

N° d'ordre :.....

Thèse
présentée

pour obtenir

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

École doctorale TRANSFERTS, DYNAMIQUE DES FLUIDES, ENERGETIQUE ET PROCEDES
(TYFEP)

Spécialité : Sciences des agro-ressources

Par **Nathalie LUCAS**

**Etude et mise au point d'une nouvelle méthode
d'évaluation de la bioassimilation : utilisation des
isotopes stables du carbone pour le marquage de la
biomasse microbienne**

Soutenue le 24 Octobre 2007 devant le jury composé de :

Mme BELLON-MAUREL Véronique	Rapporteur
Mme RECOUS Sylvie	Rapporteur
Mme SILVESTRE Françoise	Directeur de thèse
Mme QUENEUDEC t'KINT Michèle	Directeur de thèse
M. NAVA-SAUCEDO José-Edmundo	Membre
M. BELLOY Christian	Membre
M. BEWA Hilaire	Membre
M. FRANCE-LANORD Christian	Membre
M. GARCIA-DIAZ Eric	Membre invité

Remerciements

Je tiens à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail et en particulier Véronique BELLON-MAUREL et Sylvie RECOUS pour leurs précieux conseils.

Merci à Françoise SILVESTRE et Michèle QUENEUDEC t'KINT d'avoir accepté de diriger cette thèse, de m'avoir fait confiance et m'avoir encouragée à allier les différentes disciplines qui font la richesse de cette thèse.

Merci à l'Agence De l'Environnement et la Maîtrise de l'Energie (ADEME) pour avoir financé ce travail, et plus particulièrement à Hilaire BEWA pour son soutien permanent et ses conseils.

Merci à Agro-industrie Recherches et Développements (ARD) pour avoir accepté de cofinancer cette thèse. Je tiens à remercier particulièrement Frédéric MARTEL pour avoir défendu ce projet auprès de M. Le Henaff et Christian BELLOY pour son soutien quotidien.

Merci à l'équipe Ingénierie des Matériaux du Laboratoire des Technologies Innovantes, aux équipes Chimie, Analytique et Environnement d'ARD, au Museum National d'Histoire Naturelle et plus particulièrement à Mme Dupont, au groupe industriel qui souhaite conserver l'anonymat (merci à KR et NL) d'avoir répondu favorablement lorsque nous vous avons sollicité.

Merci au Laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire et en particulier Jean-Noël Barbotin de m'avoir accueillie pour effectuer toutes les expérimentations microbiologiques et les observations macro et microscopiques.

Merci au Centre de Recherche Pétrographique et Géologique. Merci à Christian FRANCE-LANORD d'avoir répondu favorablement à notre sollicitation, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire des isotopes stables et pour tous ses conseils. Merci également à Caroline GUILLEMETTE pour avoir pris le temps de me former à l'analyse isotopique.

Merci au Laboratoire de Réactivité et Chimie du Solide, notamment Bernard BEAUDOIN pour les observations au microscope électronique.

Merci à Sylvain, Guillaume, l'équipe fractionnement d'ARD, Blaise, Pablo, Brice, Jevgenij, Moody, Saïd, Abdelghani, Nemer et bien d'autres encore d'avoir travaillé à mes côtés et de m'avoir supporté.

Pour finir mais non les moindre, MERCI aux deux facteurs de croissance de cette thèse :

à Edmundo pour ton aide quotidienne, pour tes critiques scientifiques, pour l'ensemble de nos discussions dont certaines dépassaient le cadre de la thèse. Merci d'avoir toujours été présent et d'avoir mis tes compétences pluridisciplinaires au service de cette thèse.

à Christophe, l'initiateur de ce projet. Spontanément, tu as su percevoir l'intérêt, la pertinence et l'innovation de cette méthode ainsi que mes capacités à réussir ce projet. Merci de la confiance pour deux en moi. Merci de ta présence à mes côtés...

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : Etude bibliographique

I. La biodégradation.....	5
A. La biodétérioration	6
B. La biofragmentation	9
1. Voie enzymatique.....	9
2. Voie radicalaire	13
C. La bioassimilation	14
1. Catabolisme.....	15
2. Anabolisme.....	18
II. Biodégradabilité	20
A. Mise en place du test	22
1. Le composé à tester	22
2. Les conditions de culture.....	23
3. La flore	26
B. Les techniques d'évaluation usuelles	26
C. Une nouvelle approche dans l'évaluation de la bioassimilation : les isotopes, traceurs des flux biogéochimiques.....	30
1. Généralités.....	30
2. Les isotopes dans les cycles biogéochimiques	33
3. Les plantes C3 et C4.....	36

