁴C]-TNT. Five metabolites were purified and characterized. Temporal evolution of metabolites was monitored during a 120 h incubation period. Metabolites structure was identified by acid and enzymatic hydrolysis, followed by electrospray ionization mass spectrometry and ¹H and ¹³C NMR spectroscopy analyses. The majority of metabolites were conjugates formed by glycosylation on the hydroxylamine group of either 2-hydroxylamino-4,6-dinitrotoluene (2-HADNT) or 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluene (4-HADNT), which led to monoglycoside then to diglycoside. Various diglycosides were observed with gentiobioside or sophoroside formation. Bound residues represented a small fraction (<10% of initial ¹⁴C) irrespective of the interval after TNT amendment. Free ADNT was detected only in the medium. This study highlights the central role played by HADNT in the TNT metabolic pathway in tobacco cell suspension culture, and the key role of these compounds and of glycosyltransferases in TNT phytoremediation processes.

Introduction

2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) has been the nitroaromatic compound the most frequently used as an explosive in the last 100 years, especially during World War II. Many manufacturing and military sites represent serious environmental hazards because of the presence of TNT and its combustion and degradation products. Particularly, this contamination is of great concern owing to the potential toxicity and mutagenicity of TNT and its metabolites (1).

Remediation strategies used for these compounds were commonly based on energy-intensive chemical treatment such as incineration of contaminated soil. However, excavation and thermal processes were too expensive for low concentrations of TNT and caused environmental problems. To reduce the latter and the cost, alternative technologies have been studied including bioremediation (like composting or bioslurry) and phytoremediation. Composting and bioslurry are ex-situ strategies that destroy soil structure and are more expensive than phytoremediation, an in-situ method (2).

Previous studies have evidenced the ability of terrestrial, aquatic, and transgenic plants to uptake, transform, and

incorporate TNT into plant mass under hydroponic conditions or after addition of TNT in soils (3–10). Plants metabolize TNT but do not mineralize it. Consequently, it is of great interest to elucidate the transformation pathways including the characterization of final products to evaluate their potential toxicity during the phytoremediation process.

TNT transformation pathways lead to distinct reduced or oxidized products and bound residues. However, several metabolites have still not been fully identified, and unexplored mechanisms may be involved in TNT metabolism. 4-Amino-2,6-dinitrotoluene (4-ADNT) and 2-amino-4,6-dinitrotoluene (2-ADNT), resulting from a reduction step, generally account for a limited fraction (<15%) of the equivalent-TNT in plants and are usually found in plant or tissue cultures (5, 11, 12). On the basis of an analogy to bacterial studies (13), hydroxylaminodinitrotoluene (HADNT) was assumed to be the main intermediate in the reduction pathway but also in oxidative transformation pathways such as those that form azoxy compounds (14). Some conjugates of TNT metabolites have been found in *Myriophyllum aquaticum* and in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* (11, 12). These metabolites have not been formally identified but they were suspected to be ADNT-glycosides (12). The formation of conjugates is an important phase in plants that enables a reduction in the resulting phytotoxic products. Furthermore, these conjugates could be compartmentalized and stored at cell storage sites such as vacuoles and cell walls, in which conjugates are incorporated as bound or nonextractable residues (15).

Residues are of environmental concern because of their bioavailability and their toxicity (1). Thus for successful phytoremediation, it is essential to understand TNT metabolism and to identify the final products in plants. However, on a polluted spot, the products from TNT degradation by rhizospheric or endophyte microorganisms, which could be absorbed by plants, might be also monitored in plants (16). In this context, the objectives of this study were to exhaustively characterize the biotransformation products of [¹⁴C]-TNT in tobacco cell suspension cultures and to investigate their appearance over time. Cell cultures metabolize xenobiotic compounds qualitatively in similar ways to plants without the inherent difficulties of penetration and translocation of compounds through whole plants (17). Moreover, in aseptic plant cell culture, metabolism is not influenced by contaminating microorganisms. Cell cultures also enable higher amounts of metabolites to be obtained, thus enabling improved characterization of metabolite structures by mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) analyses and consequently a better understanding of metabolic pathways. Our study clearly identified new reduced and conjugated TNT metabolites.

Materials and Methods

Chemicals. [methyl-¹⁴C]-2,4,6-Trinitrotoluene (specific activity = 1,9 MBq/μmol; radiochemical purity >97% as determined by radio-HPLC analysis) was purchased from Moravek Biochemical (Brea, CA). Unlabeled 2,4,6-trinitrotoluene (98% pure) was obtained from SCP Science (Courtaboeuf, France). Reference standards used in analytical identification (4-ADNT, 2-ADNT, 4-HADNT, 2-HADNT, 2,4-diaminonitrotoluene, 99.5% pure) were obtained from SRI International (Menlo Park, CA). Unless otherwise stated, chemicals and the enzyme, β-glucosidase from almond (G-0395), were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Solvents used for extractions and radio-HPLC analyses were obtained from Scharlau Chemie (Bar-

* Corresponding author telephone: +33 5-61-28-53-92; fax: +33 5-61-28-52-44; e-mail: fl Laurent@toulouse.inra.fr.

celona, Spain). In the absence of other specifications, all other chemicals were of analytical grade.

Cell Cultures and Treatments. Tobacco cell suspension cultures (*Nicotiana tabacum* BY2) were grown in the dark at 25 °C in Murashige and Skoog medium (Sigma M-5524) supplemented with vitamins and plant growth regulators: KH_2PO_4 (200 mg/L), sucrose (30 g/L), myoinositol (100 mg/L), thiamine (10 mg/L), and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (1×10^{-6} mol/L). The medium was adjusted to pH 5.8. Cells were transferred every week into fresh sterile medium to maintain the culture in exponential growth. For kinetic studies, 0.25 mL of 5-day-old cells was transferred into 10 mL of fresh medium in a 50 mL Erlenmeyer flask. A 400 μg sample of unlabeled TNT and 7.3 kBq of [^{14}C]-TNT were added to the culture medium 5 days after transfer of the inoculum into fresh medium. Incubation was ended 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, or 120 h after treatment. The experiments were performed in triplicates.

Extraction Procedures. Cells were separated from the medium by vacuum filtration on multigrade GMF 150 filter, 2 μm porosity (Whatman), and washed with 20 mL of distilled water. Cells were freeze-dried for 24 h to remove water. They were extracted with methanol/dichloromethane/water mixture (2:1:0.8, v/v/v) (4 mL/g fresh weight), homogenized in a glass Potter tissue grinder, and stored overnight at -20 °C (17). The homogenate was then centrifuged at 10000g for 10 min, and the pellet was washed two times in the solvent mixture. The three supernatants were combined and contained the soluble residues. The residual material, consisting of the nonextractable residues, was allowed to air-dry at room temperature for 48 h to remove organic solvents and was then freeze-dried for 24 h to remove water. TNT and metabolites of the medium were purified by solid-phase extraction (SPE). Media were adjusted to pH 8, loaded on C18 SPE cartridges (Supelco, France), and eluted with methanol. The methanol fraction was evaporated, and the dry residue was reconstituted in the appropriate HPLC mobile phase.

Determination of Radioactivity. The radioactivity of nonextractable residues was measured after oxidative combustion of aliquots of about 200 mg in an oxidizer (model 306, Packard Instrument Co, Downers Grove, IL), trapping the resulting $^{14}\text{CO}_2$ in a scintillation mixture (Permafluor and Carbo-sorb, Packard) followed by liquid scintillation counting in a Packard Tricarb 2200 CA scintillation counter. Aliquots of extractable residues and medium were directly counted with Ultimagold (Packard) as scintillation cocktail. Calculations to obtain the amounts of residues inside cells and in media were based on the activity calculated from the amount of [^{14}C]-TNT in medium.

Identification of Soluble Metabolites. Enzyme and acidic treatments were performed on a pool of cell extracts and purified medium to tentatively identify the TNT metabolites. Hydrolysis was carried out in 200 μL of reaction medium according to the method of Schmitt et al. (18). Samples under investigation containing at least 167 Bq were evaporated to dryness.

β -D-Glucosidase Hydrolysis. Samples were incubated for 2 h at 30 °C with 2 units of almond β -glucosidase (Sigma G-0395) in 0.1 M, pH 5.0, sodium acetate buffer.

Acid Hydrolysis. Samples were dissolved in 2 N HCl and heated at 100 °C for 2 h. After acid hydrolysis, distilled water was added to the samples, and the radioactivity was extracted from the aqueous phase using diethyl ether (1:1, v/v). The ether fraction was evaporated, and the dry residue was reconstituted in the appropriate HPLC mobile phase.

Chromatography. Media and cell extracts were analyzed by reverse-phase HPLC with a Spectra-Physics P4000 (Les Ulis, France) liquid chromatograph. Radioactivity was monitored with an on-line Packard Flo-One β A250 scintillation

detector, using Flo-Scint II as scintillation counting cocktail (Packard). Separation was carried out on a C18 Bischoff reverse-phase column (Prontosil Eurobond, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) with a guard cartridge. Elution was performed at 40 °C at a flow rate of 1 mL/min. The column was equilibrated with 100% of solvent A (water/acetonitrile, 95:5, v/v). Elution conditions were as follows: a 20 min linear increase of solvent B (water/acetonitrile, 60:40, v/v) from 0 to 100% and then 100% solvent B for 15 min. Retention times of standards and metabolites were as follows: TNT, 32 min; 2-ADNT and 4-ADNT, 28 min; 2-HADNT and 4-HADNT, 24 min.

Metabolites from crude extract, the pool of cell extracts, and purified media were isolated from HPLC with a fraction collector set at 4 fractions/min. An aliquot of each fraction was counted in a scintillation counter to monitor radioactivity. Gathered fractions of each peak were evaporated to dryness under vacuum and stored at -20 °C until analysis.

Mass Spectrometry. Mass spectra were obtained with a Finnigan LCQ quadrupole ion trap mass spectrometer (Thermo Electron, Les Ulis, France) equipped with an electrospray ionization source, operating under negative ionization conditions to produce deprotonated quasi-molecular ion. For ESI/MS experiments, a typical needle voltage of -4.5 kV and a heated capillary temperature of 220 °C were used. Sample solutions (1–5 ng/ μL in methanol/water, 50:50, v/v) were infused at a flow rate of 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ into the ESI source. Sheath gas flow rate was adjusted in each case to obtain a stable spray and a maximum signal level. No auxiliary gas was used. All analyses were performed in normal scan mode (unit resolution) under automatic gain control conditions. Helium was used as the collision gas for MS/MS experiments. Ion isolation and collision conditions were optimized separately for each metabolite to gain maximal structural information.

Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. Peaks isolated by HPLC were analyzed by NMR spectroscopy. NMR spectra were obtained at 300 K using a Bruker Avance DRX-600 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) operating at 600.13 MHz and equipped with a 5 mm H, C, N inverse triple resonance cryoprobe attached to a Cryoplatfom (the preamplifier cooling unit). Samples were dissolved in 600 μL of deuterated methanol (CD_3OD).

One-dimensional spectra were acquired using a standard pulse sequence for ^1H NMR; 1024 free induction decays (FIDs) were collected with a spectral width of 12 ppm into 64 K data points. An exponential function equivalent to a line-broadening of 0.3 Hz was applied prior to Fourier transformation. Two-dimensional ^1H COSY spectra were acquired under the following conditions: spectral width of 1200 Hz (2 ppm) in both dimensions, 2 K data points in the f_2 dimension, 256 increments in the f_1 dimension, and 64 scans.

To confirm spectral assignments for metabolites I and III, ^1H – ^{13}C heteronuclear single quantum correlation (HSQC) spectra were acquired using a standard echo/anti-echo-TPPI gradient selection pulse sequence with the following parameters: 6 and 30 kHz spectral widths in the proton and carbon dimensions, respectively; 1 K data points in f_2 , and 512 increments in f_1 . The ^1H – ^{13}C heteronuclear multiple bonding connectivity (HMBC) spectra optimized for long-range couplings were obtained with a 2.5 s relaxation delay; 6 and 36 kHz spectral widths in the proton and carbon dimensions, respectively; 1 K data points in f_2 ; and 512 increments in f_1 . Assignments for all protons and carbons were achieved by COSY, HMQC, and HMBC experiments.

Results

Identification of Soluble Metabolites. After incubation with [^{14}C]-TNT in tobacco cell suspension cultures, crude extract was first analyzed by radio-HPLC. A typical profile obtained

TABLE 1. Main Characteristic Ions (m/z) from Negative Ionization Conditions, and Proposed Structures for Isolated Metabolites

compound	molecular mass	main characteristic ions from negative ionization, m/z	proposed structures
2-ADNT	197	196 (100), ^a 166 (10), 136 (3)	standard
4-ADNT	197	196 (100), 166 (11), 149 (4), 136 (3)	standard
4-HADNT	213	212 (100), 194 (1), 182 (5), 165 (2)	standard
4-HADNT	213	212 (100), 194 (24), 181 (3), 164 (3)	standard
peak I	537	536 (100), 489 (8), 356 (16), 278 (20), 236 (28), 196 (3), 179 (47)	hydroxylated-ADNT-Gly-Gly ^b
peak II	537	536 (100), 489 (24), 374 (2), 341 (6), 212 (6), 196 (2), 179 (10)	hydroxylated-ADNT-Gly-Gly
peak III	375	374 (100), 327 (2), 236 (11), 212 (20), 196 (10), 183 (2)	hydroxylated-ADNT-Gly
peak IV	375	374 (100), 327 (2), 236 (18), 212 (15), 196 (10), 183 (19)	hydroxylated-ADNT-Gly
peak V	197	196 (100), 166 (15), 149 (3), 136 (4)	4-ADNT + 2-ADNT ?

^a Values in parentheses correspond to ion relative abundance. ^b Gly = glucose.

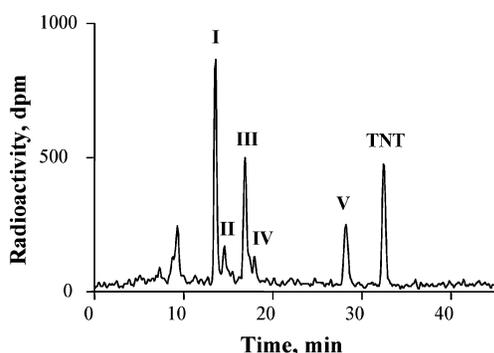


FIGURE 1. HPLC radiochromatogram of [¹⁴C]-TNT residues obtained from an aliquot of the crude extract of tobacco cell suspension culture. Peaks are numbered according to their elution order.

is shown in Figure 1. Six peaks were isolated and identified in the cell cultures; they were numbered according to their retention time (rt): I (rt 14 min), II (rt 15 min), III (rt 17 min), IV (rt 18 min), V (rt 28 min), and TNT parent compound (rt 32 min). These peaks then underwent MS and NMR analyses.

Peak V had the same retention time as ADNT standards, 2- or 4-ADNT, but our HPLC gradient did not allow discrimination between the two isomers. The structure of these metabolites was then confirmed by ESI/MS analysis when the ion at m/z 196 was detected. The negative elec-

TABLE 2. Summary of ¹H NMR Resonances of Standards and Isolated Metabolite (V)^a

compound	H-3	H-5	H-7
2-ADNT (std)	7.71 (d, 2.2)	7.77 (d, 2.2)	2.24 (s)
4-ADNT (std)	7.24 (s)	7.24 (s)	2.26 (s)
2-HADNT (std)	8.04 (d, 2)	8.19 (d, 2)	2.25 (s)
4-HADNT (std)	7.51 (s)	7.51 (s)	2.34 (s)
2-ADNT (V)	7.71 (d, 2.2)	7.77 (d, 2.2)	2.24 (s)
4-ADNT (V)	7.24 (s)	7.24 (s)	2.26 (s)

^a Chemical shifts (ppm) are relative to CD₃OD (¹H, δ , 3.31, and 4.87). Multiplicity of signals are indicated in italics: s = singlet, d = doublet, t = triplet, and m = multiplet. Values in parentheses are ¹H-¹H splittings (Hz) in cases where these are clearly resolved.

troscopy MS/MS spectrum of the peak V (Table 1) displayed a fragment ion at m/z 166 formed by the loss of NO and another fragment ion at m/z 149 resulting from the loss of HNO₂. Mass spectrometric analysis of 2- and 4-ADNT standards indicated that only the MS/MS spectrum of 4-ADNT yielded a fragment ion at m/z 149 (Figure 2). The other fragments were similar for both isomers. Consequently, the presence of the m/z 149 ion in the MS/MS spectrum of peak V indicated that this peak corresponded to 4-ADNT, but the presence of 2-ADNT isomer in the same peak could not be excluded. The structure of metabolite V was further investigated by ¹H NMR. The ¹H spectrum of metabolite V showed two types of aromatic protons in the aromatic region,

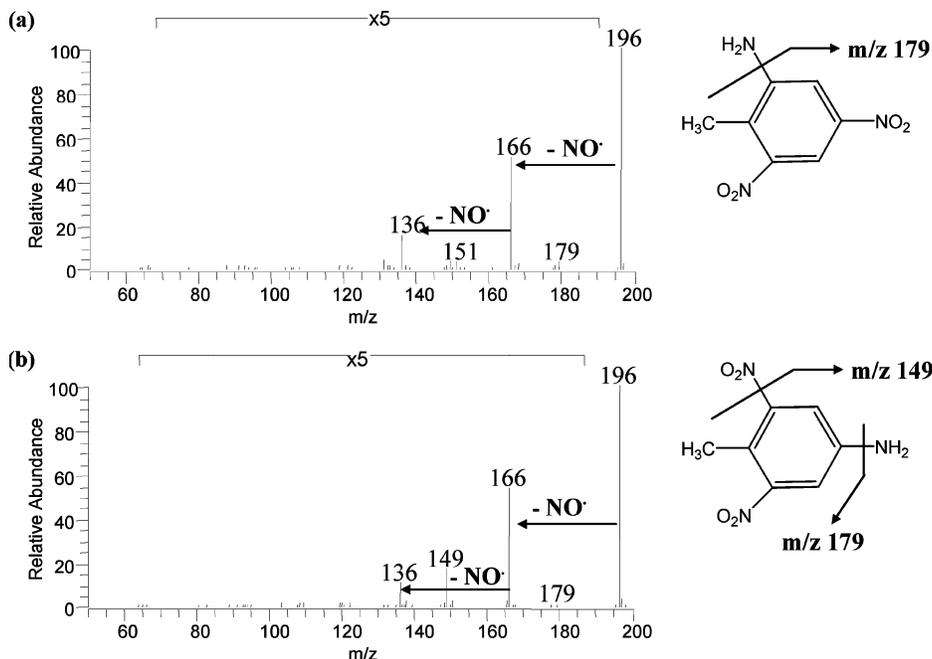


FIGURE 2. NI-ESI-MS² mass spectra of m/z 196 [M - H]⁻ ion from (a) 2-ADNT and (b) 4-ADNT standards.