Chapitre II: Matériel et méthodes

I. Matériel	43
A. Les substrats de dégradation	43
1. Les feutres végétaux.....	43
2. Les films de paillage	43
3. Autres films de paillage, le néosac.....	44
4. Une substance à activité biocide	44
5. Un feutre/biocide.....	44
B. La flore	44
1. La conservation des souches	44
2. La culture des souches fongiques en milieu liquide.....	45
II. Méthodes	47
A. Respirométrie selon la directive OCDE 301F.....	47
B. Observations macroscopiques	48
C. Observations microscopiques.....	48
1. Microscope photonique	48
2. Microscopie électronique	48
D. Analyse isotopique	49
1. EA-IRMS (Elemental analyzer – Isotopes Ratio Mass Spectrometer)	50
2. "Dual inlet" ou double introduction	51

Chapitre III: Mise au point d'un test de bioassimilation

Phase A: Choix des conditions expérimentales

I. Choix des substrats.....	57
A. Les résines époxydées	57
B. Fus X, un tensio-actif	59
C. Les fibres végétales	60
D. Les plastiques biodégradables	61
E. Les substances à activité biocide.....	61
II. Choix des conditions de biodégradation	62
III. Choix de la flore.....	63
IV. Choix de l'évaluation de la bioassimilation	67

Phase B: La réalisation

I. Principe du test.....	79
II. Le protocole.....	80
A. La pré-culture en milieu liquide	80
B. La culture des souches en milieu solide	81
C. La culture des souches en milieu liquide	82
III. Les différentes séries d'expériences.....	82

Phase C: Observations de la colonisation

I. Les feutres végétaux.....	85
A. Observations macroscopiques de la colonisation microbienne – Série I.....	85
1. Le feutre L.....	86
2. Le feutre LB	88
3. Conclusion.....	90
B. Observations macroscopiques de la colonisation microbienne – Série II.....	90
C. Conclusion.....	92
II. Les films de paillage	92
1. Le film farine/polyester.....	92
2. Le film polyester	94
3. Conclusion.....	95

Chapitre IV: La bioassimilation de différents agroproduits

I. Analyse isotopique	99
A. La pré-culture de la biomasse fongique en milieu liquide	99
1. Milieux de croissance.....	99
2. Résultats isotopiques	100
B. La culture de la biomasse fongique sur un feutre végétal	102
1. La signature isotopique du feutre végétal	102
2. Signature isotopique de la biomasse fongique néosynthétisée.....	102
3. Comparaison entre des valeurs isotopiques de la biomasse fongique.....	105
C. La culture de la biomasse fongique sur les films de paillage.....	105
1. La signature isotopique des films.....	105
2. Signature isotopique de la biomasse fongique néosynthétisée.....	106
3. Comparaison des comportements fongiques sur les films de paillage.....	111
D. La culture de la biomasse fongique sur Néosac	113
1. La signature isotopique des films.....	113
2. Observations macroscopiques de la biomasse fongique néosynthétisée.....	114
3. Signature isotopique de la biomasse fongique néosynthétisée.....	115

4.	Conclusion concernant la bioassimilation des films plastiques	117
E.	La bioassimilation au sein des tests de biodégradabilité.....	117
F.	La culture de la biomasse fongique dans un milieu contenant une molécule à spectre biocide	118
1.	La signature isotopique de la substance biocide	118
2.	Signature isotopique de la biomasse fongique néosynthétisée.....	119
G.	Feutre/biocide.....	120
1.	La signature isotopique du substrat feutre/biocide.....	121
2.	Observations macroscopiques	121
3.	Signature isotopique de la biomasse fongique néosynthétisée.....	124
H.	Conclusion sur la visualisation de la bioassimilation par analyse isotopique.....	125
II.	Examens microscopiques	126
A.	Sur les agromatériaux à base de fibres végétales	126
1.	Introduction	126
2.	La colonisation	127
3.	La dissolution du ciment pectique.....	129
4.	La dégradation des tissus végétaux	130
5.	Discussion	141
6.	Conclusion.....	144
B.	Sur les films de paillage	144
1.	Observations sur les films non ensemencés	145
2.	Observations sur le film farine/polyester	145
3.	Observations sur le film polyester.....	147
4.	Conclusion.....	148
C.	Conclusion.....	149
	Conclusion et perspectives.....	150
	Références bibliographiques.....	154
	Liste des figures.....	174
	Liste des tableaux	176
	Annexes.....	177

Abbreviations

AMP : Adénosine MonoPhosphate

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

ASTM : American Society for Testing and Materials

BRF : Brown-Rot Fungi ou champignons de la pourriture brune

BTA : poly (Butanediol-co- Terephtalic acid-co- Adipic acid)

CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse

DIN : Deutsches Institut für Normung

DThO: Demande Théorique en Oxygène

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IR: Infra-Rouge

ISO : International Organisation for Standardisation

MEB: Microscopie Electronique à Balayage

NF : Norme Française

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OPPTS : Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances

PBSA : Poly(ButyleneSuccinate-co-butylene Adipate)