TABLE 3. Summary of ¹H NMR Resonances of Isolated Metabolites (I–IV)^a

compound	aglycone moiety	glycoside I	glycoside II
4-HADNT-glc-glc (I) (1–2)	H-3/5: 8.21 (s) H-7: 2.41 (s)	H-1': 4.77 (<i>d</i> , 8.6) H-2': 3.95 (<i>t</i> , 8.6) H-3': 3.51 (<i>t</i> , 8.6) H-4': 3.32 (<i>m</i>) H-5': 3.38 (<i>m</i>) H-6': 3.60 and 3.86 (<i>m</i>)	H-1'': 4.50 (<i>d</i> , 8.0) H-2'': 3.36 (<i>m</i>) H-3'': 3.32 (<i>m</i>) H-4'': 3.20 (<i>m</i>) H-5'': 3.23 (<i>m</i>) H-6'': 3.58 and 3.78 (<i>m</i>)
4-HADNT-glc-glc (I) (1–6)	H-3/5: 7.81 (s) H-7: 2.38 (s)	H-1': 4.93 (<i>d</i> , 8.4) H-2': 3.88 (<i>t</i> , 8.4) H-3': 3.52 (<i>t</i> , 8.4) H-4': 3.37 (<i>m</i>) H-5': 3.60 (<i>m</i>) H-6': 3.80 (<i>dd</i> , 5.5, 11.9); 4.04 (<i>dd</i> , 1.5, 11.9)	H-1'': 4.22 (<i>d</i> , 8.0) H-2'': 3.13 (<i>m</i>) H-3'': 3.25 (<i>m</i>) H-4'': 3.20 (<i>m</i>) H-5'': 3.13 (<i>m</i>) H-6'': 3.60 and 3.84 (<i>m</i>)
2-HADNT-gly glc (II) (1–6)	H-3: 8.15 (<i>d</i> , 2.2) H-5: 8.54 (<i>d</i> , 2.2) H-7: 2.30 (s)	H-1': 4.69 (<i>d</i> , 7.5) H-2': 3.42 (<i>m</i>) H-3': 3.42 (<i>m</i>) H-4': 3.42 (<i>m</i>) H-5': 3.51 (<i>m</i>) H-6': 3.79 (<i>dd</i> , 5.5, 11.5); 4.18 (<i>dd</i> , 1.5, 11.5)	H-1'': 4.34 (<i>d</i> , 8.0) H-2'': 3.18 (<i>m</i>) H-3'': 3.25 (<i>m</i>) H-4'': 3.25 (<i>m</i>) H-5'': 3.15 (<i>m</i>) H-6'': 3.61 (<i>dd</i> , 5.5, 11.9); 3.82 (<i>dd</i> , 1.5, 11.9)
2-HADNT-gly (III)	H-3: 8.15 (<i>d</i> , 2.2) H-5: 8.54 (<i>d</i> , 2.2) H-7: 2.29 (s)	H-1': 4.67 (<i>d</i> , 7.7) H-2': 3.42 (<i>m</i>) H-3': 3.41 (<i>m</i>) H-4': 3.38 (<i>m</i>) H-5': 3.35 (<i>m</i>) H-6': 3.69 (<i>dd</i> , 5.5, 11.5); 3.90 (<i>dd</i> , 1.5, 11.5)	
4-HADNT-glc (III)	H-3/5: 7.81 (s) H-7: 2.37 (s)	H-1': 4.94 (<i>d</i> , 8.6) H-2': 3.85 (<i>t</i> , 8.6) H-3': 3.51 (<i>t</i> , 8.6) H-4': 3.35 (<i>m</i>) H-5': 3.39 (<i>m</i>) H-6': 3.63 (<i>dd</i> , 5.5, 11.9); 3.77 (<i>dd</i> , 1.5, 11.9)	
4-HADNT-gly (IV)	H-3/5: 7.75 (s) H-7: 2.37 (s)	H-1': 4.62 (<i>d</i> , 7.7) H-2': 3.36 (<i>m</i>) H-3': 3.40 (<i>m</i>) H-4': 3.34 (<i>m</i>) H-5': 3.32 (<i>m</i>) H-6': 3.69 (<i>dd</i> , 5.5, 11.5); 3.89 (<i>dd</i> , 1.5, 11.5)	

^a Chemical shifts (ppm) are relative to CD₃OD (1H, δ , 3.31, and 4.87). Multiplicity of signals are indicated in italics: s = singlet, d = doublet, t = triplet, and m = multiplet. Values in parentheses are ¹H–¹H splittings (Hz) in cases where these are clearly resolved. glc = glucose.

a singlet at 7.24 ppm and two doublets at 7.72 and 7.77 ppm (Table 2). The singlet at 7.24 ppm corresponded to the two equivalent aromatic protons of 4-ADNT. The two doublets corresponded to both non equivalent aromatic protons of 2-ADNT. Peak V was a mixture of 2-ADNT and 4-ADNT. The proportion of each isomer was 60% of 2-ADNT and 40% of 4-ADNT.

The other peaks did not coelute with known standard metabolites (2-HADNT, 4-HADNT, 2,4-diamino-6-nitrotoluene) but were hydrolyzed by HCl to 2- and 4-ADNT. The outcome of this hydrolysis treatment suggested that these compounds were conjugates of ADNT.

Mass spectrometric analysis of isolated peak III yielded a quasi-molecular ion at *m/z* 374, consistent with the *m/z* ratio of the [M – H][–] deprotonated ions of hydroxylated 2- and/or 4-ADNT-glycoside. This result was further confirmed by MS/MS experiments, in which the *m/z* 374 ion was mainly decomposed by loss of the glycoside moiety leading to the formation of the fragment ions at *m/z* 212 and 196 (Table 1, Figure 3).

MS³ experiments carried out on the fragment ion at *m/z* 212 yielded fragment *m/z* 194 ions by loss of water, which was also observed in the MS/MS spectrum of standard HADNT. MS³ spectrum of the *m/z* 196 ion displayed fragment ions at *m/z* 166 and 149 similar to the MS/MS spectrum of 4-ADNT. Analysis of peak III indicated that it was composed of glycoside conjugates of hydroxylated ADNT.

MS data did not permit to localize the hydroxyl position (benzyl hydroxyl, aryl hydroxyl, or hydroxylamine) on ADNT. Its structure was then further investigated by NMR (Tables 3 and 4 and Figure 4). The ¹H spectrum of metabolite III showed two types of aromatic protons (H-3 and H-5), which chemical shifts were similar to those of aryl-protons of 2- and 4-HADNT standards (Table 2). Likewise, chemical shift of benzyl proton (H-7) corresponded to those of 2- or 4-HADNT. This indicated that hydroxylation did not take place on 3- or 5-aryl or on alkyl positions. The chemical shifts of aromatic protons and the results obtained from mass spectrometry analysis showed that this peak was a mixture of 2- and 4-HADNT conjugated with a monoglycoside in similar proportions. The ¹H and ¹³C NMR data summarized in Tables 3 and 4 were different for the two glycosides. For the glycoside conjugated to 4-HADNT, the peaks corresponding to H-1', H-2', and H-3' of the sugar moiety were triplets. The high coupling constant of 8.60 Hz showed that the three protons were in axial position. This glycoside was certainly β -glucose. The ¹³C chemical shifts determined with HSQC and HMBC NMR spectra confirmed this hypothesis. The glycoside conjugated to 2-HADNT was not glucose because the ¹H and ¹³C chemical shifts were different. The NMR data were not sufficient to determine the structure of the glycoside.

Digestion of the crude extract with almond β -D-glucosidase led to the conversion of metabolite III fraction to a peak

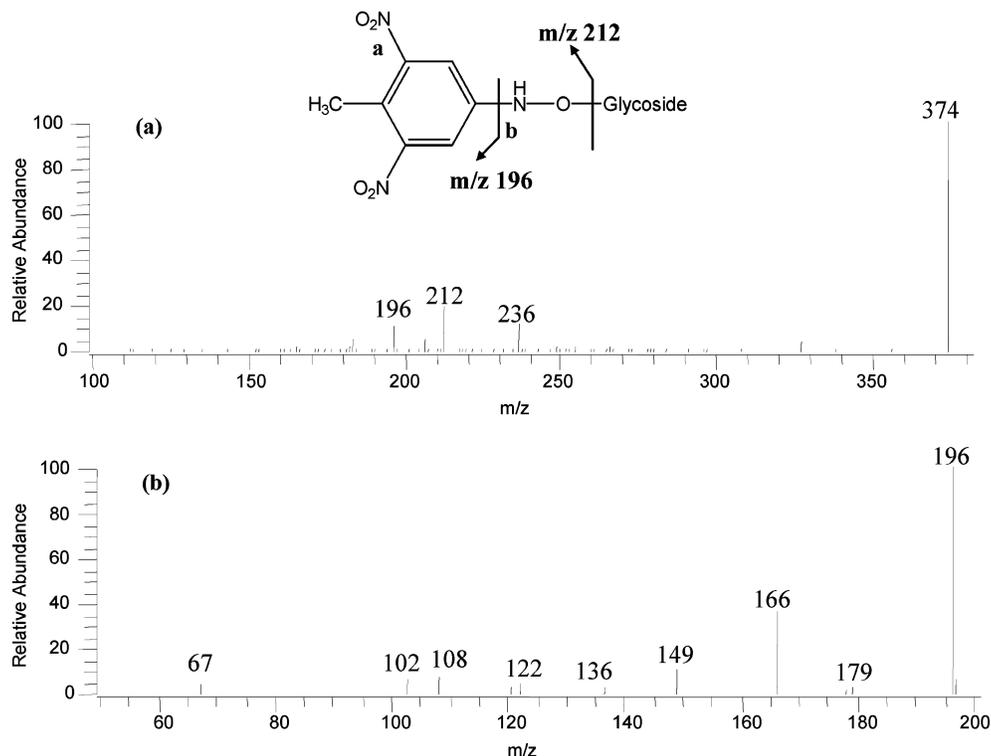


FIGURE 3. (a) NI-ESI-MS² spectrum of m/z 374 $[M - H]^-$ ion and (b) MS³ (374-196) spectrum of m/z 196 $[M - H]^-$ ion of peak III. For 2-HADNT derivative, the positions a and b were reversed.

TABLE 4. Summary of ¹³C NMR Resonances of Isolated Metabolites I and III^a

compound	aglycone moiety	glycoside I	glycoside II
4-HADNT-glc-glc (I) (1-2)	C-1: 120.9	C-1': 94.5	C-1'': 105.1
	C-2/6: 153.2	C-2': 80.8	C-2'': 74.8
	C-3/5: 118	C-3': 78.0	C-3'': 78.0
	C-4: 149.9	C-4': 71.2	C-4'': 71.8
	C-7: 14.1	C-5': 78.0	C-5'': 77.8
4-HADNT-glc-glc (I) (1-6)	C-1: 120.9	C-1': 91.7	C-1'': 104.4
	C-2/6: 153.2	C-2': 71.1	C-2'': 75.0
	C-3/5: 118	C-3': 78.0	C-3'': 77.9
	C-4: 149.9	C-4': 71.2	C-4'': 71.4
	C-7: 14.1	C-5': 78.8	C-5'': 77.8
		C-6': 69.8	C-6'': 62.5
2-HADNT-gly (III)	C-1: 124.5	C-1': 107.5	
	C-2: 152.8	C-2': 73.4	
	C-3: 111.5	C-3': 78.0	
	C-4: 148.1	C-4': 71.0	
	C-5: 111.9	C-5': 78.0	
	C-6: 151.4	C-6': 62.8	
	C-7: 12.9		
4-HADNT-glc (III)	C-1: 118.0	C-1': 91.8	
	C-2/6: 153.6	C-2': 71.1	
	C-3/5: 114.9	C-3': 78.6	
	C-4: 151.7	C-4': 71.0	
	C-7: 13.9	C-5': 78.5	
		C-6': 62.2	

^a Chemical shifts (ppm) are relative to CD₃OD (¹³C, δ , 49.0 ppm).

exhibiting the same rt (24 min) as both HADNT standards. This observation confirmed the presence of HADNT-glycoside at peak III. Nevertheless, enzymatic digestion was not complete. Results obtained from mass spectrometry analyses suggested that the non-hydrolyzable fraction also corresponded to HADNT-glycoside.

Peak IV displayed the same ESI MS/MS spectrum as peak III and could therefore be a HADNT-glycoside isomer; however, NMR analysis (Table 3 and Figure 4) showed that

it was only 4-HADNT-glycoside. The ¹H chemical shifts of the sugar region observed for this metabolite indicated that the glycoside was not glucose. On the other hand, the ¹H NMR spectrum of the sugar region was very similar to that of glycoside conjugated to 2-HADNT in metabolite III, which could probably be the same glycoside.

Peak I was analyzed by ESI/MS. Its mass spectrum showed a quasi-molecular $[M - H]^-$ ion at m/z 536. In the MS/MS experiment (Table 1), this ion decomposed into the fragment ion at m/z 356 corresponding to hydroxylated-ADNT-glycoside by the loss of 180 amu (atomic mass unit), which is specific to a hexose moiety. The complementary fragment ion was detected at m/z 179 and corresponded to the deprotonated sugar. In accordance with MS data, the disaccharide conjugate of hydroxylated-ADNT is proposed here as the possible structure for metabolite I. This structure was confirmed by NMR. The ¹H spectrum of metabolite I showed two singlets at 8.21 and 7.81 ppm in the aromatic region and four anomeric proton signals at 4.22, 4.50, 4.77, and 4.93 ppm (Table 3). The chemical shifts of aromatic protons and the results obtained by mass spectrometry were indicative of a mixture of 4-HADNT conjugated with two disaccharides. The structure of the disaccharides was different for the two compounds. The ¹H and ¹³C chemical shifts and coupling constants of sugar region showed that the two glycosides were β -glucose. For the major compound, the chemical shift of the H-2' (3.95) and C-2' (80.0) indicated that the linkage between the two β -glucoses was $\beta(1\rightarrow2)$ corresponding to sophorose. For the minor compound, the chemical shift of the H-6' (4.04 and 3.77) and C-6' (69.8) indicated that the linkage between the two β -glucoses was $\beta(1\rightarrow6)$ corresponding to gentiobiose. The proportion of 4-HADNT-sophorose was 70%. HMBC correlations from anomeric proton across the glycosidic bond to the carbon of the second glucose confirmed the linkage of the disaccharides.

The structure of peak II was first analyzed by MS (Table 1). Under negative ionization conditions, metabolite II yielded a quasi-molecular $[M - H]^-$ ion at m/z 536 in the same way

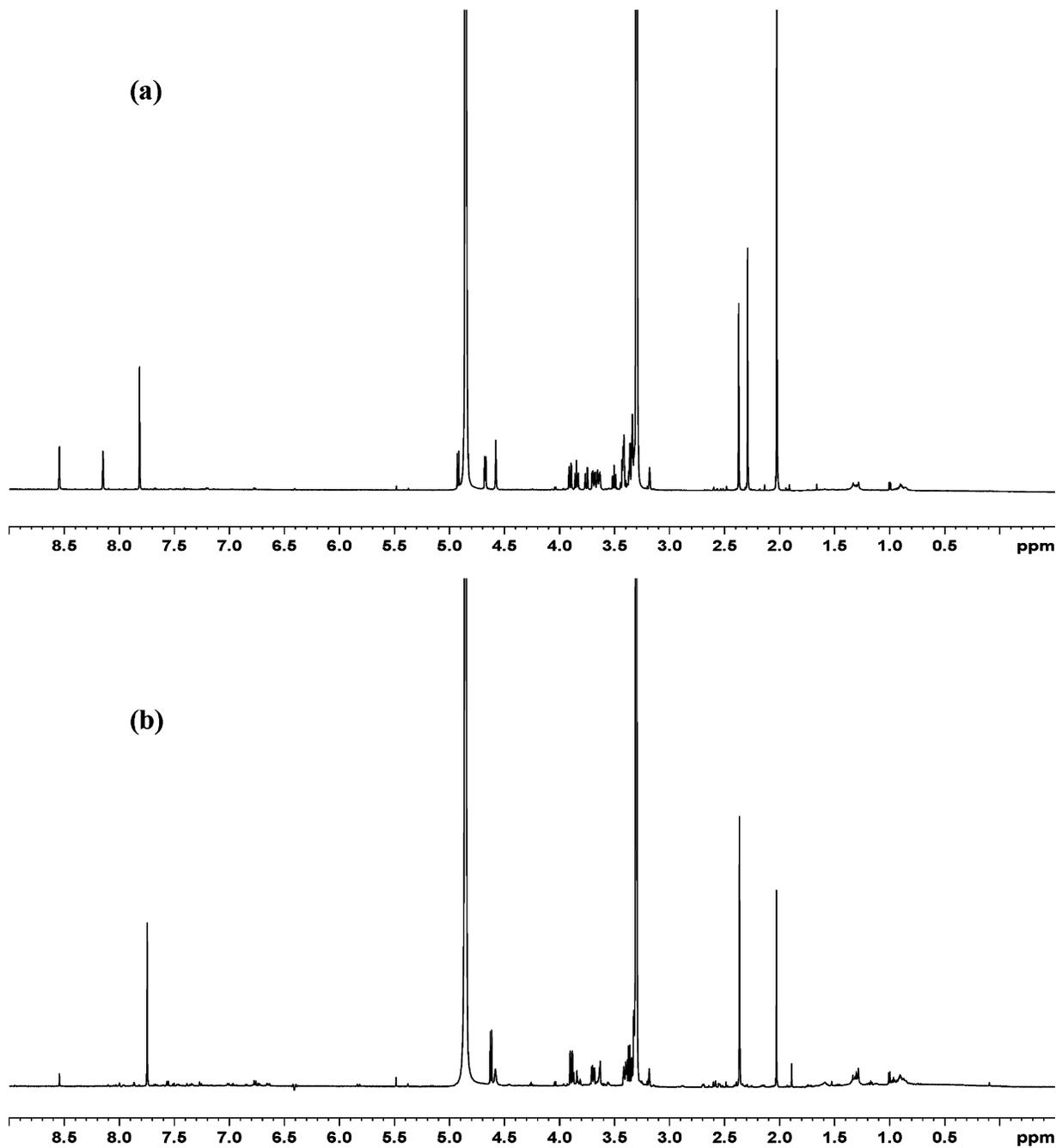


FIGURE 4. ^1H NMR spectra in D_2O of TNT metabolites isolated from tobacco cell suspension cultures. (a) peak III, 2-HADNT-glycoside and 4-HADNT-glycoside; (b) peak IV, 4-HADNT-glycoside.

as for peak I, but its MS/MS spectrum exhibited a different fragmentation pathway (Figure 5).

The main decomposition corresponded to loss of HNO_2 leading to m/z 489 ion. Diagnostic ion were also observed but were of low relative abundance. Two complementary fragment ions were observed at m/z 196 and 341, which corresponded respectively to the deprotonated ADNT and to a deprotonated diosidic moiety. As for peak I, the two complementary fragment ions at m/z 179 and 356 were also found, which corresponded to a deprotonated sugar and hydroxylated-ADNT-glycoside, respectively. Peak II thus appeared to be an isomer of peak I metabolites. NMR analysis confirmed this hypothesis (Table 3). In the aromatic region of the ^1H spectrum of metabolite II, only two doublets were identified at 8.15 and 8.54 ppm indicating the presence of only one 2-HADNT isomer. In addition, two anomeric

proton doublets were detected at 4.69 and 4.34 ppm. 2-HADNT was conjugated to a diglycoside. The ^1H chemical shifts and coupling constants of sugar region indicated that the first sugar moiety was not glucose and it was probably the same glycoside as found in metabolite IV. The second glycoside was tentatively identified as glucose because the ^1H chemical shifts were very similar to those of metabolite I. The linkage between the two glycosides was $\beta(1 \rightarrow 6)$.

Minor metabolites (unnumbered peaks) appeared at retention times of less than 10 min. Owing to their high polarity and their low quantity in crude extract, they could not be characterized by MS or NMR analysis.

Kinetics of Formation of TNT Metabolites. Over the period of cell cultures, the concentration of radioactivity decreased in the medium. TNT concentration fell exponen-

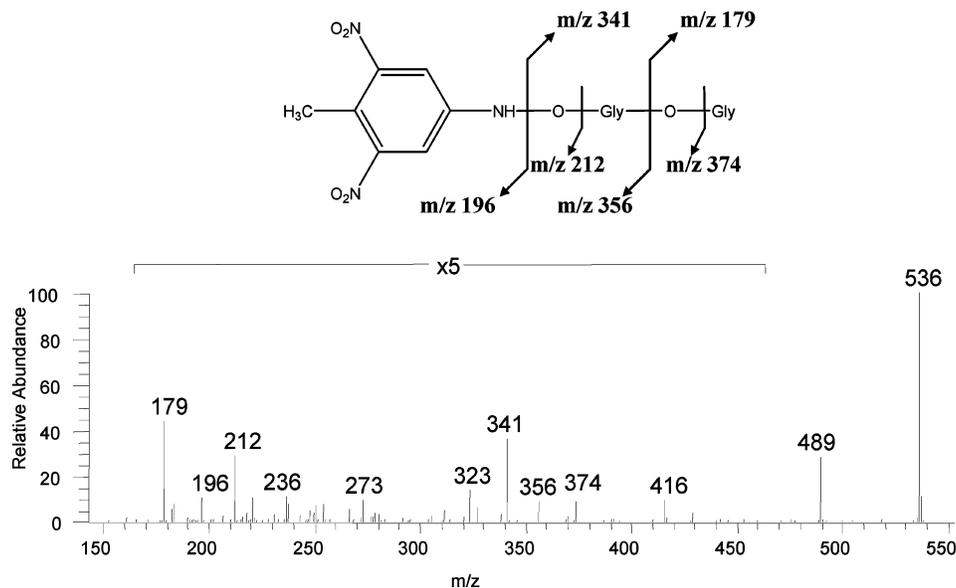


FIGURE 5. NI-ESI-MS² spectrum of peak II (Gly = glucose).

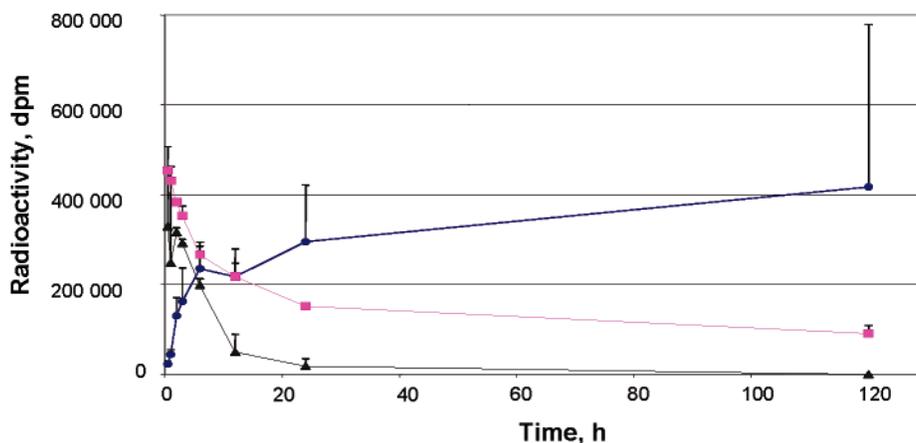


FIGURE 6. Temporal profile of radioactivity in culture media (■) and cells (●) during incubation of tobacco cell suspension culture with [¹⁴C]-TNT and specific [¹⁴C]-TNT radioactivity in culture media (▲).

tially and this compound disappeared after 24 h of incubation (Figure 6). After 12 h, more polar metabolites appeared; these were identified as ADNT, and HADNT mono- and diglycoside conjugates (Figure 7). These metabolites resulted from cell exportation since no TNT degradation took place in sterile culture medium after 48 h of incubation (data not shown). TNT was not found in cell extracts where the total radioactivity was attributed to more polar metabolites (Figure 7) and a small fraction to nonextractable products.

These data indicated that TNT was rapidly and extensively biotransformed by tobacco cells. TNT was metabolized to HADNT, which was quickly conjugated to glucose, because no free HADNT was detected during culture. The HADNT monoglycosides were the main metabolites up until 12 h. Subsequently various diglycosides were formed. In both compartments of the culture, NMR analyses showed that reduced metabolites at position 4 (4-ADNT, 4-HADNT-mono- and diglycosides) accounted for 68% of identified metabolites, which likely reflected a preferential reduction of the nitro group in the para position. Free ADNT was not detected in cells, but was present in the culture medium. In the final period of culture, concentrations of monoglycosides decreased in cells, whereas diglycosides tended to accumulate. The decrease in monoglycosides also resulted in their preferential exportation to the medium. Indeed, the ratio of

monoglycosides versus diglycosides was higher in the medium than in cells.

Unidentified polar metabolites (rt between 3 and 10 min) appeared after 6 h. Upon HCl hydrolysis, they were degraded to ADNT like HADNT conjugates. Indeed, in these conditions, HADNT was also transformed to ADNT. Therefore, the nature of aglycone, the nonsugar moiety, in polar metabolites could not be determined.

Discussion

The purpose of this study was to identify the metabolites of TNT in tobacco cell suspension cultures. The metabolic pathways of TNT had been already investigated in plants (19). It has been shown that the reduction to ADNT and its subsequent glyco-conjugation and incorporation of residues in cell walls is an important process in TNT detoxification (12). Nitroreduction in plants is postulated for being as in microorganisms a three-step process, each requiring two electrons, yielding a nitrosamine followed by a hydroxylamine formation before a complete reduction to the amine (20). Wang et al. (14) showed that HADNT could play a major role in TNT phytoremediation processes because it could lead to azoxy compounds by either biotic or abiotic oxidation. The latter may be more convenient residues for the environment due to their stability and their weaker toxicity. Another aim

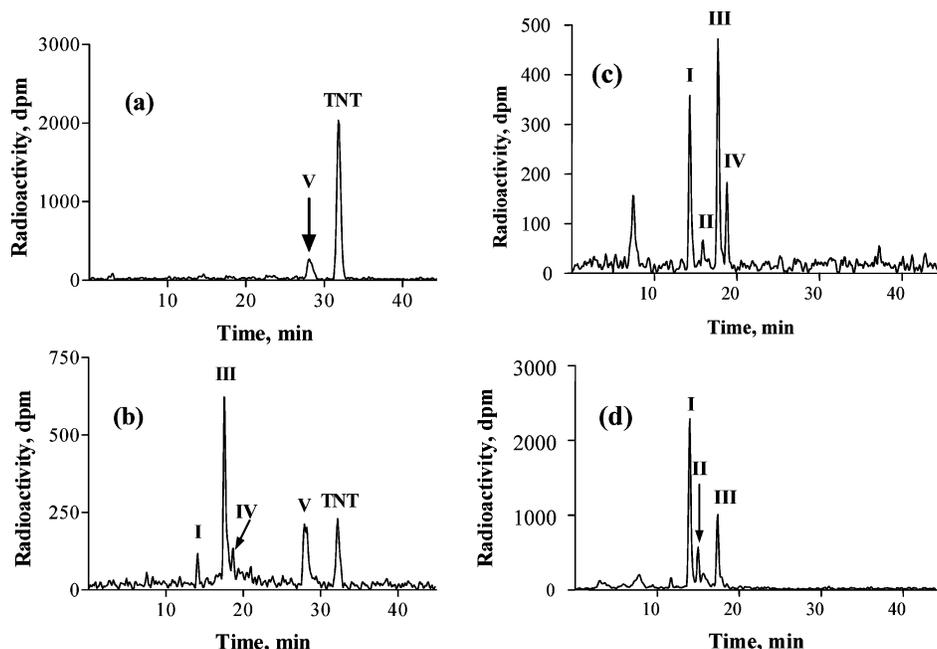


FIGURE 7. Typical HPLC radiochromatograms of [¹⁴C]-TNT soluble residues obtained from purified culture media after (a) 3 h of incubation, (b) 24 h of incubation, and cellular extracts after (c) 3 h of incubation, (d) 24 h of incubation. I, 4-HADNT-sophoroside + 4-HADNT-gentiobioside; II, 2-HADNT-diglycose; III, 4-HADNT-glucose + 2-HADNT-glycose; IV, 4-HADNT-glycose; V, ADNT.

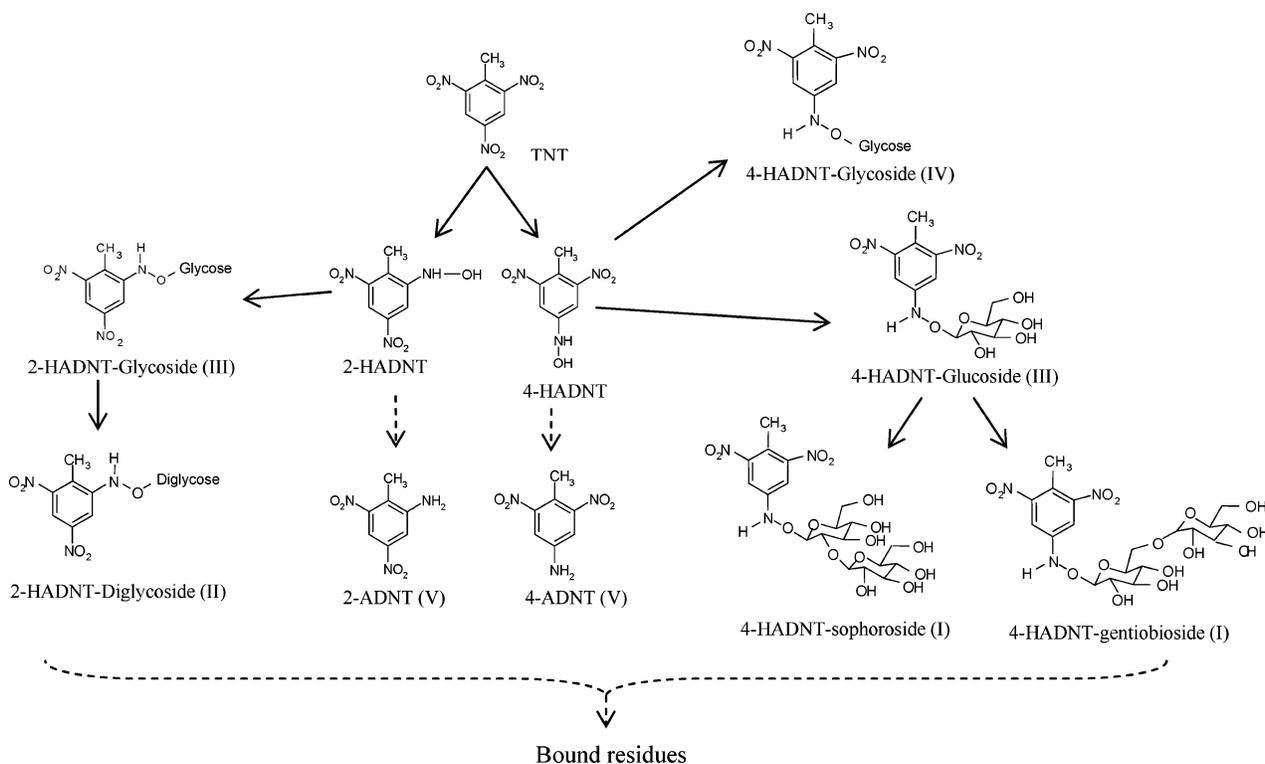


FIGURE 8. Proposed metabolic pathways of TNT phytotransformation in tobacco cell suspension cultures.

of this study was thus to clarify the importance of HADNT during TNT phytotransformation processes using tobacco cells. HADNT and/or HADNT conjugates have not yet been fully characterized but only suggested as one of the reduced intermediaries (3, 21). Wang et al. (14) only found HADNT in the medium but did not identify it in their plant, *Myriophyllum aquaticum*.

The identification of the metabolites allowed us to propose a metabolic pathway for TNT in which HADNT played the major role (Figure 8). TNT nitroreduction was the sole pathway characterized in tobacco cell suspension cultures.

TNT was taken up by cells and was immediately reduced to HADNT, which was rapidly conjugated to glucose. Although HADNT was not detected as a free metabolite, we showed that HADNT was the main primary metabolite in cell cultures. This was confirmed by enzymatic hydrolysis of monohexose conjugates and several spectral data of the different conjugates. The action of β -glucosidase on susceptible conjugates led to HADNT. These conjugates had a higher molecular mass than that expected for an ADNT monoglycose conjugate. A 16 mass unit difference (equivalent to one oxygen atom) was observed. Equivalent MS data were obtained with other

more complex glycosides. ¹H NMR analyses showed that the supernumerary oxygen did not modify chemical shifts of aromatic protons or benzyl protons. Therefore, it resulted from a NO₂ reduction to hydroxylamine. ¹H and ¹³C NMR analyses completed structural observations with the identification of the bond type between glucose residues.

Most studies have recognized ADNT as major metabolite of TNT phytoremediation although it represented only a small fraction of initial TNT, generally less than 15% (12). In our study, TNT was almost fully transformed to HADNT, but only a small fraction exported in culture medium was totally reduced to ADNT. HADNT was assumed to be rapidly transformed by glycosyltransferases whereas affinity of these enzymes for ADNT was probably lower, making easier its exportation as free metabolite in culture medium.

The nature of conjugates obtained in tobacco cells was in good agreement with previous published data on the conjugation of xenobiotics. Higher plants are able to conjugate a diverse range of environmental chemicals with natural plant constituents such as glucose (22). Pesticide metabolites were generally conjugated by an O-glycosidic or N-glycosidic bond. However, a few NO-glycosides have been identified in plants following an initial N-hydroxylation (22). Furthermore, glycoside conjugates are known to undergo glycosyl extension to give more complex conjugates (22). The observation of HADNT-NO-β-diglycosides, such as 4-HADNT-sophoroside or gentiobioside, was therefore not surprising. Nevertheless, we also showed that the saccharide structure of conjugates varied as a function of the nitro-group since no 2-HADNT-glucoside was observed.

In contrast to *Myriophyllum aquaticum* (12), bound residues accounted for a small fraction of ¹⁴C radioactivity during TNT phytotransformation by tobacco cell suspension cultures. Nevertheless, low levels of xenobiotic bound residues have commonly been found in cell suspension cultures (17, 23), in relation to the lack of secondary cell walls (CW) as compared to whole plants (24, 25). Indeed, lignin from secondary CW is considered to be the best substratum for bound residues, particularly for residues with an amine group, such as ADNT (26). Nevertheless, incorporation in CW could explain disappearance of ADNT in last time culture. Concomitant formation of unidentified metabolites (rt about 3–10 min) could participate to the decrease in ADNT concentration. HADNT-glycosides exported to medium could also be bound residue precursors (27). Glycoside exportation seemed to be a selective mechanism. Since monoglycosides were more exported than other conjugates, saccharide chain extension seemed to block cell efflux. Same result was observed for other xenobiotic glycosides in soybean cell cultures (17).