PCL : Poly(CaproLactone)

PHA : Poly(HydroxyAlcanoate)

PHB : Poly(HydroxyButyrate)

PHBV: Poly(HydroxyButyrate-co-hydroxyValerate)

PHV : Poly(hydroxyValerate)

PTMS: Poly(TetraMethylene Succinate)

PVA : Poly(VinylAlcohol)

REACH : Registration, Evaluation, Autorisation and restriction of Chemicals

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

SRF : Soft-Rot Fungi ou champignons de la pourriture molle

UV: Ultra-violet

WRF: White-Rot Fungi ou champignons de la pourriture blanche

Introduction

Dans l'objectif de respecter le protocole de Kyoto, le gouvernement français (Loi d'orientation agricole, Livre blanc sur la biomasse, les différents plans d'actions) favorise les initiatives de nombreux industriels et des consommateurs (communications, aides financières,...) dans une même direction : la préservation de l'environnement. Ainsi dès la conception des produits, leurs cycles de vie sont abordés. Issus du carbone renouvelable, notamment des agro-ressources, les bioproducts doivent répondre à l'échelle de temps inhérente à leurs applications, inférieure à une année pour les solvants, les tensio-actifs, les substances de lubrification ou les emballages, de plusieurs années pour les utilisations en habillement, décoration, loisirs, transports, communication, traitement et protection de surface et de plus longue durée pour les bioproducts utilisés dans les infrastructures, la construction, l'ameublement. Ces bioproducts doivent conserver leur qualité et leurs propriétés techniques durant leur utilisation et ne pas s'accumuler en fin de vie. C'est la naissance des **bioproducts à durée de vie maîtrisée**. Les agroproduits doivent se révéler inaltérables pendant leurs applications et présenter un caractère biodégradable en fin de cycle de vie

Afin de répondre aux exigences environnementales et s'insérer dans le cycle de la matière, ces agroproduits ne doivent dégager aucune toxicité durant leurs cycles de vie et posséder une faculté de biodégradation sans difficulté majeure (persistance, toxicité des produits de dégradation ou intermédiaires). La **biodégradation** correspond à une action de décomposition d'un composé par des agents biologiques. Lorsque la biodégradation conduit à des produits inorganiques tels que CO_2 , H_2O , H_2 , ..., c'est une **minéralisation**. Au préalable, les macromolécules et les polymères doivent être coupés en oligomères ou monomères afin de traverser la barrière cellulaire. Cette phase s'appelle la **fragmentation** ou **dépolymérisation**. Certaines molécules nécessitent d'autres transformations (élimination de groupements gênants, augmentation du caractère hydrophile, etc.) qui appartiennent à l'étape de **biotransformation**. Toute molécule qui entre dans une cellule d'un décomposeur pour y être transformée est considérée comme bioassimilable. La **bioassimilation** est l'incorporation des molécules ou fragments de molécules dans les voies métaboliques de la cellule. Le devenir des métabolites suit différentes voies :

- il intègre les voies cataboliques et est totalement transformé en produit final minéral (CO_2 , H_2O) excrété et en énergie pour la cellule,

- il subit des bioconversions en molécules organiques excrétées (alcool, acides, aldéhydes, etc.),
- il participe à l'anabolisme cellulaire et sert à la synthèse d'une nouvelle biomasse et de molécules de réserve,
- il participe au métabolisme secondaire.

Parmi tous les tests de biodégradabilité normés aujourd'hui, le seul test qui mesure, de façon indirecte, la bioassimilation est l'évaluation de la quantité de CO₂ dégagée (test de Sturm). Sur le fond, ce test limite la bioassimilation à une minéralisation, cette restriction peut s'avérer inadaptée à certaines voies métaboliques anaérobies (fermentations). Sur la forme, le caractère bioassimilable est attribué par une quantité de carbone minéralisé, or, pour s'adapter aux conditions environnementales, les voies métaboliques microbiennes se diversifient. La matière carbonée initiale peut être distribuée au sein des différentes capacités propres à chaque micro-organisme (minéralisation, biosynthèse de molécules organiques, production de biomasse, surproduction de métabolites secondaires, etc.). Ainsi, une substance peut être considérée comme non bioassimilable car la quantité de CO₂ dégagée est inférieure au seuil de la norme en raison d'une orientation métabolique autre que celle attendue. Dans l'ensemble des tests de biodégradabilité, l'évaluation de la bioassimilation s'avère minoritaire et parfois inadaptée.

En réponse à ce manque, il s'avère nécessaire de concevoir un nouveau test de bioassimilation, adapté à un maximum de situations proches de la réalité et de sa complexité. C'est l'objectif de ce travail. Notre stratégie consiste à prouver l'utilisation d'un substrat, choisi parmi les agroproduits, comme nutriment permettant à des micro-organismes de croître.