As underscored by Bhadra et al. (12), the determination of the actual reactive center of TNT metabolites, here hydroxylamine, might be the most important fact deduced from the analysis of conjugates. However, the understanding of the dynamic of metabolite formation is also of concern. Indeed, the rates of the conjugation and the conjugate efflux out of cells might govern the ultimate residue formation and therefore the phytoremediation process. In this way, to determine the nature of the saccharide moiety and to understand the formation of bound residues could be as essential as the determining of nature and safety of the bound metabolites.

To the best of our knowledge, our study on tobacco cells is the first formal characterization of HADNT as a metabolite of TNT in plants. This characterization highlighted the central role of HADNT in tobacco TNT degradation with a specific pathway for this metabolite. However, it seems that the key to the phytoremediation process in miscellaneous plants might be HADNT-glycosyltransferases. Further studies on plants are required to determine the transformation process

and the fate of hydroxylamine, particularly its role in the formation of bound residues as an alternative to the formation of ADNT bound residues.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. D. Tremousaygue (INRA-CNRS, UMR Biologie Moléculaire des Relations Plantes/Microorganismes, Toulouse, France) for providing the tobacco cell suspension cultures. We wish to thank Dr. Ron Spanggard (SRI International) for the gift of several reference standards.

Literature Cited

- (1) Honeycutt, M. E.; Jarvis, A. S.; MacFarland, V. A. Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1996**, *35*, 282–287.
- (2) Rodgers, J. D.; Bunce, N. J. Treatment method for the remediation of nitroaromatic explosives. *Water Res.* **2001**, *35*, 2101–2111.
- (3) Thompson, P. L.; Ramer, L. A.; Schnoor, J. L. Uptake and transformation of TNT by hybrid poplar trees. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 975–980.
- (4) Vanderford, M.; Shanks, J. V.; Hughes, J. B. Phytotransformation of trinitrotoluene (TNT) and distribution of metabolic products in *Myriophyllum aquaticum*. *Biotechnol. Lett.* **1997**, *19*, 277–280.
- (5) Sens, C.; Scheidemann, P.; Werner, D. The distribution of ¹⁴C-TNT in different biochemical compartments of the monocotyledonous *Triticum aestivum*. *Environ. Pollut.* **1999**, *104*, 113–119.
- (6) Harvey, S. D.; Fellows, R. J.; Cataldo, D. A.; Bean, R. M. Analysis of 2,4,6-trinitrotoluene and its transformation products in soils and plant tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1990**, *518*, 361–374.
- (7) Larson, S. L. Fate of explosive contaminants in plants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1997**, *829*, 195–201.
- (8) Scheidemann, P.; Klunk, A.; Sens, C.; Werner, D. Species dependent uptake and tolerance of nitroaromatic compounds by higher plants. *J. Plant Physiol.* **1998**, *152*, 242–247.
- (9) Palazzo, A. J.; Leggett, D. C. Effect and disposition of TNT in a terrestrial plant. *J. Environ. Qual.* **1986**, *15*, 49–52.
- (10) Hannink, N.; Rosser, S. J.; French, C. E.; Basran, A.; Murray, J. A. H.; Nicklin, S.; Bruce, N. C. Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nature Biotechnol.* **2001**, *19*, 1168–1172.
- (11) Wayment, D. G.; Bhadra, R.; Lauritzen, J.; Hughes, J. B.; Shanks, J. V. A transient study of formation of conjugates during TNT metabolism by plant tissues. *Int. J. Phytorem.* **1999**, *1*, 227–239.
- (12) Bhadra, R.; Wayment, D. G.; Hughes, J. B.; Shanks, J. V. Confirmation of conjugation processes during TNT metabolism by axenic plant roots. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 446–452.
- (13) Rieger, P. G.; Knackmuss, H. J. In *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds*; Spain, J., Ed.; Plenum Press: New York, 1995; pp 1–18.
- (14) Wang, C.; Lyon, D. Y.; Hughes, J. B.; Bennett, G. N. Role of hydroxylamine intermediates in the phytotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Myriophyllum aquaticum*. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 3595–3600.
- (15) Sandermann, H. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 82–84.
- (16) Van Aken, B.; Yoon, J. M.; Schnoor, J. L. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 508–517.
- (17) Laurent, F.; Scalla, R. Metabolism and cell wall incorporation of phenoxyacetic acid in soybean cell suspension culture. *Pestic. Sci.* **1999**, *55*, 3–10.
- (18) Schmitt, R.; Kaul, J.; von der Trenk, T.; Schaller, E.; Sandermann, H. β-D-glucosyl and O-malonyl-β-glucosyl conjugates of pentachlorophenol in soybean and wheat: identification and enzymatic synthesis. *Pestic. Biochem.* **1985**, *24*, 77–85.
- (19) Hannink, N.; Rosser, S. J.; Bruce, N. C. Phytoremediation of explosives. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2002**, *21*, 511–538.

- (20) Pavlostathis, S. G.; Comstock, K. K.; Jacobson, M. E.; Saunders, F. M. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by the aquatic plant *Myriophyllum spicatum*. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 2266–2273.
- (21) Subramanian, M.; Shanks, J. V. In *Phytoremediation*; McCutcheon, S. C.; Schnoor, J. L., Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, N.J., 2003; pp 389–408.
- (22) Cole, D. J.; Edwards, R. In *Metabolism of Agrochemicals in Plants*; Roberts, T., Ed.; John Wiley & Sons: Harrogate, 2000; pp 107–154.
- (23) Sandermann, H.; Scheel, D.; von der Trenck, T. Metabolism of environmental chemicals by plants—Copolymerization into lignin. *J. Appl. Polym. Sci.* **1983**, *37*, 407–420.
- (24) Gareis, C.; Rivero, C.; Schuphan, I.; Schmidt, B. Z. Plant metabolism of xenobiotics. Comparison of metabolism of 3,4-dichloroaniline in soybean excised leaves and soybean cell suspension cultures. *Z. Naturforsch.* **1992**, *47*, 823–829.
- (25) Laurent, F.; Scalla, R. Phenoxyacetic acid residue incorporation in cell walls of soybean (*Glycine max.*). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4389–4398.
- (26) Lange, B. M.; Hertkorn, N.; Sandermann, H. Chloroaniline/lignin conjugates as model system for nonextractable pesticide residues in crop plants. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 2113–2118.
- (27) Schmidt, B.; Breuer, J.; Thiede, B.; Schuphan, I. Metabolism of the pesticide 4-[U-¹⁴C]nitrophenol in *Datura stramonium* (L.) cell suspension culture. A model for processing of xenobiotic carbohydrate conjugates and formation of nonextractable residues. *Pestic. Biochem.* **1997**, *57*, 109–118.

Received for review April 8, 2004. Revised manuscript received October 12, 2004. Accepted October 26, 2004.

ES0494609

CHAPITRE V

CAS D'UN SITE POLLUE

La société EURENCO (European Energetics Corporation) est une unité opérationnelle du Groupe SNPE. Ce dernier fait partie des leaders européens dans le domaine de la production de poudres et explosifs, c'est également le fournisseur de poudres, objets combustibles et explosifs de GIAT Industries. La Société Nationale des Poudres et Explosifs a été réformée dans les années 1970 suite au traité de Rome qui réglemente les monopoles nationaux à caractère commercial.

L'usine de cette société que nous avons étudiée est un établissement ancien dont les activités remontent avant la Seconde Guerre Mondiale. Ses activités se sont beaucoup diversifiées au cours du temps, allant de la fabrication de peintures à la synthèse d'explosifs ou d'herbicides nitrés.

Toutes ces synthèses ont engendré des pollutions importantes. En effet, auparavant, les eaux usées provenant de la synthèse des différents composés étaient envoyées vers deux bassins de décantation où les molécules en solution précipitaient. Après le passage dans ces deux bassins, les eaux déchargées de leur pollution étaient redirigées vers la rivière avoisinante. Cette méthode de dépollution a été abandonnée depuis une trentaine d'années. En effet, il n'y avait pas de contrôle précis de cette décontamination. De nos jours, ces lagunes sont abandonnées mais il reste des sédiments fortement chargés en composés divers. Outre les résidus de synthèse des explosifs (TNT, RDX, HMX) et des herbicides dinitrophénoliques (dinosèbe, dinoterbe et dinitroorthocrésol), d'autres sous-produits de synthèse ont aussi été éliminés dans ces lagunes.

Pour envisager la mise en place d'un processus de phyto-dépollution, plusieurs étapes préalables sont nécessaires. D'une part, l'observation générale du site est indispensable pour orienter nos choix vers des plantes adaptées aux conditions climatiques et pédologiques. En raison de l'ancienneté de la contamination, les polluants présents dans les sédiments ne sont pas forcément disponibles pour les plantes. Les explosifs peuvent avoir subi de nombreuses modifications, ils peuvent notamment se retrouver liés au sol, par exemple aux substances humiques, ou être partiellement dégradés. Des études de biodisponibilité des explosifs présents dans les sédiments des lagunes ont donc complété le dosage des explosifs présents dans le sol. Sur ce site, la profondeur de la contamination n'est pas très importante, la majorité des polluants est concentrée sur les 50 premiers centimètres, la sous-couche étant un socle

argileux. Les nombreux produits contaminant le sol des deux lagunes impliquent obligatoirement une étude de la toxicité de ces sols vis-à-vis des plantes retenues pour le processus de phyto-dépollution. Nous avons ainsi étudié la phytotoxicité de sédiments recueillis dans des zones hautement contaminées pour vérifier si l'implantation directe de végétaux est envisageable.

V.1 Observations du site

Le site d'étude est localisé dans le sud de la France, le climat y est de type méditerranéen. Les étés sont très chauds et secs, il faut donc envisager des plantes qui supportent ces conditions climatiques. Le site est composé de deux lagunes de 12 000 m² de surface totale. La lagune la plus au sud représente une surface de 8000 m², elle mesure environ 175 m de long et 50 m de large. La lagune la plus au nord mesure environ 125 m de long et 50 m de large. Les eaux polluées provenant des diverses productions locales étaient déversées dans les lagunes à partir de la zone émissaire située à l'extrémité sud de la lagune sud. L'eau s'écoulait naturellement du sud vers le nord en permettant une sédimentation des polluants. Les lagunes ne sont aujourd'hui plus alimentées en eau par l'émissaire, toutefois, elles contiennent toujours de l'eau. Cette eau est d'une couleur jaune, certainement à cause des produits nitrés de diverses natures présents dans les sédiments. Cette eau provient certainement des eaux de ruissellement car les lagunes sont situées un à deux mètres en dessous du niveau du sol du site. En été, il y a une baisse du niveau d'envoyage des lagunes.

L'évaluation de la pollution des sédiments lagunaires a été réalisée par le bureau d'étude LISEC (Nanterre, France). Elle a permis de déterminer les taux de contamination et la répartition spatiale des pollutions (en surface et à 70 cm de profondeur). Les composés dosés sont principalement des composés organiques volatils (toluène, tétrachlorure de carbone, dichlorobenzène, trichlorobenzène...), des explosifs (HMX, RDX, TNT, pentrite...), des nitrophénols (dinosèbe, dinoterbe, DNOC...) ainsi que l'acide picrique. La majeure partie de la pollution du site est constituée par les explosifs et les nitrophénols. Les nitrophénols présents majoritairement sont des herbicides de contact. Ce sont des produits de post-levée des dicotylédones qui pour être efficaces doivent toucher des plantules très jeunes qui sont alors incapables de se régénérer après destruction de leur parties aériennes. Ces herbicides sont utilisés dans les cultures agricoles de soja, des fruits, des noix, des noisettes et autres, pour le contrôle sélectif des mauvaises herbes dicotylédones en général. Ils peuvent aussi être

utilisés comme insecticide pour le raisin. L'utilisation du dinosèbe a été interdite en 1986 aux Etats-Unis (U.S. EPA) et en 1991 en France. Celle du dinoterbe a été interdite en 1998 par la Commission Européenne. Ces herbicides sont particulièrement dangereux pour l'homme et le gibier. Ils sont en effet responsables du découplage des phosphorylations oxydatives et du blocage de la synthèse d'ATP. Cette pollution très élevée représente un risque toxicologique mais elle peut aussi nuire fortement à l'implantation de végétaux sur le site.

La pollution en explosifs est localisée autour de l'émissaire, dans la moitié sud de la lagune sud. Il y a un gradient de concentration depuis l'émissaire. La lagune nord est considérée par LISEC comme non polluée, c'est la raison pour laquelle nous avons orienté nos investigations uniquement sur la lagune sud.

La végétation est importante autour de cette lagune. Les visites réalisées en juillet 2004 et juillet 2005 ont permis d'observer le type de plantes présentes sur le site et leur implantation par rapport à la pollution. Quatre zones ont été distinguées (Figure V.1) : une bande asséchée (A) dans le prolongement de l'émissaire, une zone émergée (B) dans une partie hautement contaminée de la lagune, le pourtour de la lagune en contact avec l'eau et le pourtour de la lagune situé à plus d'un mètre de l'eau.

Aucune plante ne pousse sur la zone A, la pollution doit être trop importante pour permettre l'installation de plantes, même les plus résistantes.

La zone B est recouverte de plantes variées qui ne sont pas très développées : du jonc (*Juncus effusus*), de la massette (*Typha angustifolia*), du paturin (*Poa pratensis*), du lotier (*Lotus corniculatus*), de l'inule (*Inula viscosa*), des jeunes pousses de peupliers blancs (*Populus alba*) et de peupliers trembles (*Populus tremula*). Une autre dicotylédone présente en faible quantité n'a pas été identifiée.

Une partie immergée dans le prolongement de la zone B vers le nord est peu profonde et elle est envahie de massette sur 25 m². Du roseau (*Phragmites communis*) est présent au bord de la lagune, "les pieds dans l'eau". Par endroits, il y a aussi du jonc. A environ deux mètres des bords de la lagune, le niveau du sol est plus élevé et les plantes qui s'y développent sont a priori hors d'atteinte de l'eau pour leurs parties aériennes. Les plantes pérennes correspondent à des espèces arbustives (des peupliers blancs ou trembles et des saules) pouvant supporter des conditions d'humidité importante tandis que les plantes annuelles sont pour la plupart caractéristiques de biotopes secs. La nature très caillouteuse de cette zone faite de remblais, par conséquent avec un fort pouvoir filtrant, doit pouvoir expliquer cette distinction.

Le jonc, la massette et le roseau sont des plantes adaptées aux milieux semi-aquatiques ou aquatiques, leur présence sur le site n'est donc pas surprenante. De plus, le typha et le roseau sont des plantes qui se multiplient principalement par rhizomes. En hiver les rhizomes restent dans le sol et au printemps, les plantes peuvent facilement se développer à nouveau. Le lotier, le paturin et l'inule sont des plantes de prairies peu adaptées aux conditions du site, c'est sans doute la raison pour laquelle elles ne poussent que dans les zones les plus sèches. La présence de ces plantes doit provenir de la dissémination de graines de zones avoisinantes se développant durant la période où le tarissement est le plus important.

Les plantes observées en janvier 2005 (Figure V.1) étaient complètement sèches sauf quelques joncs présents sur la zone B et sur les bords de la lagune.

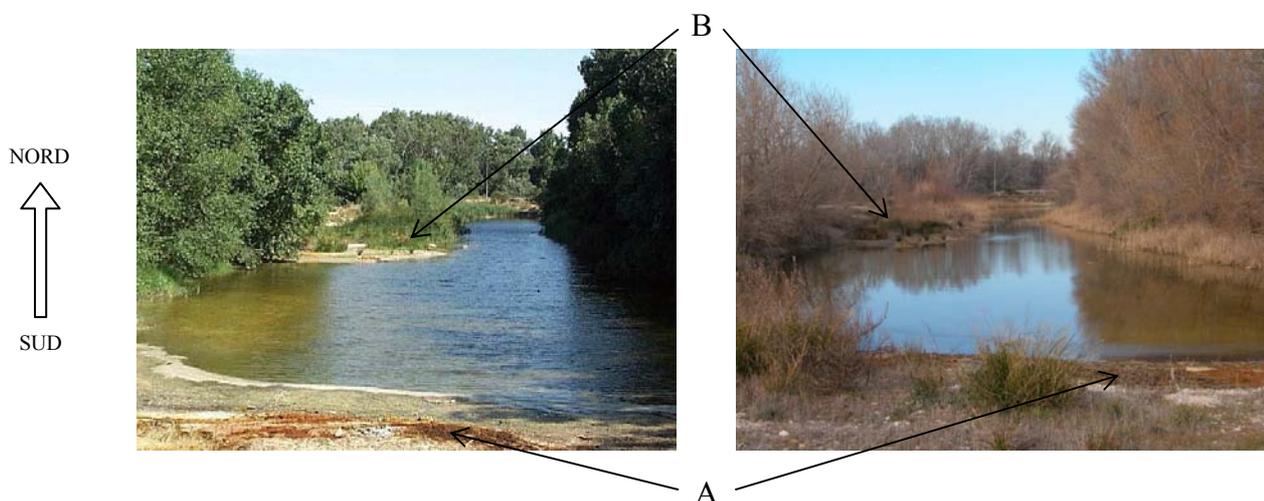


Figure V.1. Vues générales de la lagune sud réalisées en juillet 2004 (gauche) et en janvier 2005 (droite), vues depuis l'émissaire.

Toutes ces observations confirment l'orientation prise dans le choix des plantes lacustres testées en laboratoire pour leur capacité d'absorption et de transfert des explosifs.

V.2 Dosage du TNT et du RDX retrouvés dans les plantes récoltées sur le site

Des plantes ont été récoltées en juillet 2005. Cette récolte avait pour but de doser les explosifs susceptibles d'être présents dans ces plantes. Le dosage des extraits végétaux est effectué par spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS). Lors des études précédentes du métabolisme des explosifs (cf chapitre IV), le TNT

était totalement dégradé en composés réduits plus polaires, HADNT et ADNT et le RDX restait majoritairement présent sous forme de composé parent. Pour le dosage des explosifs dans les plantes, il faut doser le RDX, le TNT mais également les principaux métabolites du TNT, les ADNT. Toutefois, le spectromètre est sensible aux effets matrice ou aux phénomènes de suppression d'ions dus aux composés interférants pouvant être extraits et concentrés en même temps que les composés à doser. Ainsi, des mises au point préalables ont été nécessaires pour obtenir des échantillons suffisamment purifiés.

V.2.1 Protocole d'extraction et de purification des échantillons récoltés sur le site

Après récolte, les plantes sont lyophilisées puis homogénéisées au cours du broyage. L'extraction n'est ensuite réalisée que sur un gramme d'homogénat auquel est rajouté le RDX radiomarqué. La radioactivité permet de déterminer le rendement d'extraction et ne modifie pas significativement la quantité de RDX lors du dosage en spectrométrie de masse. Les extractions sont réalisées avec un mélange acétonitrile/eau (50/50, v/v). Les extraits sont ensuite purifiés par extraction en phase solide (SPE) sur des cartouches Oasis[®] (Waters). Les explosifs et leurs métabolites sont élués (acétonitrile/eau, 60/40, v/v) puis après séchage à l'évaporateur rotatif sous vide (Speed Vac, Thermo), ces éluats sont repris dans de l'eau. Après micro-filtration (0,45 µm), les échantillons sont analysés en LC-MS/MS. Cette méthode permet d'obtenir un rendement d'extraction satisfaisant supérieur à 50% qui est évalué pour chaque échantillon grâce au marqueur radioactif.

V.2.2 Méthode de dosage en LC/MS-MS

> Matériel utilisé

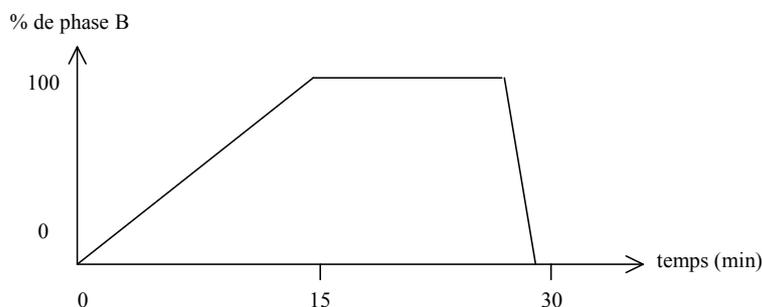
- CLHP Surveyor avec injecteur automatique (Thermo Electron)
- spectromètre de masse triple quadripôle, TSQ Quantum (Thermo Electron)
- système d'acquisition : Xcalibur (Thermo Electron)

> Conditions d'analyse retenues pour la LC-MS/MS

- colonne : Uptisphere C18-ODB, 5 µm, 250x2 mm (Interchim, Montluçon)
- débit : 0,2 ml/min
- volume injecté : 20 µl

- phase mobile : solvant A, eau/méthanol (90/10 ; v/v), solvant B, eau/méthanol (10/90 ; v/v). Dans les deux solvants, du NH_4Cl 0,05 mM est rajouté pour favoriser la formation d'adduits au RDX. Dans ces conditions, le RDX est détecté sous forme d'adduit $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ à m/z 257/259.

- gradient d'élution :



- température : 22°C

- source d'ionisation : électrospray en mode d'ionisation négatif (NI-ESI)

> Transitions utilisées en MS/MS

composé dosé	ion parent	énergie de collision (eV)	ion fragment
RDX	m/z 257 = $[\text{M}+\text{Cl}]^-$	14	m/z 46 = NO_2^-
TNT	m/z 226 = $[\text{M}+\text{H}]^-$	19	m/z 196 = $[\text{M}+\text{Cl}-\text{NO}]^-$
2-ADNT	m/z 196 = $[\text{M}+\text{H}]^-$	19	m/z 136 = $[\text{M}+\text{Cl}-2\text{NO}_2]^-$
4-ADNT	m/z 196 = $[\text{M}+\text{H}]^-$	19	m/z 149 = $[\text{M}+\text{Cl}-\text{HNO}_2]^-$

Tableau V.1. Fragments caractéristiques des composés étudiés en spectrométrie de masse.

Dans ces conditions, les temps de rétention des différents produits dosés sont les suivants : RDX, 14,5 min ; TNT, 17,6 min ; 4-ADNT, 17,8 min ; 2-ADNT, 18,0 min. L'imidaclopride, un insecticide (1-((6-Chloro-3-pyridinyl)méthyl)-n-nitro-2-imidazolidinimine), est utilisé comme standard interne, son temps de rétention est de 13,2 min.

> Etalonnage interne

La méthode de l'étalonnage interne est basée sur la comparaison des intensités du signal du soluté avec celui de l'étalon interne, l'imidaclopride. Cette méthode permet de s'affranchir des

sources d'erreurs, notamment les variations lors de l'injection de l'échantillon à doser ou les variations des conditions d'ionisation dans la source. L'étalon interne est rajouté en début d'analyse à la concentration de 0,5 ng/μl dans tous les échantillons et dans la gamme d'étalonnage.

La gamme étalon est réalisée avec le Mix A (Restek, Bellefonte, PA) qui est un mélange analytique commercial de plusieurs explosifs dont le RDX et le TNT (pureté 99%). Elle est composée de cinq solutions de concentrations respectives : 0,05 ; 0,1 ; 0,3 ; 0,5 et 0,75 ng/μL. Les courbes de calibration obtenues, à partir du rapport entre l'aire du pic de chaque soluté et l'aire du pic de l'étalon interne en fonction de la concentration, permettent de calculer la concentration en chaque soluté dans un extrait.

- Linéarité :

Les coefficients de régression linéaire (R^2 de 0,9812) traduisent une linéarité satisfaisante des courbes étalons de chaque soluté dans la gamme comprise entre 0,05 ng/l et 0,75 ng/μl.

- Répétabilité :

Une bonne répétabilité des résultats est observée aussi bien sur les temps de rétention que sur la mesure des rapports des aires des pics. Un coefficient de variation autour de 10 est obtenu pour tous les solutés pour trois injections répétées des solutions de calibration.

- Sensibilité :

La limite de détection a été déterminée à 0,02 ng/l pour le RDX (correspondant à un rapport signal sur bruit de 3) et la limite de quantification à 0,05 ng/l (rapport signal sur bruit de 10).

- Effets de matrice :

Deux surcharges sur des matrices réelles contaminées à 0,1 ng/μl et à 0,3 ng/μl ont été effectuées pour évaluer les effets de matrice. Les résultats obtenus montrent que les concentrations des matrices surchargées ne sont pas correctement déterminées par l'utilisation de la courbe étalon établie à partir des solutions de standards purs (Tableau V.2). En effet, l'équation de la courbe étalon obtenue pour le RDX à partir de la gamme d'étalonnage ($y = 20,52x + 1,81$) est différente de celle obtenue à partir des échantillons surchargés ($y = 26,24x + 0,04$). Compte tenu des effets de matrice, cette dernière équation est utilisée afin d'avoir une mesure plus exacte des concentrations de RDX dans chaque extrait.

	Concentration déterminée à partir de la gamme d'étalonnage				Concentration réelle de l'échantillon			
	RDX	TNT	2-ADNT	4-ADNT	RDX	TNT	2-ADNT	4-ADNT
échantillon contaminé	0,106	n. d.	n. d.	n. d.	-	-	-	-
échantillon + 0,1 ng/ μ l	0,229	0,084	0,074	0,069	0,206	0,1	0,1	0,1
échantillon + 0,3 ng/ μ l	0,488	0,302	0,328	0,285	0,406	0,3	0,3	0,3

Tableau V.2. Concentration en solutés calculée à partir de la courbe étalon sans matrice.

n.d. = non détectable

V.2.3 Dosage des échantillons récoltés sur le site

Nous avons dosé les explosifs dans des roseaux récoltés dans différentes zones du site (Figure V.2).

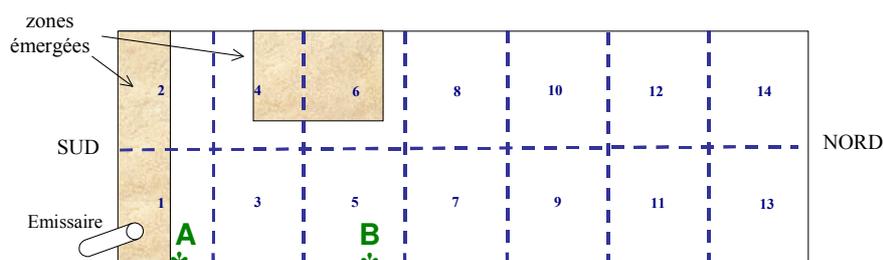


Figure V.2. Localisation des zones A et B de prélèvement des roseaux récoltés sur le site en juillet 2005.

Les dosages ont permis de déterminer les quantités d'explosifs et de métabolites dans différentes parties de roseaux récoltés en appliquant le rendement d'extraction obtenu pour chaque échantillon (Tableau V.3).

Zone de prélèvement	Parties échantillonnées	Quantités dosées ($\mu\text{g/g}$)			
		RDX	TNT	2-ADNT	4-ADNT
A	Feuille	22,4	n. d.	n. d.	n. d.
A	Rhizome	4	n. d.	n. d.	n. d.
B	Feuille	62,5	n. d.	n. d.	n. d.
B	Racine	32,5	n. d.	n. d.	n. d.

Tableau V.3. Dosage des solutés dans les échantillons récoltés sur le terrain.

n.d. = non détectable

L'observation des chromatogrammes montre que, dans les plantes recueillies, ni le TNT, ni ses métabolites ne sont détectés dans nos conditions d'analyse (Figure V.3). La méthode d'analyse n'a pas pu être mise en place avec une extraction en phase acide qui aurait permis d'obtenir un maximum d'ADNT dans les extraits. Le suivi du TNT à l'intérieur de la plante est très difficile à mettre en œuvre sans radioactivité à cause du métabolisme important après l'absorption.

Le RDX a été détecté mais les quantités sont nettement plus faibles que celles obtenues en laboratoire avec le roseau. Sur un sol fraîchement contaminé avec 500 mg de RDX par kg de sol, le roseau a accumulé 8 mg/g de RDX après huit semaines de culture. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence. Premièrement, la contamination du site est ancienne et hétérogène, les roseaux peuvent avoir été récoltés sur une zone peu contaminée où la quantité de RDX biodisponible est plus faible que dans l'expérimentation. Deuxièmement, les roseaux récoltés étaient localisés sur les pourtours de la lagune, la contamination pouvait être plus faible mais surtout, le roseau se développe grâce à ses rhizomes et s'étend sur de grandes surfaces. Il est possible que le roseau ait été récolté sur une zone contaminée mais que son système racinaire se soit développé dans une zone peu contaminée. Dernièrement, tous les dosages effectués par LISEC montrent que la contamination est localisée dans les 50 premiers centimètres de la lagune. Les plantes récoltées peuvent avoir développé un système racinaire dans des zones plus profondes et par conséquent moins contaminées.

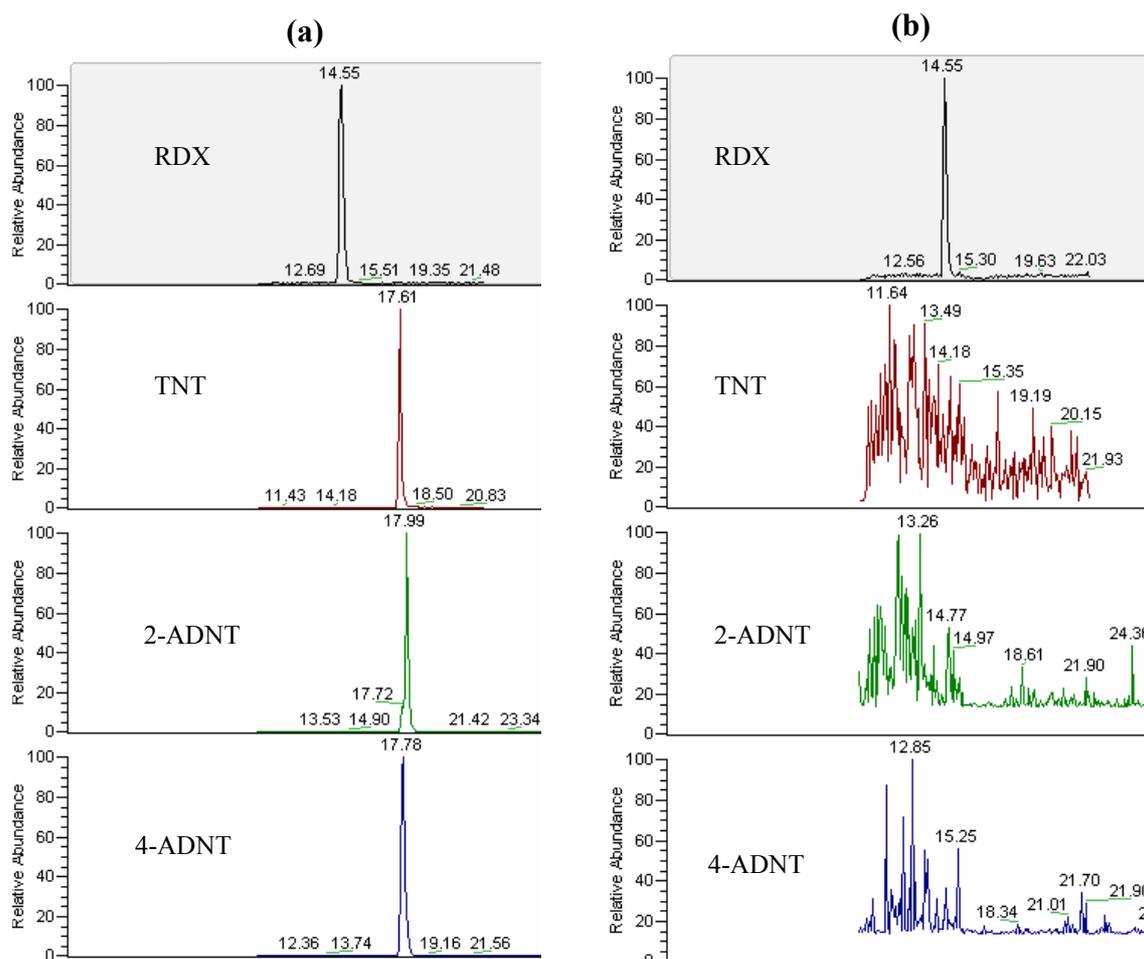


Figure V.3. Chromatogrammes d'ions obtenus en LC-MS/MS pour le RDX, le TNT, le 2-ADNT et le 4-ADNT. (a) Solution standard de Mix A à 0,75 ng/μl et (b) extrait purifié de feuille de roseau récoltée dans la zone A.

V.3 Expérimentations en laboratoire avec des sédiments recueillis sur le site

Des sédiments lagunaires ont été recueillis sur le site lors de la visite de juillet 2004. Les prélèvements ont été réalisés par carottage à différentes profondeurs. Les sédiments avec lesquels sont réalisés les tests, ont été récoltés en surface, entre 0 et 20 cm de profondeur, dans les secteurs 4 et 7 (numérotation selon le quadrillage réalisé par LISEC) (Figure V.4). Ils sont théoriquement hautement contaminés en explosifs mais aussi en herbicides.

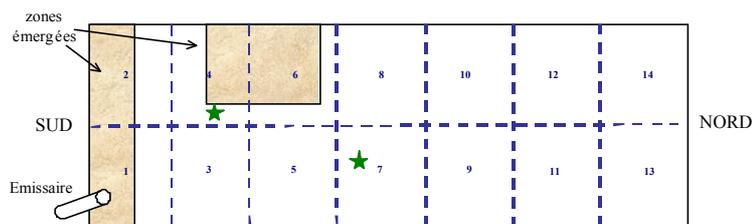


Figure V.4 Schéma représentant la lagune sud et la localisation des zones émergées et des prélèvements de sédiments (*). La numérotation des secteurs correspond à celle mise en place par LISEC pour les dosages préliminaires.

L'objectif des expérimentations réalisées à partir de ces sédiments est de vérifier s'il est possible de mettre en place un processus de phyto-dépollution sur le site. Les sédiments sont analysés pour mesurer la teneur en explosifs mais aussi pour déterminer la biodisponibilité des explosifs. Les tests de phytotoxicité des explosifs sont réalisés sur le riz, pour pouvoir ainsi comparer avec les résultats obtenus dans ceux des chapitres précédents.

V.3.1 Dosage des explosifs présents dans les sédiments

La contamination des sédiments récoltés a été mesurée par LISEC, les résultats sont présentés dans le tableau suivant (exprimés en mg.kg^{-1}) :

composé dosé	zone 4	zone 7
RDX	5550	23,6
TNT	5416	non détecté
dinosèbe	16172	5,5
dinoterbe	48112	25,5

Le sédiment de la zone 4 est théoriquement nettement plus contaminé en explosifs et en herbicides que celui de la zone 7. Cela s'explique par la position de ces zones par rapport à l'émissaire d'où se faisaient, anciennement, les rejets d'eaux usées. Pour la zone 4, les quantités d'explosifs sont supérieures à celles testées dans le chapitre II. Elles risquent d'inhiber la croissance des végétaux. Dans la zone 7, les concentrations en explosifs retrouvées ne semblent pas pouvoir inhiber la croissance du riz par rapport aux tests de phytotoxicité réalisés dans le chapitre II.