Afin de concevoir ce test de bioassimilation avec efficacité et pertinence, une étude bibliographique est réalisée dans un premier chapitre. Elle permet de souligner le caractère complexe du mécanisme de la biodégradation et le rôle de la bioassimilation. La description des tests de biodégradabilité réalisés par de nombreuses équipes de recherche offre un large choix de paramètres à analyser afin d'optimiser les conditions opératoires de notre test. L'inadéquation des techniques d'évaluation usuelles nous conduit à transposer les outils analytiques de la géochimie à l'estimation de la bioassimilation.

Afin de respecter la structure rédactionnelle d'un rapport scientifique, le second chapitre matériel et méthodes est exposé préalablement à la troisième partie, qui présente la mise au point du test de bioassimilation, bien que celle-ci ait été réalisée auparavant. Elle est composée de trois phases, définies par la chronologie de la mise au point. La première phase décline les différents paramètres (substrat, conditions, flore, technique d'évaluation) d'un test de bioassimilation afin d'effectuer un choix efficace et pertinent. A l'issue de cette étude, les différents paramètres sont déterminés : le(s) **substrat(s)** bioassimilable(s) dans un **milieu de biodégradation** représentatif de son milieu récepteur, avec une **flore** adaptée et une **technique d'évaluation** de sa bioassimilation pertinente. La seconde phase révèle le principe du test ainsi que le protocole de l'essai en milieux liquide et solide. La dernière phase consiste à restituer les observations macroscopiques de la croissance microbienne.

Le dernier chapitre concerne la validation de ce test à travers l'étude de la bioassimilation de différents agroproduits avec les techniques de l'analyse isotopique et de la microscopie.

La conclusion apporte le bilan des résultats obtenus, engendrant une critique du test et des propositions d'amélioration du test de bioassimilation présenté. Les deux techniques d'évaluation de la bioassimilation sont également discutées afin de dégager de nouvelles perspectives d'utilisation.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce premier chapitre n'est pas une étude bibliographique au sens usuel où la littérature scientifique sert à actualiser les connaissances dans un domaine précis, il rassemble différentes connaissances des sciences environnementales nécessaires pour atteindre notre objectif. Le test de bioassimilation associe en effet différentes disciplines comme la microbiologie, la géochimie et les agro-ressources. De plus, ce test se veut "universel" donc compréhensible et utilisable par un large public (scientifiques, industriels de la plasturgie, transformateurs d'agro-ressources, etc.). C'est pourquoi, cette présentation bibliographique décrit les connaissances essentielles à la compréhension du test en espérant une application très diversifiée. Phénomène intrinsèque lors de la réalisation d'un test de biodégradabilité, la biodégradation et ses mécanismes sont expliqués. Ils sont suivis par l'aspect pratique de la mise en œuvre d'un test de biodégradabilité et ses techniques d'évaluation. Protagonistes essentiels au cœur d'un test de biodégradabilité, les micro-organismes et leur fonctionnement font l'objet d'une brève synthèse. Les agro-ressources et leurs valorisations en produits potentiellement bioassimilables achèvent la présentation bibliographique.

I. La biodégradation

La biodégradation est un processus naturel qui se manifeste au sein de la nature. Elle est nécessaire pour la réalisation des cycles biogéochimiques (Dommergues et Mangenot, 1972). Un cycle biogéochimique correspond à l'ensemble des échanges et transformations des différents éléments (carbone, azote, oxygène, soufre, phosphore, eau) entre les différents réservoirs d'une planète (hydrosphère, atmosphère, lithosphère et biosphère). La décomposition de la matière organique représente une partie de ces cycles (figure 1).

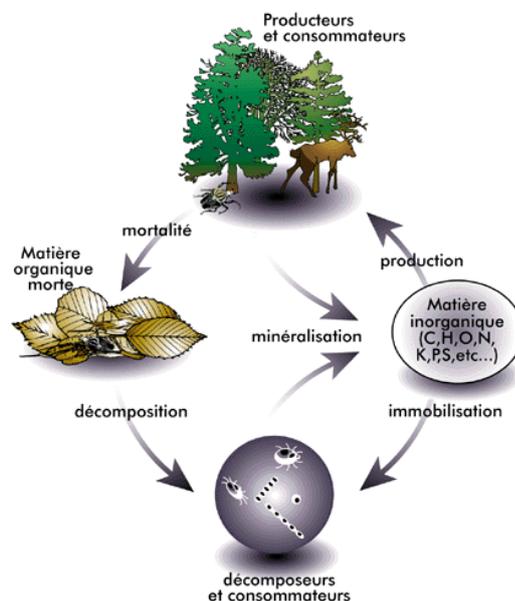


Figure 1 : Schéma simplifié du cycle de la matière organique (source : www.inapg.inra.fr)

La matière organique constitue une source de nutriments (C, H, O, N, P, S, oligoéléments) utilisés par les micro-organismes pour leur développement (croissance, reproduction, métabolisme secondaire). Ainsi, toute matière carbonée semble potentiellement décomposable par une flore microbienne adaptée. Toutefois, la nature du substrat (hydrophobe/hydrophile), sa structure chimique (nature des liaisons, ramifications), et physique (masse moléculaire, cristallinité), les conditions environnementales (humidité, pH, température, oxygène, oligoéléments, facteurs de croissance) peuvent avoir une influence sur le comportement de cette flore.