Pour confirmer les dosages réalisés par LISEC, nous avons réalisé des extractions avec des solvants (eau/acétonitrile ; 50/50) sur les sédiments des zones 4 et 7 pour déterminer le plus précisément possible les quantités d'explosifs présents. Les extraits ont été purifiés et dosés selon le même protocole que pour les extraits de plantes récoltées sur le terrain (cf V.2.1 et V.2.2). Les résultats obtenus sont les suivants :

composé dosé	zone 4	zone 7
RDX	10,9 mg/kg	7,6 mg/kg
TNT	n. d.	8 µg/kg

Les quantités sont différentes de celles obtenues par LISEC. Nous ne connaissons pas les méthodes de dosages utilisées par cette société. De plus, les zones sont très vastes (environ 625 m²), les prélèvements réalisés par LISEC et les nôtres peuvent être suffisamment éloignés pour expliquer ces différences. En effet, les quantités d'explosifs sont très hétérogènes au niveau des zones, cette hétérogénéité pouvant expliquer ces différences.

Ce dosage ne tient pas compte de la partie non extractible qui par définition n'est pas extractible, même avec des solvants. Cette fraction ne peut pas être dégradée par les plantes.

V.3.2 Biodisponibilité des explosifs dans les sédiments

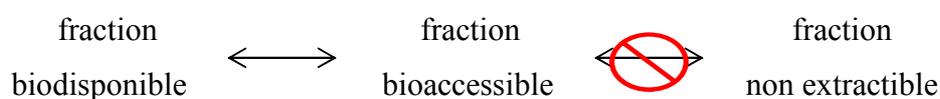
La biodisponibilité définit la fraction d'un composé pouvant être absorbée par un récepteur écologique. La norme ISO/CD 17402 (2005) présente une méthode pour mesurer la biodisponibilité des polluants pour la plante. Pour cela, il faut réaliser une extraction à l'eau. En effet, les plantes n'absorbent les composés organiques au niveau des racines que sous forme solubilisée dans la phase aqueuse du sol. Des extractions ont été réalisées en utilisant uniquement l'eau comme solvant avant de purifier les extraits et de les doser selon le même protocole que pour les extraits de plantes récoltées sur le terrain (cf V.2.1 et V.2.2).

Les résultats sont les suivants :

composé dosé	zone 4	zone 7
RDX	1,95 mg/kg	3,1 mg/kg
TNT	n. d.	n. d.

Les quantités biodisponibles sont de 2,5 à 5 fois plus faibles que les quantités dosées dans les sédiments après une extraction avec des solvants. La totalité du composé présent dans le sol n'est donc pas sous forme soluble. Cette étude confirme les précédentes observations réalisées par Alexander *et al.* (2000) concernant la diminution de la fraction disponible au cours du temps.

Cette méthode de dosage permet de définir la quantité d'explosif disponible pour les plantes au moment du dosage. Or, les composés organiques sont répartis sous différentes formes dans le sol : fraction biodisponible, fraction bioaccessible et la fraction non extractible (Mulvey et Stuckey, 2006).



La fraction bioaccessible, extractible avec des solvants, est une fraction qui peut devenir biodisponible en fonction du temps et des conditions. En cas d'épuisement de la fraction biodisponible, la fraction bioaccessible peut réalimenter cette fraction. Au cours du temps, elles pourront aussi absorber la fraction bioaccessible. La fraction non extractible ne peut pas devenir biodisponible ni bioaccessible.

V.3.3 Test de phytotoxicité des sédiments

Les sédiments séchés à l'air ont été mélangés avec du sable pour obtenir différentes dilutions de 0,25% à 8%. 20 grains de riz ont été mis à germer selon le même protocole que dans la publication 1 "*Phytotoxicity to and uptake of RDX by rice*". Après huit jours de culture, seuls les grains sur sol non contaminé ont germé. Quelle que soit la zone et même à la plus faible concentration, aucun grain n'a germé.

Les sédiments semblent donc très toxiques pour la germination du riz sans qu'il soit possible d'attribuer cette toxicité à un composé précis. L'implantation directe des végétaux par semis semble ainsi compromise. Toutefois, l'effet observé peut se limiter à l'inhibition de la germination comme observé précédemment avec le TNT (cf. chapitre II.1). C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé un test de phytotoxicité avec une prégermination des grains durant une semaine en nursery. Les sédiments ont été dilués de 0,1 à 8% dans du terreau acide et du sable moyen. Après huit semaines de cultures dans le sol contenant les sédiments, les plantes ont été récoltées et mesurées. L'effet des sédiments a été calculé en fonction de la

taille du témoin (Figure V.5). Dès 0,1%, une légère inhibition de croissance est observée pour les deux zones sédimentaires. A 1% de sédiments pour les deux zones, l'inhibition de croissance des plantes atteint 75% de la croissance du témoin. A partir de 2%, les plantes meurent rapidement après le repiquage dans le sol contaminé et aucune croissance n'est observée. Les sédiments récoltés sur les deux zones provoquent une inhibition de croissance sensiblement équivalente sauf pour le point à la dilution de 0,5%. Les sédiments semblent donc aussi toxiques pour la croissance des végétaux.

Les concentrations en explosifs retrouvées dans les sédiments sont plus faibles que les concentrations phytotoxiques déterminées dans le chapitre II (publications 1 et 2). De plus, aucun explosif n'avait d'effet sur la croissance sur 40 jours de culture. La toxicité observée dans les sédiments est certainement due à d'autres produits comme les herbicides qui semblent être présents. D'autres composés organiques présents dans les sédiments n'ont pas été identifiés, ils pourraient provenir de la synthèse des explosifs ou des herbicides. En effet, par exemple, lors de la synthèse du TNT, de grandes quantités d'eau sont nécessaires et ces eaux usées contenaient jusqu'à 30 composés additionnels (Comfort, 2006). Les eaux résultant de la fabrication des armes contenant du TNT et ces composés sont d'ailleurs appelées "pink water" à cause de leur coloration. De la même façon, pour la synthèse des autres composés, il pourrait y avoir de nombreux composés additionnels qui n'ont pas été dosés ou identifiés.

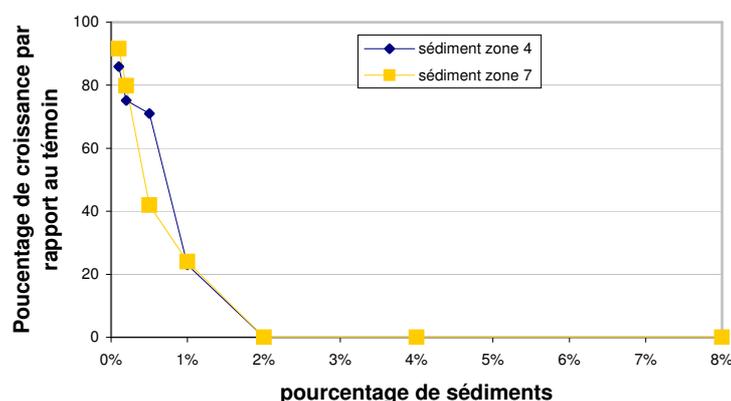


Figure V.5. Effet des différentes concentrations en sédiments sur la croissance durant 8 semaines après 1 semaine de prégermination sur sol non contaminé.

V.4 Discussion

Le site étudié est composé d'une lagune toujours immergée. Malgré les contaminations importantes par de multiples composés, une importante végétation se développe sur le pourtour de la zone immergée. D'autres plantes adaptées à des zones moins humides sont plus éloignées de la lagune.

L'analyse de roseaux récoltés sur le site montre que ces plantes ont absorbé et accumulé le RDX présent dans le site. Dans nos conditions d'analyse, le TNT et les ADNT étaient en dessous du seuil de détection. Toutefois, les faibles quantités d'explosifs absorbées par les roseaux récoltés sur le site peuvent être dues à l'hétérogénéité de la contamination dans les sédiments mais aussi à la biodisponibilité des explosifs. En effet, nous avons montré que, dans les sédiments récoltés dans les zones 4 et 7, plus de la moitié de la quantité de RDX bioaccessible (pouvant devenir biodisponible) n'était pas biodisponible.

Ces capacités d'absorption naturelle du RDX par les roseaux peuvent présenter un risque environnemental important. Si de grandes quantités de RDX sont retrouvées dans ces plantes et après la mort du végétal, il peut y avoir une dispersion du matériel dans l'environnement en dehors du périmètre contaminé. D'autre part, les végétaux contaminés peuvent aussi entrer dans les chaînes alimentaires en cas d'ingestion par des animaux car la zone n'est pas confinée.

Les tests de phytotoxicité réalisés à partir des sédiments récoltés dans les zones 4 et 7 montrent que l'implantation du riz sur le site nécessite une dilution des sédiments jusqu'à 1% de sédiments et une germination préalable des grains de riz sur un sol non contaminé. Ainsi, pour mettre en place cette technique sur ce site, il faudrait diluer les sédiments en asséchant la lagune. Dans ce cas, l'utilisation de plantes aquatiques ne serait plus indispensable. Il faudrait alors privilégier les plantes agronomiques ayant les meilleurs rendements d'extraction des explosifs. La phytotoxicité des sédiments est spécifique du site étudié et n'est pas liée à la présence des explosifs.

Ces études mettent en évidence les problèmes liés au passage des études en laboratoire à la mise en place de la phyto-dépollution *in situ*. Toutefois, elles ne peuvent pas être comparées avec d'autres études réalisées sur des sites contaminés car celles-ci concernaient les eaux contaminées et non les sédiments (Best *et al.*, 1999 ; Best *et al.*, 1997). Le problème de biodisponibilité des polluants n'était pas pris en compte puisque l'étude ne se faisait que sur la phase aqueuse.

DISCUSSION

GENERALE

Le type de plante testé ne modifie pas l'absorption et la distribution générales des deux explosifs. Par contre, les deux molécules ont un comportement opposé dans la plante. Le RDX est facilement absorbé et transféré vers les parties aériennes alors que le TNT, peu absorbé, reste localisé dans les racines. Le comportement de ce dernier est en contradiction avec celui attendu théoriquement selon sa lipophilie ($\log K_{ow}$) (Briggs *et al.*, 1982). En effet, les modèles décrivant les relations entre le $\log K_{ow}$ des molécules et leur absorption ou leur translocation prédisent une absorption et une translocation plus favorable pour le TNT que pour le RDX. Pour la translocation du TNT, ce phénomène peut s'expliquer par le métabolisme important du TNT déjà observé dans le cas d'autres molécules (Mc Farlane *et al.*, 1987). En effet, dès qu'il pénètre dans la plante, il est dégradé et les métabolites formés peuvent avoir un $\log K_{ow}$ inadéquat pour une translocation vers les parties aériennes. De plus, il y a une formation importante de résidus liés (supérieure à 70% de la quantité de radioactivité dans les racines) qui limite le transfert vers les parties aériennes. Par contre, une explication de la faible absorption racinaire du TNT semble plus à rechercher au niveau des équilibres physico-chimiques de la molécule avec les constituants du sol. De plus, dans le sol, le TNT pourrait être biodégradé en métabolites plus polaires ayant un $\log K_{ow}$ défavorable à une absorption.

Quel que soit l'explosif testé, l'efficacité de la dépollution semble dépendante de la concentration dans le sol. Or, l'absorption des composés organiques neutres est un mécanisme passif donc a priori proportionnel à la concentration dans le sol. Cette saturation de l'absorption pourrait être due à un phénomène de saturation de la phase aqueuse en composés pour les concentrations élevées dans le sol. La saturation apparaît à 1000 mg/kg pour le RDX et à 200 mg/kg pour le TNT. S'il s'agissait d'un phénomène de saturation de la phase aqueuse, il devrait être observé à des concentrations plus élevées pour le TNT que pour le RDX car le premier est trois fois plus soluble dans l'eau que le second. La faible absorption du TNT suggère que d'autres phénomènes entrent en jeu. La dépollution du site suivra une décroissance exponentielle et il faudra alors plusieurs rotations de culture pour parvenir à un niveau de contamination acceptable, dépendant de la réutilisation prévue pour le site.

Finalement, le RDX est absorbé par les plantes et accumulé sous forme parentale aux extrémités des parties aériennes. Dans le cas d'un processus de phyto-dépollution, une récolte

suivie d'une incinération doit être envisagée pour permettre de détruire le RDX et éviter une recontamination du site. Toutefois, une étude réalisée par Riefler (communication personnelle) semble montrer que le RDX associé au matériel végétal serait totalement dégradé après sept jours en mélangeant ces débris végétaux broyés à différents types de sols. Des résultats identiques ont été obtenus avec le TNT ce qui est cohérent avec la biodégradation directe du TNT dans le sol. De plus, après action des plantes, les explosifs seraient moins mobiles dans le sol en raison de leur liaison aux parois végétales. Ceci serait en accord avec la quantité importante de résidus non extractibles obtenus lors de nos expérimentations. Cette étude permettrait ainsi de proposer une alternative à l'incinération des végétaux qui reposerait sur une dégradation microbienne par compostage. Les plantes pourraient aussi être broyées *in situ* sur les sols avant d'être labourés. Dans les deux cas, la pollution resterait confinée sur le site et serait rapidement dégradée sans nécessiter d'incinération qui présente un risque pour l'environnement.

Les plantes testées ont des capacités d'absorption et d'accumulation des explosifs plus élevées que lors d'études précédentes réalisées en condition hydroponique, méthodes qui optimisent la biodisponibilité des composés mais qui limitent les taux d'absorption. Ces valeurs sont très encourageantes pour une utilisation des plantes *in situ*. Toutefois, toutes nos expérimentations permettant de déterminer l'efficacité de dépollution des différentes plantes testées ont été réalisées avec des sols reconstitués fraîchement contaminés. La biodisponibilité des explosifs est alors optimale car les phénomènes aboutissant à des composés inextractibles sont très longs à se mettre en place (Barriuso et Koskinen, 1996). Or, dans les sites pollués, l'ancienneté de la pollution modifie la distribution des polluants dans le sol et notamment la fraction restant disponible pour les plantes (Alexander, 2000). Au cours du temps, les contaminants se lient aux substances humiques et aux argiles du sol par l'intermédiaire de liaisons fortes. Une fraction non biodisponible reste accessible et est en équilibre avec la phase aqueuse, une autre partie est définitivement liée dans le sol et ne sera plus extractible. Sur le site étudié, une faible quantité de TNT a été détectée (8 µg/kg). Le RDX dosé était quant à lui présent en quantité plus importantes, jusqu'à 10,9 mg/kg mais la partie biodisponible ne représentait qu'un cinquième ou la moitié de cette fraction, en fonction de la zone de prélèvement. Nos dosages ne prennent pas en compte la fraction liée de façon irréversible aux constituants du sol. Lors d'une phyto-extraction, cette fraction ne sera jamais accessible aux végétaux et ne pourra donc pas être détruite. Une question se pose alors, cette fraction étant immobilisée dans le sol et non disponible pour les plantes,

représente-t-elle un risque pour la santé humaine et l'environnement suffisant pour nécessiter une action de décontamination ? En effet, ces constituants ne peuvent entrer dans la chaîne alimentaire que par l'intervention d'organismes comme les vers de terre ou par l'ingestion directe de sol ou de poussières. Ainsi, la réponse est fortement dépendante de l'utilisation ultérieure du site.

Outre cette notion de biodisponibilité des polluants, l'efficacité de la dépollution est strictement liée au site d'étude. Chaque site est différent par son histoire et par les conditions géoclimatiques et nécessite une expertise particulière pour permettre la mise en place *in situ* d'une dépollution efficace. En effet, le type de sol, les conditions météorologiques, la profondeur et l'âge de la contamination et les différents co-produits vont orienter le choix des plantes et modifier les capacités des plantes testées préalablement en laboratoire. En laboratoire, les plantes sont testées en conditions optimales de température, d'arrosage et sans présence de co-produits qui pourraient influencer sur les mécanismes d'absorption ou plus directement sur la survie des plantes.

Le rôle des plantes sur les explosifs ne se limite pas à une action directe d'accumulation et de dégradation. Elles permettent aussi l'immobilisation des composés dans les matrices végétales même après la mort de la plante et une activation de l'activité microbienne favorisant la biodégradation des explosifs. Ainsi, la phyto-dépollution d'un site contaminé par les deux explosifs, le RDX et le TNT, doit combiner plusieurs mécanismes où la plante intervient de manière directe ou indirecte : phyto-extraction, phyto-stabilisation et rhizo-dégradation. Dans la plupart des études, la phyto-extraction et la phyto-stabilisation sont envisagées principalement dans le cas des métaux lourds. Dans ce cas, la dégradation n'a pas une action suffisante pour les détoxifier ou les plantes ne sont pas capables d'absorber. L'action des plantes permet une immobilisation dans le sol.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

La dépollution des sites contaminés par des explosifs est une préoccupation majeure de nos sociétés soucieuses de restaurer la qualité de l'environnement. La pollution des sols par des composés organiques est actuellement traitée majoritairement par des méthodes physico-chimiques. Ces méthodes sont très coûteuses et engendrent des dégâts environnementaux importants sur le site et peuvent produire des gaz à effet de serre. La phyto-dépollution est une technique qui, mise en place *in situ*, respecte l'intégrité du site. Elle apparaît comme une technologie envisageable pour dépolluer les sols contaminés par les explosifs RDX et TNT. Nous avons ainsi testé les capacités de plantes agronomiques et de plantes lacustres pour absorber, accumuler ou dégrader ces explosifs.

Les plantes testées se sont révélées extrêmement tolérantes à de fortes concentrations en RDX proches de la saturation de la phase aqueuse du sol. Elles ont aussi été capables d'absorber de grandes quantités de RDX et d'en transférer une majeure partie vers leurs parties aériennes. En effet, jusqu'à 64,5 mg/g de poids sec est accumulé dans les parties aériennes du blé après 42 jours de culture sur sol contaminé. Malgré la capacité des plantes à croître sur des sols hautement contaminés en RDX, à long terme, des nécroses apparaissent aux extrémités des parties aériennes. Ce symptôme de phytotoxicité est préjudiciable dans le cas de culture de dicotylédone dont la chute des feuilles pourrait disperser la contamination. Le RDX n'étant pas métabolisé, une récolte ultérieure et une destruction de ces végétaux contaminés, par compostage ou incinération, est indispensable pour compléter le processus de dépollution. Le procédé envisagé pour cet explosif repose ainsi sur la phyto-extraction.

Lors de l'étude de phytotoxicité sur le riz, le TNT diminue les taux de germination mais n'a eu aucun effet au niveau de la croissance. Les plantes absorbent le TNT en quantité dix fois plus faible que le RDX. Elles le dégradent totalement et séquestrent la majorité des métabolites dans les racines principalement sous forme de résidus non extractibles. Ces résidus ne peuvent plus être dispersés par lessivage et pourraient être dégradés par les microorganismes du sol qui décomposent les macromolécules pariétales (la lignine et les polysaccharides). Dans le cas du TNT, le processus de phyto-dépollution engagé combine la phyto-dégradation et la phyto-stabilisation du composé. Les faibles quantités transférées dans les parties aériennes, jusqu'à 0,43 mg/g dans les parties aériennes du blé, ne permettent pas d'obtenir un processus de phyto-extraction efficace comme dans le cas du RDX.

Parmi les plantes testées, les plantes lacustres ont présenté des taux d'absorption et d'accumulation des explosifs moins élevés que les plantes d'intérêt agronomique. Pour une extraction sensiblement équivalente, le blé, produisant la plus faible quantité de biomasse à retraiter, est la plante cultivée la plus efficace particulièrement adaptée aux zones non humides. Le scirpe lacustre reste plus adapté aux zones lagunaires pour une même efficacité. Ces plantes peuvent donc être envisagées pour dépolluer des sols contaminés par le RDX et le TNT. Malgré sa plus faible efficacité, le riz est une plante dont le génome est très étudié. Une amélioration génétique est plus facilement envisageable pour augmenter la dégradation des explosifs.

Le site étudié, de type lagunaire, s'est révélé hautement contaminé par les explosifs étudiés mais aussi par des herbicides nitrés et d'autres composés organiques qui n'ont pas pu être tous identifiés. Cette contamination est un frein à la mise en place du procédé de phyto-dépollution car les sédiments recueillis sont très phytotoxiques pour le riz. La culture du riz a été possible sur les sédiments du site seulement après une dilution à 1% des sols et une prégermination du riz en nursery. Les sols devraient d'abord être dilués pour permettre l'implantation de végétaux dans les zones les plus polluées de la lagune. En conséquence, le coût de ce processus ne serait pas limité uniquement au coût de mise en culture des végétaux mais aussi aux moyens importants mis en œuvre pour rendre les sols fertiles par dilution. Dans un site de cette nature, les moyens techniques nécessaires pour la mise en place de la phyto-dépollution serait probablement aussi importants que pour l'excavation des sols et leur traitement physico-chimique. Toutefois, certaines plantes se développent en périphérie du site. Les plantes récoltées sur le site ne contenaient pas de TNT ni de métabolites mais elles avaient accumulé du RDX en quantité plus faible que lors des études en laboratoire. Cette différence est probablement due à une plus faible biodisponibilité des composés dans les sédiments de la lagune malgré une concentration totale dans les sédiments supérieure à celle des études en laboratoire.

La phyto-dépollution est une technologie d'ores et déjà envisageable pour diminuer la contamination du RDX. Elle présente de nombreux avantages pour la réhabilitation du site comme la restructuration et l'aération des sols et l'amélioration de la biodégradation. Les capacités importantes des plantes pour accumuler le RDX devraient permettre de limiter l'utilisation de méthodes *ex-situ* onéreuses et/ou polluantes pour l'environnement. La phyto-dépollution reste une méthode lente qui ne pourra être utilisée que dans les cas où la réutilisation des sites n'est pas urgente. La phyto-dépollution de sols contaminés par le TNT ne semble pas

une technique aussi efficace que pour le RDX. Elle ne permet pas de dépolluer efficacement le TNT du site mais peut permettre de le stabiliser en le stockant dans les racines ce qui limite sa dispersion et de favoriser sa biodégradation en développant l'activité microbienne. Cette technique devra être envisagée lorsqu'il n'y a pas de réutilisation envisagée du site. Le jour où ce sera le cas, une nouvelle étude de la contamination sera nécessaire pour connaître les niveaux de contamination.

Même si la phyto-dépollution est une technologie envisageable pour dépolluer les sols contaminés par les explosifs, certaines questions doivent être approfondies tant au niveau physiologique que pour la mise en place concrète sur un site.

Ainsi, l'absorption du TNT est plus faible que ce qui était espéré en théorie. Il peut y avoir un métabolisme du TNT dans le sol, les métabolites ainsi formés n'auraient pas un $\log K_{ow}$ optimal pour être absorbé par les plantes. Le métabolisme du TNT dans le sol sera étudié afin de déterminer quel composé est réellement absorbé par la plante. Ce métabolisme seul ne peut pas expliquer la faible absorption par les plantes, une étude en condition stérile permettra de vérifier la faible absorption du TNT en contradiction avec son $\log K_{ow}$ optimal. D'autre part, une étude sera menée dans les plantes entières pour connaître les voies métaboliques majoritaires et les métabolites finaux ainsi accumulés dans la plante. Les métabolites solubles pouvant être libérés dans l'environnement en cas de mort du végétal, il est essentiel de déterminer leur nature et leur toxicité. Parmi ceux-ci, les hydroxylamines peuvent être dimérisés en composé potentiellement cancérigènes. Ainsi, les plantes ayant un métabolisme qui forme des ADNT seront à privilégier pour limiter la formation de composés toxiques.

Le RDX ne semble pas métabolisé par les plantes. Des cultures de cellules de riz seront toutefois mises en place pour confirmer cette absence de dégradation dans un autre système cellulaire végétal. Dans le cas d'une utilisation de cultures cellulaires exprimant une enzyme bactérienne dégradant le RDX, il faudra étudier la dégradation du RDX pour éviter une accumulation de produit toxique dans les plantes transgéniques. Les résidus liés formés peuvent résulter d'une liaison covalente du RDX sous forme réactive (par exemple NO^+) aux parois ou d'une encapsulation dans les structures de celles-ci. Dans le cas d'une liaison covalente, le RDX serait alors dégradé en même temps que la matrice pariétale lors de sa dégradation par des micro-

organismes. Au contraire, s'il s'agit d'une encapsulation, le RDX serait libéré à nouveau dans le milieu en cas de dégradation de la matrice pariétale par des micro-organismes. Des cultures de plantes en conditions hydroponiques seront donc mises en place pour permettre l'étude des résidus liés avec des hydrolyses adaptées afin de connaître leurs mécanismes de formation.

Une étude récente a montré que les explosifs une fois absorbés par les plantes sont moins mobiles dans l'environnement et plus facilement dégradés dans le sol. Des études sur le compostage des végétaux ayant absorbé du RDX permettront d'envisager une alternative écologique et économique à l'incinération des végétaux à la fin de la culture pour détruire le RDX absorbé et non dégradé.

Dans le cas de sites contaminés depuis plusieurs années, les explosifs ne sont pas aussi disponibles pour la plante que dans le cas de sols fraîchement contaminés. Malgré les résultats encourageants d'absorption et de transfert du RDX obtenus en laboratoire, des études seront mises en places pour confirmer les capacités de ces plantes à dépolluer les explosifs en conditions proches de celles de terrain avec des sols anciennement contaminés et contenant de multiples contaminations. La biodisponibilité des explosifs sera alors limitée.

Pour le site étudié, d'autres dosages de plantes seront réalisés pour voir si toutes n'accumulent que de faibles quantités d'explosifs ou si celles qui ont des systèmes racinaires simples ont absorbé plus d'explosifs. Une autre méthode devra aussi être développée pour permettre le dosage des métabolites du TNT. Cette méthode sera mise au point en cultivant stérilement des plantes sur un sol contaminé avec du TNT radiomarqué pour une plus grande précision dans le dosage.

En conclusion, ces études complémentaires devraient permettre de mieux connaître les mécanismes d'absorption du TNT ou de formation des métabolites par les plantes afin d'orienter le choix des plantes dont le métabolisme n'aboutit pas à la formation de composés potentiellement cancérigènes. Elles devraient aussi permettre de connaître le métabolisme du RDX et les mécanismes qui entrent en jeu dans sa séquestration dans les parois végétales. Enfin, ces études permettront d'envisager la mise en place sur des sites des plantes les plus efficaces et les plus adaptées aux conditions de culture locales.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Adamia G, Ghoghoberidze M, Graves D, Khatisashvili G, Kvesitadze G, Lomidze E, Ugrekhelidze D and Zaalishvili G (2006) Absorption, distribution, and transformation of TNT in higher plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 136-145
- Adrian NR and Sutherland K (1998) RDX biodegradation by a methanogenic enrichment culture obtained from an explosives manufacturing wastewater treatment treatment plant. US Army Corps of Engineers
- Alexander M (2000) Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology* 34, 4259-4265
- Anderson TA, Kruger EL and Coasts JR (1994) Enhanced degradation of a mixture of three herbicides in the rhizosphere of a herbicide-tolerant plant. *Chemosphere* 28, 1551-1557
- Angerhofer RA, Davis G and Balezewski L (1986) Teratological assessment of trinitro-RDX in rats. United States Army Environmental Hygiene Agency. Aberdeen Proving Ground
- Arthur EL, Rice PJ, Anderson TA, Baladi SM, Henderson KLD and Coats JR (2005) Phytoremediation - An overview. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 109-122
- ATSDR (1995) Toxicological profile for 2,4,6-trinitrotoluene. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services. Washington, DC
- Aust SD (1995) Mechanisms of degradation by white rot fungi. *Environmental Health Perspectives* 103, 59-61
- Bachmann W and Sheehan JC (1949) A new method of preparing the high explosive RDX. *Journal of American Chemical Society* 71, 1842-1845
- Bailey HC, Spangford RJ, Javitz HS and Liu DH (1985) Toxicity of TNT wastewaters to aquatic organisms. SRI International. Menlo Park, CA
- Barriuso E and Koskinen WC (1996) Incorporating nonextractable atrazine residues into soil size fractions as a function of time. *Soil Science Society of America Journal* 60, 150-157
- Bentley RE, Dean JW, Ellis SJ, Hollister TA, LeBlanc GA, Sauter S and Sleight BH (1977) Laboratory evaluation of the toxicity of cyclotrimethylene trinitramine (RDX) to aquatic organisms. United States Army Medical Bioengineering Research and Development Laboratory. Fort Detrick, MD
- Best EPH, Zappi ME, Fredrickson HL, Sprecher SL, Larson SL and Ochman M (1997) Screening of aquatic and wetland species for phytoremediation of explosives-contaminated groundwater from the Iowa army ammunition plant. *Annals New York Academy of Sciences* 829, 179-194
- Best EPH, Sprecher SL, Larson SL, Fredrickson HL and Bader DF (1999) Environmental behavior of explosives in groundwater from the Milan Army ammunition plant in aquatic and wetland plant treatments. Uptake and fate of TNT and RDX in plants. *Chemosphere* 39, 2057-2072
- Best EPH, Geter KN, Tatem HE and Lane BK (2006) Effects, transfer, and fate of RDX from aged soil in plants and worms. *Chemosphere* 62, 616-625
- Bhadra R, Spangford RJ, Wayment DG, Hughes JB and Shanks JV (1999a) Characterization of oxidation products of TNT metabolism in aquatic phytoremediation of *Myriophyllum aquaticum*. *Environmental Science and Technology* 33, 3354-3361
- Bhadra R, Wayment DG, Hughes JB and V. SJ (1999b) Confirmation of conjugation processes during TNT metabolism by axenic plant roots. *Environmental Science and Technology* 33, 446-452
- Bhadra R, Wayment DG, Williams RK, Barman SN, Stone MB, Hughes JB and Shanks JV (2001) Studies on plant-mediated fate of the explosives RDX and HMX. *Chemosphere* 44, 1259-1264
- Blauboer BM (1996) Biotransformation: detoxication and bioactivation. In: *Toxicology: Principles and Applications*, M. A. Hollinger, eds (Boca Raton, Florida: CRC Press) pp. 41-61
- Briggs GG, Bromilow RH and Evans AA (1982) Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pesticide Science* 13, 495-504
- Broda P, Birch P, Brooks P, Copa-Patinio JL, Sinnott ML, Tempelaars C, Wang Q, Wyatt A and Sims P (1994) *Phanerochaete chrysosporium* and its natural substrate. *FEMS Microbiology Reviews* 13, 189-195

- Bromilow RH and Chamberlain K (1995) Principles governing uptake and transport of chemicals. In: Plant contamination - Modeling and stimulation of organic chemical processes, J. C. Mc Farlane, eds (Boca Raton, Florida: Lewis Publishers) pp. 38-68
- Burken JG and Schnoor JL (1998) Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environmental Science and Technology* 32, 3379-7785
- Cataldo DA, Harvey SD, Fellows RJ, Bean RM and McVetty BD (1989) An evaluation of the environmental fate and behavior of munitions materiel (TNT, RDX) in soil and plant systems. U. S. Army Medical Research and development Command. Fort Detrick, MD
- Celenza JL (2001) Metabolism of tyrosine and tryptophan - new genes for old pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 234-240
- Ciria MP, Solano ML and Soriano P (2005) Role of macrophytes *Typha latifolia* in a constructed wetland for wastewater treatment and assessment of its potential as a biomass fuel. *Biosystems Engineering* 92, 535-544
- Comfort S (2006) Remediating RDX and HMX contaminated soil and water. In: Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystems, eds: pp. 263-310
- Corgie SC, Beguiristain T and Leyval C (2004) Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3552-3557
- Davis LC, Erickson LE, Narayanan M and Zhang Q (2003) Modeling and design of phytoremediation. In: Phytoremediation - Transformation and control of contaminants, J. L. Schnoor, eds (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons) pp. 663-694
- Dilley JV, Tyson CA, Spanggord RJ, Sasmore DP, Newell GW and Dacre JC (1982) Short-term oral toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene in mice, rats and dogs. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 9, 565-585
- Esteve-Núñez A, Caballero A and Ramos JL (2001) Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 335-352
- Fernando T, Bumpus JA and Aust SD (1990) Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1666-1671
- French CE, Rosser SJ, Davies GJ, Nicklin S and Bruce NC (1999) Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *Nature Biotechnology* 17, 491-495
- George SE, Huggins-Clark G and Brooks LR (2001) Use of a *Salmonella* microsuspension bioassay to detect the mutagenicity of munitions compounds at low concentrations. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 490, 45-56
- Gogal RM, Johnson MS, Larsen CT, Prater MR, Duncan RB, Ward DL, Lee RB, Salice CJ, Jortner B and Holladay SD (2003) Dietary oral exposure to 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine in the northern bobwhite (*Colinus virginianus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 381-387
- Gong P, Hawari J, Thiboutot S, Ampleman G and Sunahara GI (2001) Ecotoxicological effects of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine on soil microbial activities. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 947-951
- Görge E, Brandt S and Werner D (1994) Uptake and metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene in higher plants. *Environmental Science and Pollution Research* 1, 229-233
- Hart ER (1976) Two-year feeding study in rats. Litton Bionetics. Kensington, MD
- Harvey SD, Fellows RJ, Cataldo DA and Bean RM (1990) Analysis of 2,4,6-trinitrotoluene and its transformation products in soils and plant tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 518, 361-374
- Harvey SD, Fellows RJ, Cataldo DA and Bean RM (1991) Fate of the explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in soil and bioaccumulation in bush bean hydroponic plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 845-855
- Hawari J, Beaudet S, Halasz A, Thiboutot S and Ampleman G (2000) Microbial Degradation of explosives: biotransformation versus mineralization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 605-618

- Honeycutt ME, Jarvis AS and MacFarland VA (1996) Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35, 282-287
- Hooker BS and Skeen RS (1999) Transgenic phytoremediation blasts onto the scene. *Nature Biotechnology* 17, 428
- Hughes JB, Shanks J, Vanderford M, Lauritzen J and Bhadra R (1997) Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. *Environmental Science and Technology* 31, 266-271
- Hughes JB, Wang CY, Bhadra R, Richardson A, Bennett GN and Rudolph FB (1998) Reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum* through hydroxylamino-nitrotoluene intermediates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 343-348
- Humphrey SB and Smoak DR (1960) Procédés de nitration d'hydrocarbures aromatiques. Brevet d'invention 1.213.939
- ISO/CD 17402 (2005) Soil quality - Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. Delft, Netherlands
- Jeffers PM, Wolfe NL and Nzengung V (1998) Green plants: A terrestrial sink for atmospheric CH₃Br. *Geophysical Research Letters* 25, 43-46
- Johnson MS, Paulus HI, Salice CJ, Checkai RT and Simini M (2004) Toxicologic and histopathologic response of the terrestrial salamander *Plethodon cinereus* to soil exposures of 1,3,5-trinitrohexahydro-1,3,5-triazine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47, 496-501
- Just CL and Schnoor JL (2004) Photophotolysis of Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in leaves of Reed Canary Grass. *Environmental Science & Technology* 38, 290-295
- Karavangeli M, Labrou NE, Clonis YD and Tsaftaris A (2005) Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. *Biomolecular Engineering* 22, 121-128
- Katagi T and Mikami N (2000) Primary metabolism of agrochemicals in plants. In: *Metabolism of agrochemicals in plants*, T. Roberts, eds (Harrogate: John Wiley & Sons, Ltd) pp. 43-106
- Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa H and Ohkawa Y (2006) Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2985-2991
- Kim J, Drew MC and Corapcioglu MY (2004) Uptake and phytotoxicity of TNT in onion plant. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 39, 803-819
- Koehler H, Warrelmann J, Frische T, Behrend P and Walter U (2002) In situ phytoremediation of TNT-contaminated soil. *Acta Biotechnologica* 22, 67-80
- Komives T and Gullner G (2000) Phytoremediation. In: *Plant-environment interactions*, R. E. Wilkinson, eds (New York: Marcel Dekker, Inc.) pp. 437-452
- Komives T and Gullner G (2005) Phase I xenobiotic metabolic systems in plants. *Zeitschrift fur Naturforschung* 60, 179-185
- Komoßa D, Langebartels C and Sandermann H (1995) Metabolic processes for organic chemicals in plants. In: *Plant contamination - Modeling and stimulation of organic chemical processes*, J. C. Mc Farlane, eds (Boca Raton, Florida: Lewis Publishers) pp. 69-106
- Kroes R, Renwick AG, Cheeseman M, Kleiner J, Mangelsdorf I, Piersma A, Schilter B, Schlatter J, van Schothorst F, Vos JG and Wurtzen G (2004) Structure-based threshold of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in diet. *Food Chemistry Toxicology* 42, 65-83
- Kurumata M, Takahashi M, Sakamoto A, Ramos JL, Nepovim A, Vanek T, Hirata T and Morikawa H (2005) Tolerance to, and uptake and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) are enhanced by the expression of a bacterial nitroreductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 60, 272-278
- Larson SL (1997) Fate of explosive contaminants in plants. *Annals New York Academy of Sciences* 829, 195-201