En fonction du degré de difficulté de décomposition du substrat par des agents microbiens, trois stades de biodégradation peuvent être distingués : la biodétérioration, la biofragmentation et la bioassimilation.

A. La biodétérioration

Une biodétérioration est une dégradation indésirable causée par des organismes vivants, majoritairement des micro-organismes (Eggins and Oxley, 2001). En général, les substrats touchés sont des matériaux (plastiques, résines, bois) (Lugauskas *et al.*, 2003), des métaux (Feugeas *et al.*, 1997) ou des substances inorganiques (ciment, pierres, roches) (Warscheid and Braams, 2000, Gu *et al.*, 1998). Il en résulte une usure précoce et inattendue provoquant une diminution de la qualité du matériau sur un plan fonctionnel, ce qui réduit sa valeur économique. Au sein des habitations, ces développements microbiens peuvent faire l'objet de désagréments (odeurs, pollution visuelle) voire une irritation des voies respiratoires et/ou cutanée et présentent un danger pour la santé humaine (Gutarowska and Piotrowska, 2006).

La biodétérioration constitue le niveau le plus faible de biodégradation. Les substrats touchés par la biodétérioration étant considérés comme inaltérables, les micro-organismes s'associent pour une meilleure efficacité, soit de façon concomitante (biofilm) (Chertov *et al.*, 2004), soit successivement (Warscheid et Braams, 2000). Les micro-organismes autotrophes sont les premiers colonisateurs grâce à leur capacité à fixer le dioxyde de carbone atmosphérique. Leur activité métabolique génère des métabolites excrétés vers le milieu extérieur. Ces molécules ainsi que les fragments d'une lyse cellulaire peuvent alors servir de nutriments aux organismes hétérotrophes. La pollution atmosphérique ainsi que des additifs (peintures, pigments) constituent également une source possible de nutriments pour les organismes hétérotrophes (Lugauskas *et al.*, 2003, Warscheid et Braams, 2000, Zanardini *et*

al., 2000). La succession trophique n'est donc pas une nécessité. Biofilms ou organismes isolés, autotrophes et hétérotrophes s'associant ou se succédant. Certaines biodétériorations sont supposées et évitées (traitement préventif du bois, biocide dans les enduits de façades, etc.). Mais l'adaptation microbienne peut s'avérer efficace et inattendue, sous l'influence de nombreux paramètres biotiques et abiotiques.

La biodétérioration d'origine microbienne est provoquée par différentes actions, généralement associées :

❖ **Mécanique** : le mycélium des champignons ou des bactéries filamenteuses, en pénétrant dans le matériau, provoque des fissures et augmente la taille des pores (Warscheid et Braams, 2000). La structure ainsi fragilisée perd sa cohésion donc sa solidité (Gu *et al.*, 1998). Les exopolysaccharides membranaires ou libérés dans le milieu extérieur agissent comme des substances tensioactives qui modifient les interactions hydrophile/hydrophobe (Crispim et Gaylarde, 2005). L'infiltration de solutions qui en résulte engendre une éventuelle dissolution des molécules qui constituent la matrice du matériau ainsi qu'une colonisation microbienne facilitée et une dissémination des spores fongiques.

❖ **Chimique** : il existe trois voies par lesquelles les micro-organismes induisent une biodétérioration chimique.

1. La voie acide : la flore biologique est capable de synthétiser et de sécréter des acides minéraux (acide sulfurique pour *Thiobacillus*, acide nitrique pour *Nitrobacter*), des acides organiques (acétique, citrique, glucuronique, oxalique, ...) qui corrodent les ciments et les roches (Rubio *et al.*, 2006, Roberts *et al.*, 2002, Warscheid et Braams, 2000, Gu *et al.*, 1998) et participent à la biodétérioration des polymères (Lugauskas *et al.*, 2003).

2. La voie complexante : les di- ou triacides organiques sécrétés (acides oxalique, citrique, 2-cétogluconique, tartrique, ...) peuvent former des complexes avec des ions bi- ou trivalents (Fe, Al, Cu, Zn, Ni, Mn, Ca, Mg) (Gutarowska and Piotrowska, 2006). Ces complexes se présentent sous la forme de cycles incorporant les cations, ce qui les stabilise sous forme soluble, à travers un large domaine de pH et de potentiel redox. La compétition ionique en faveur des acides microbiens peut déstabiliser l'édifice moléculaire du matériau et faciliter son accessibilité aux micro-organismes.

3. La voie oxydante : l'oxydation est la source d'énergie utilisée par les micro-organismes chimiotrophes, qu'elle soit d'origine minérale (ammoniaque, nitrites, sulfure d'hydrogène, thiosulfates) pour les chimolithotrophes ou organique (glucides, lipides, protéines) pour les chimioorganotrophes (Regnault, 1990). Certains micro-organismes sont capables d'oxyder le fer et le manganèse (Warscheid and Braams, 2000), notamment par l'intermédiaire de protéines spécifiques, les sidérophores, libérées dans le milieu extracellulaire et captées par des récepteurs membranaires spécifiques (Pelmont, 2005). Les cations peuvent être stockés, intervenir dans les voies métaboliques microbiennes ou servir de co-facteurs enzymatiques (Weil, 1994). Les peroxydases sont des enzymes impliquées dans des réactions d'oxydo-réduction. Elles utilisent l'énergie de l'oxydation des cations métalliques pour cliver des liaisons chimiques (Otsuka *et al.*, 2003, Hofrichter, 2002, Enoki *et al.*, 1997, Zapanta and Tien, 1997,).

- ❖ **Enzymatique** : des enzymes extracellulaires libérées par certains micro-organismes catalysent des réactions de transformation (clivages, oxydations, ajout/élimination de groupements, ...). La plupart des études de "biodégradation" des matières plastiques démontrent la sécrétion d'enzymes extracellulaires (Gu, 2003, Lugauskas *et al.*, 2003, Howard *et al.*, 2002, Muller *et al.*, 2001, Flemming, 1998,) qui attaquent la partie superficielle du matériau et créent une érosion de surface (Muller, 2003).

La (bio)détérioration des polymères en conditions naturelles est plus connue sous le nom de vieillissement des composites. La photodégradation est la plus dommageable. Le soleil provoque des changements de surface (couleur, rugosité) et peut induire des modifications au niveau des liaisons chimiques (réactions de Norrish) (Nakamura *et al.*, 2006, Tsuji *et al.*, 2006). La température favorise les réactions d'oxydation par l'oxygène de l'air. Elle peut être amplifiée en présence d'un polluant atmosphérique, l'ozone (Mortaigne, 2005). Les polluants urbains peuvent également interagir avec les matrices minérales et organiques, et ainsi provoquer de sérieux dégâts irréversibles (Nuhoglu *et al.*, 2006, Briassoulis, 2005, Zanardini *et al.*, 2000). Les cycles gel/dégel sont des facteurs importants participant à la détérioration des matériaux (Warscheid et Braams, 2000). Tous ces paramètres abiotiques peuvent interagir de façon concomitante. Ils permettent ainsi l'accessibilité des matériaux aux micro-organismes et/ou facilitent la biodétérioration (Jakubowicz *et al.*, 2006).

B. La biofragmentation

La biofragmentation correspond à des scissions de liaisons chimiques sous une action biologique, microbienne dans la plupart des cas. Elle correspond au second degré de la biodégradation, plus destructrice que la biodétérioration et s'exécutant dans le milieu externe à une entité biologique. Les micro-organismes excrètent des enzymes ou des radicaux libres dont le rôle est de couper spécifiquement ou non des liaisons chimiques. La dépolymérisation est une fragmentation particulière car elle concerne une succession de clivages d'un polymère en oligomères, puis en monomères.

1. Voie enzymatique

Les enzymes sont des protéines à activité catalytique. Leur nature protéique leur confère une très grande diversité et une très haute spécificité mais aussi une certaine sensibilité (dénaturation par la chaleur, les radiations, les détergents, ...) (Weil, 1994). Les enzymes constitutives sont produites indépendamment de la présence d'un substrat, par conséquent leur concentration n'augmente pas avec l'apparition de ce dernier. En revanche, les enzymes inductibles sont synthétisées suite à un signal révélant la présence d'un substrat. Leur concentration augmente en fonction du temps, souvent après un temps de latence, nécessaire à la cellule pour accomplir le cycle d'induction, de synthèse et de sécrétion de l'enzyme. La disparition du substrat provoque l'arrêt immédiat de la synthèse de l'enzyme. Libérées dans le milieu extracellulaire, les enzymes peuvent être libres ou s'adsorber sur des particules. L'adsorption leur garantit une protection vis-à-vis des autres enzymes et accroît leur capacité catalytique (Mateo *et al.*, 2007). Elles agissent seules ou associées sous la forme de complexes multi-enzymatiques. Sur un polymère, les endoenzymes coupent à l'intérieur d'une chaîne alors que les exoenzymes agissent sur les extrémités.