- Larson SL, Jones RP, Escalon L and Parker D (1999) Classification of explosives transformation products in plant tissue. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1270-1276
- Lee SY and Brodman BW (2004) Biodegradation of 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX). *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 39, 61-75
- Liu DH, Spangford RJ, Bailey HC, Javitz HS and Jones DCL (1983) Toxicity of TNT wastewaters to aquatic organisms. SRI International. Menlo Park, CA
- Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ and McGrath SP (2001) Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality* 30, 1919-1926
- Lucero ME, Mueller W, Hubstenberger J, Phillips GC and O'Connell MA (1999) Tolerance to nitrogenous explosives and metabolism of TNT by cell suspensions of *Datura innoxia*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 35, 480-486
- Makris KC, Shakya KM, Datta R, Sarkar D and Pachanoor D (2006) High uptake of 2,4,6-trinitrotoluene by vetiver grass - Potential for phytoremediation? *Environmental Pollution* In Press, Corrected Proof
- Marmioli N and Mc Cutcheon SC (2003) Making phytoremediation a successful technology. In: *Phytoremediation - Transformation and control of contaminants*, J. L. Schnoor, eds (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons) pp. 663-694
- Mathew R, Kacew S and Khan SU (1998) Bioavailability in rats of bound residues from tolerant or susceptible varieties of soybean and canola treated with metribuzin or atrazine. *Chemosphere* 36, 589-596
- Mc Farlane JC, Pfleeger T and Fletcher J (1987) Transpiration effect on the uptake and distribution of bromacil, nitrobenzene, and phenol in soybean plants. *Journal of Environmental Quality* 16, 372-384
- Mc Farlane JC (1995) Anatomy and physiology of plant conductive systems. In: *Plant contamination - Modeling and stimulation of organic chemical processes*, Mc Farlane JC, eds (Boca Raton, Florida: Lewis Publishers) pp. 38-68
- McCutcheon SC and Schnoor JL (2003) Overview of phytotransformation and control of wastes. In: *Phytoremediation - Transformation and control of contaminants*, McCutcheon SC and Schnoor JL, eds (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons) pp. 3-58
- Meagher RB (2001) Pink water, green plants and pink elephants. *Nature Biotechnology* 19, 1120-1121
- Meagher RB and Heaton ACP (2005) Strategies for the engineered phytoremediation of toxic element pollution: mercury and arsenic. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 32, 502-513
- Medina VF, Jeffers PM, Larson SL and Perez W (2000a) Sterilisation of plants for phytoremediation studies by bleach treatment. *International Journal of Phytoremediation* 2, 287-295
- Medina VF, Larson SL, Bergstedt AE and Mc Cutcheon SC (2000b) Phytoremoval of trinitrotoluene from water with batch kinetic studies. *Water Research* 34, 2713-2722
- Mukhi S, Pan X, Cobb GP and Patino R (2005) Toxicity of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine to larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 61, 178-185
- Mulvey P and Stuckey M. Using source identification and fingerprinting to assess bioavailability changes with time during bioremediation. Conference: Bioavailability of pollutants and soil remediation, september 10-13, 2006. Sevilla, Spain
- Negri MC, Gatliff EG, Quinn JJ and Hinchman RR (2003) Root development and rooting at depths. In: *Phytoremediation - Transformation and control of contaminants*, McCutcheon SC and Schnoor JL, eds (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons) pp. 663-694
- Nepovim A, Hebner A, Soudek P, Gerth A, Thomas H, Smrcek S and Vanek T (2005) Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by selected helophytes. *Chemosphere* 60, 1454-1461
- Newman LA and Reynolds CM (2005) Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology* 23, 6-8

- Oh BT, Shea PJ, Drijber RA, Vasilyeva GK and Sarath G (2003) TNT biotransformation and detoxification by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Biodegradation* 14, 309-319
- Oh SY, Cha DK, Chiu PC and Kim BJ (2004) Conceptual comparison of pink water treatment technologies: granular activated carbon, anaerobic fluidized bed, and zero-valent iron-Fenton process. *Water Science and Technology* 49, 129-136
- Oliveira RS, Dodd JC and Castro PML (2001) The mycorrhizal status of *Phragmites australis* in several polluted soils and sediments of an industrialised region of Northern Portugal. *Mycorrhiza* 10, 241-247
- Palazzo AJ and Leggett D (1986) Effect and disposition of TNT in a terrestrial plant. *Journal of Environmental Quality* 15, 49-52
- Parmelee RW, Wentsel RS, Phillips CT, Simini M and Checkai RT (1993) Soil microcosm for testing the effects of chemical pollutants on soil fauna communities and trophic structure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 1477-1486
- Pavlostathis SG, Comstock KK, Jacobson ME and Saunders FM (1998) Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by the aquatic plant *Myriophyllum spicatum*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 2266-2273
- Peterson MM, Horst GL, Shea PJ, Comfort SD and Peterson RKD (1996) TNT and 4-amino-2,6-dinitrotoluene influence on germination and early seedling development of tall fescue. *Environmental Pollution* 93, 57-62
- Peuke AD and Rennenberg H (2005) Phytoremediation with transgenic trees. *Zeitschrift fur Naturforschung* 60c, 199-207
- Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56, 15-39
- Price RA, Pennington JC, Larson SL, Neumann D and Hayes CA (2002) Uptake of RDX and TNT by agronomic plants. *Soil and Sediment Contamination* 11, 307-326
- Priestley J, Coleman N and Duxbury T (2006) Growth rate and nutrient limitation affect the transport of *Rhodococcus* sp. strain DN22 through sand. *Biodegradation* In press, 1-6
- Ramos JL, Gonzalez-Perez MM, Caballero A and van Dillewijn P (2005) Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 275-281
- Rao AS (1990) Root flavonoids. *Botanical Review* 56, 1-84
- Rivera R, Medina VF, Larson SL and McCutcheon SC (1998) Phytotreatment of TNT-contaminated groundwater. *Journal of Soil Contamination* 7, 511-529
- Robidoux PY, Hawari J, Bardai G, Paquet L, Ampleman G, Thiboutot S and Sunahara GI (2002) TNT, RDX, and HMX decrease earthworm (*Eisenia andrei*) life-cycle responses in a spiked natural forest soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 379-388
- Robidoux PY, Bardai G, Paquet L, Ampleman G, Thiboutot S, Hawari J and Sunahara GI (2003) Phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in spiked artificial and natural forest soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 198-209
- Russelle MP, Lamb JFS, Montgomery BR, Elsenheimer DW, Miller BS and Vance CP (2001) Alfalfa rapidly remediates excess inorganic nitrogen at a fertilizer spill site. *Journal of Environmental Quality* 30, 30-36
- Rylott EL, Jackson RG, Edwards J, Womack GL, Seth-Smith HMB, Rathbone DA, Strand SE and Bruce NC (2006) An explosive-degrading cytochrome P450 activity and its targeted application for the phytoremediation of RDX. *Nature Biotechnology* 24, 216-219
- Sanderemann H, Scheel D and von der Trenck T (1983) Metabolism of environmental chemicals by plants-- Copolymerization into lignin. *Journal of Applied Polymer Science : Applied Polymer Symposium* 37, 407-420
- Sanderemann H (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* 17, 82-84
- Sanderemann H (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics; the "green liver" concept. *Pharmacogenetics* 4, 225-241

- Scheidemann P, Klunk A, Sens C and Werner D (1998) Species dependant uptake and tolerance of nitroaromatic compounds by higher plants. *Journal of Plant Physiology* 152, 242-247
- Schneider NR, Bradley SL and Anderson ME (1978) The distribution and metabolism of cyclotrimethylenetrinitramine (RDX) in the rat after subchronic administration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 46, 163-171
- Schoenmuth BW and Pestemer W (2004) Dendroremediation of trinitrotoluene (TNT) - Part 1: Literature overview and research concept. *Environmental Science and Pollution Research* 11, 273-278
- Sens C, Scheidemann P and Werner D (1999) The distribution of ¹⁴C-TNT in different biochemical compartments of the monocotyledonous *Triticum aestivum*. *Environmental Pollution* 104, 113-119
- Sheremata TW and Hawari J (2000) Mineralization of RDX by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* to carbon dioxide and nitrous oxide. *Environmental Science & Technology* 34, 3384-3388
- Siegel L (2004) A stakeholder's guide to munitions response. Center for Public Environmental Oversight.
- Simini M, Rowland R, Lee EH and Wentsel RW. Detection of stress in *Cucumis sativus* exposed to RDX using chlorophyll fluorescence. Conference: 13th Annual Meeting, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, november 8-12, 1992. Cincinnati, OH
- Smock LA, Stoneburner DL and Clark JR (1976) The toxic effects of trinitrotoluene (TNT) and its primary degradation products on two species of algae and the fathead minnow. *Water Research* 10, 537-543
- Snellinx Z, Nepovim A, Taghavi S, Vangronsveld J, Vanek T and van der Lelie D (2002) Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. *Environmental Science and Pollution Research* 9, 48-61
- Spanggord RJ, Gibson BW, Keck RG and Thomas DW (1982) Effluent analysis of wastewater generated in the manufacture of 2,4,6-trinitrotoluene. 1. Characterization study. *Environmental Science and Technology* 16, 229-232
- Subramanian M and Shanks JV (2003) Role of plant in the transformation of explosives. In: *Phytoremediation: transformation and control of contaminants*, McCutcheon SC and Schnoor JL, eds (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons) pp. 389-408
- Sun WHH, Lo JB, Robert FM, Ray C and Tang CS (2004) Phytoremediation of petroleum hydrocarbons in tropical coastal soils - I. Selection of promising woody plants. *Environmental Science and Pollution Research* 11, 260-266
- Suresh B and Ravishankar GA (2004) Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical Reviews in Biotechnology* 24, 97-124
- Susarla S, Medina VF and McCutcheon SC (2002) Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18, 647-658
- Talmage SS, Opresko DM, Maxwell CJ, Welsh CJE, Cretella FM, Reno PH and Daniel FB (1999) Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 161, 1-156
- Thompson PL and Schnoor JL. Phytoremediation of munitions (RDX, TNT) waste by hybrid poplar. Conference: ACS National meeting, 1997. San Fransisco
- Thompson PL, Ramer LA and Schnoor JL (1998) Uptake and transformation of TNT by hybrid poplar trees. *Environmental Science and Technology* 32, 975-980
- Thompson PL, Ramer LA and Schnoor JL (1999) Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine translocation in poplar trees. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 279-284
- Thorne PG (1999) Fate of explosives in plant tissues contaminated during phytoremediation. US Army Corps of Engineers
- Timbrell JA (1982) Principles of biochemical toxicology. Taylor and Francis Ltd, eds
- U.S. Environmental Protection Agency. Washington, D.C.
- USEPA (1993a) IRIS : Hexahydro-1,3,5-trinitro-,1,3,5-triazine (RDX). Office of Health and Environmental Assessment. Cincinnati, OH

- USEPA (1993b) IRIS: 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Office of Health and Environmental Assessment. Cincinnati, OH
- USEPA (1996) Clean up the Nation's waste sites: markets and technology trends. Office of Solid Waste and Emergency Response
- Van Aken B, Yoon JM and Schnoor JL (2004b) Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, an octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *Applied and Environmental Microbiology* 70, 508-517
- Van Aken B, Yoon JM, Just CL and Schnoor JL (2004a) Metabolism and mineralisation of Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine inside poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN-34). *Environmental Science & Technology* 38, 4572-4579
- Vanderford M, Shanks JV and Hughes JB (1997) Phytotransformation of trinitrotoluene (TNT) and distribution of metabolic products in *Myriophyllum aquaticum*. *Biotechnology Letters* 19, 277-280
- Vidali M (2001) Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* 73, 1163-1172
- Von der Trenck KT, Hunkler D and Sandermann H (1981) Incorporation of chlorinated anilines into lignine. *Zeitschrift fur Naturforschung* 36, 714-720
- Wang C, Lyon DY, Hughes JB and Bennett GN (2003) Role of hydroxylamine intermediates in the phytotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Myriophyllum aquaticum*. *Environmental Science and Technology* 37, 3595-3600
- Wang L, Samac DA, Shapir N, Wackett LP, Vance CP, Olszewski NE and Sadowsky MJ (2005) Biodegradation of atrazine in transgenic plants expressing a modified bacterial atrazine chlorohydrolase (*atzA*) gene. *Plant Biotechnology Journal* 3, 475-486
- Wayment DG, Bhadra R, Lauritzen J, Hughes JB and Shanks J (1999) A transient study of formation of conjugates during TNT metabolism by plant tissues. *International Journal of Phytoremediation* 1, 227-239
- Winfield LE, Rodgers JH and D'Surney SJ (2004) The responses of selected terrestrial plants to short (< 12 days) and long term (2, 4 and 6 weeks) hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) exposure. Part I: Growth and developmental effects. *Ecotoxicology* 13, 335-347
- Yoon JM, Van Aken B and Schnoor JL (2006) Leaching of contaminated leaves following uptake and phytoremediation of RDX, HMX, and TNT by poplar. *International Journal of Phytoremediation* 8, 81-94
- Yu XZ and Gu JD (2006) Uptake, metabolism, and toxicity of methyl tert-butyl ether (MTBE) in weeping willows. *Journal of Hazardous Materials* In Press
- Zalko D, Bories G and Tulliez J (1998) Metabolic fate of clenbuterol in calves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1935-1943

Résumé

Les plantes sont capables d'absorber, d'accumuler et de dégrader des polluants organiques. La phyto-dépollution est une technologie envisagée pour dépolluer les sols contaminés par des explosifs nitrés tels que l'hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) et le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT). Nous avons étudié les capacités de plantes agronomiques et de plantes lacustres à tolérer, absorber et accumuler ces explosifs en reconstituant des sols artificiels contaminés avec ces composés. Plus particulièrement, nous avons testé la phytotoxicité de ces explosifs pour le riz. Des effets sur la germination sont observés avec le TNT. Celui-ci est très peu absorbé par les plantes, moins de 3 mg/g dans les racines de blé. Seulement une faible partie, inférieure à 25%, est transférée vers les parties aériennes. Des études sur des cultures cellulaires ont permis de mettre en évidence les principales voies métaboliques de dégradation du TNT, par réduction puis conjugaison à un ou deux sucres en C6. Les seuls symptômes observés avec le RDX sont des nécroses sur aux extrémités des parties aériennes. Les plantes agronomiques ont absorbé et accumulé dans les parties aériennes de plus grandes quantités de RDX, jusqu'à 64,5 mg/g chez le blé, que les plantes lacustres, jusqu'à 33 mg/g chez le scirpe lacustre. Quelles que soient les plantes plus de 80% sont transférés vers les parties aériennes. L'absence de dégradation du RDX a aussi été mise en évidence, mettant l'accent sur un piégeage direct du RDX dans la matrice pariétale. L'utilisation de végétaux est donc envisageable pour le RDX mais elle va nécessiter une récolte suivie d'une incinération des plantes pour détruire la pollution.

L'étude d'un site contaminé a permis d'observer l'implantation de la végétation et de mesurer la capacité des plantes endogènes à absorber les explosifs. Cette étude a mis en évidence les difficultés liées à la biodisponibilité des explosifs dans le sol et à la présence de co-contaminants qui pourraient limiter l'implantation de végétaux.

Mots clés : Phyto-dépollution, RDX, TNT, plantes agronomiques, plantes lacustres, métabolisme

Summary

Production of explosives, TNT and RDX, had led to multiple and heterogeneous contaminated sites. Phytoremediation is an emerging strategy in which plants will uptake, degrade and/or accumulate pollutants. To detoxify contaminated sites, plants must be able to grow on. Although TNT decreased germination rate and necrotic symptoms were observed with RDX, explosives did not decrease growth of rice at concentrations of over than 500 mg/kg. We tested the ability of agronomic and aquatic plants to uptake and to accumulate explosives. More than 80% of RDX was accumulated in aerial parts without degradation, up to 64.5 mg/g. TNT was mainly located in roots and less than 25% of uptaken TNT was translocated to aerial parts. Aquatic plants uptook lower quantities of explosives but the distribution within the plant is the same for each explosive.

We studied the metabolism of TNT and RDX in tobacco cell suspension culture. It evidenced a rapid reduction and conjugation of TNT with formation of hydroxylamines and amines conjugated to glucose.

Quantification of explosives in plants harvested in a contaminated site showed that TNT or metabolites were not found in plants but RDX was detected in lower quantities than in our laboratory experiments. Moreover, site sediments were toxic to rice, then we mixed sediment with non contaminated soil to decrease phytotoxicity. In-situ tests are necessary to determine efficiency of phytoremediation on soil from contaminated site, due to the low bioavailability of explosives and to the presence of co-contaminants.

Keywords: Phytoremediation, RDX, TNT, crop plants, aquatic plants, metabolism