Selon la classification de l'EC (Enzyme Commission) de l'IUPAC (International Union of a Pure and Applied Chemistry), les enzymes appartiennent à 6 classes : 1) Oxydoréductases; 2) Transférases; 3) Hydrolases; 4) Lyases; 5) Isomérases; 6) Ligases (annexe 1). Les enzymes impliquées dans la biofragmentation appartiennent essentiellement aux classes des hydrolases et des oxydoréductases.

a) Les hydrolases

Leur fonction est d'hydrolyser c'est-à-dire d'utiliser une molécule d'eau pour couper une liaison : $A - B + H_2O \Leftrightarrow A - OH + B - H$.

Logiquement, elles ont un rôle prépondérant dans la biofragmentation.

- **Hydrolases spécifiques** : Les micro-organismes, notamment d'origine tellurique, excrètent les enzymes capables d'hydrolyser les polymères composant la matière organique. Le tableau 1 indique les enzymes les plus couramment impliquées dans la biofragmentation des composites.

Tableau 1 : Des hydrolases spécifiques

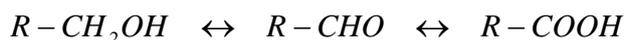
Enzymes	Substrat	Matériaux	Références
amylases	amidon	Mater-Bi bioplastiques	Araujo <i>et al.</i> , 2004 Chandra et Rutsgi, 1998 Lörcks, 1998
cellulases	cellulose	Cellophane Papiers, cartons Composites à base fibres végétales	Sudin et Swammy, 2006 Rutot et Dubois, 2004 Chandra et Rutsgi, 1998 Dommergues et Mangenot, 1970
chitinases	chitine	Peau artificielle Fils de suture	Rutot et Dubois, 2004 Dommergues et Mangenot, 1970
hémicellulases	hémicellulose	Composites à base fibres végétales	Sudin et Swammy, 2006 Dommergues et Mangenot, 1970
pectinases	pectines	Composites à base fibres végétales	Sudin et Swammy, 2006 Dommergues et Mangenot, 1970

- Un second groupe d'hydrolases impliquées dans la biofragmentation des polymères a été largement étudié. Ce groupe d'enzymes très actives sur les (co-)polyesters, constituants majoritaires des "bioplastiques", s'appelle "**dépolyméras**es". Elles ne sont pas spécifiques d'un substrat mais d'une liaison : les lipases et les estérases attaquent les liaisons ester, les peptidases coupent les liaisons amides. (Belal, 2003). Les premières préfèrent les substances hydrophobes tels que les longues chaînes carbonées, les secondes ont plutôt une affinité pour les esters hydrosolubles et les troisièmes agissent sur les protéines. Certains auteurs utilisent une nomenclature spécifique à la dépolymérisation des polyesters. Le nom de l'enzyme est composé du nom du substrat suivi du terme "dépolymérase" (PHB dépolymérasés, PBSA dépolymérasés, PCL dépolymérasés) (Zhao *et al.*, 2005, Scherer *et al.*, 1999, Jendrossek, 1998, Murphy *et al.*, 1996). Les dépolymérasés appartiennent à la famille des hydrolases à sérine dont le mécanisme catalytique est présenté en annexe 1.

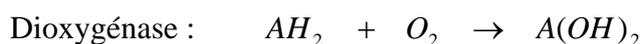
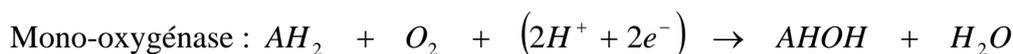
b) Les oxydoréductases

Les oxydoréductases (classe 1) sont des enzymes qui catalysent des réactions de transfert d'électrons et de protons. Il en résulte des réactions de biotransformation qui peuvent être nécessaires à l'activité des autres enzymes, ou des réactions de fragmentation.

- Les **déshydrogénases** fonctionnent avec un co-facteur qui échange les électrons et protons avec le substrat.



- Les **oxygénases** introduisent un (mono-oxygénase) ou deux (dioxygénase) atomes d'oxygène à partir de O₂.



Un atome d'oxygène introduit dans le substrat apparaît souvent sous la forme d'un hydroxyle, l'enzyme s'appelle alors une hydroxylase. L'hydroxylation s'opère aussi bien sur les chaînes aliphatiques, aux extrémités ou intrachaine, saturées ou insaturées, sur des cycles ou sur les noyaux aromatiques.

Les alcanes ramifiés sont plus récalcitrants à la biofragmentation. Leur résistance est proportionnelle au nombre de ramifications. Les cycloalcanes non ramifiés peuvent être oxydés et transformés en lactones hydrolysables, conduisant ultérieurement à un diacide. Ils sont plus difficilement fragmentables que les alcanes linéaires. Pour y parvenir, l'intervention d'un mécanisme de co-oxydation impliquant plusieurs souches microbiennes possédant un équipement enzymatique complémentaire est fréquente. Les noyaux aromatiques sont les plus résistants à la biofragmentation. Leur décomposition est possible mais relativement lente.

La mono-oxygénation sur une liaison insaturée peut engendrer une forme époxyde très réactive qui se transforme facilement en alcool. Le mécanisme d'hydroxylation est préféré par les bactéries alors que la formation d'un époxyde est plus fréquente chez les eucaryotes (Pelmont, 2005).

L'oxydation des alcanes par une dioxygénase peut conduire à la formation d'un peroxyde, oxydable en aldéhyde puis en acide. Chez certaines souches, le passage par la forme alcool est nécessaire (Soltani, 2004).

Les deux atomes d'oxygène peuvent être incorporés simultanément sous la forme de deux hydroxyles. Ils forment des groupements polaires qui permettent d'augmenter la solubilité de substrats organiques peu solubles dans l'eau tels que les hydrocarbures et les HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) ou les composés nitroaromatiques. Les dioxygénases sont également impliquées dans la catalyse oxydative du noyau aromatique avec une ouverture intra-diol.

- Les **peroxydases** sont des protéines qui possèdent un groupement prosthétique avec un atome métallique en son centre. Ce dernier joue le rôle d'accepteur et de donneur d'électrons ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$; $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$). Elles catalysent des réactions d'oxydoréduction entre le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou un peroxyde organique, d'une part, et des phénols, amines aromatiques, métaux ou autres composés, d'autre part. Ces réactions engendrent des radicaux très réactifs.
- Les **phenoloxydases** sont des métalloprotéines contenant du cuivre, produites par la plupart des micro-organismes lignolytiques (Leonowicz, 1999). Certaines sont spécialisées dans l'addition de groupements hydroxyles sur le noyau aromatique, d'autres par l'oxydation des hydroxyles en carbonyles. Les laccases sont des phenoloxydases particulières. Elles substituent un électron du noyau aromatique pour conduire à un radical phenoxy très réactif qui peut évoluer de façon non enzymatique vers des cascades d'oxydations ou des voies de polymérisation, par exemple en substances humiques (Otsuka *et al.*, 2003). Elles sont également capables de couper les liaisons alkyl-phenyl et interviennent dans les réactions de déméthylation (Call et Mucke, 1997).

c) Les autres

Moins nombreuses mais toutefois non négligeables, d'autres enzymes peuvent jouer un rôle dans la biofragmentation. Les lyases (classe 4) catalysent l'élimination de groupements spécifiques (décarboxylases, déhalogénases, désaminases, etc.). Les ligases (classe 6) sont des enzymes qui catalysent des réactions réversibles dans le sens de la synthèse

ou du clivage. En cas de groupements gênants qui empêchent la liaison enzyme-substrat, les transférases (classe 2) interviennent. Comme leur nom l'indique, elle transfèrent des groupements d'une molécule sur une autre (acyl, glycosyl, alkyl, aryl, azotés, phosphorés, soufrés, etc.).

2. Voie radicalaire

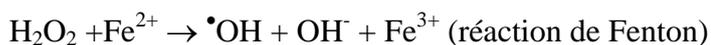
Tout atome ou molécule, neutre ou ionisée, comportant au moins un électron célibataire dans une orbitale externe est un radical libre. Les radicaux libres sont caractérisés par une grande réactivité chimique et une courte durée de vie. La rupture homolytique d'une liaison covalente donne deux radicaux libres, chaque atome conservant un électron célibataire.
 $R-R' \rightarrow R^{\bullet} + R'^{\bullet}$

Les radicaux libres se forment par différentes réactions :

a) la coupure homolytique, sous l'influence de **photons** : certaines familles de molécules sont particulièrement sensibles à cette photochimie :

- les peroxydes : $ROOR' \rightarrow RO^{\bullet} + \bullet OR'$, $H_2O_2 \rightarrow \bullet OH + \bullet OH$
- les composés azoïques
- les molécules halogénées.

b) La décomposition de H_2O_2 catalysée par des **métaux**, en particulier le fer et le cuivre :



c) L'interaction du peroxyde d'hydrogène avec l'**ion superoxyde**



Les radicaux libres formés réagissent avec une molécule en lui transmettant son caractère radicalaire formant ainsi une chaîne de propagation qui se termine par une stabilisation du radical (résonance avec un noyau aromatique par exemple) ou lorsqu'il perd sa propriété radicalaire ($R^{\bullet} + R'^{\bullet} \rightarrow R-R'$).

La voie radicalaire est utilisée par certains micro-organismes du sol pour la biodégradation de polymères récalcitrants, par leur structure (par exemple cristalline comme la cellulose) (Wang et Gao, 2003, Hammel *et al.*, 2002, Enoki *et al.*, 1997, Green III et

Highley, 1997, Kremer, 1993, Enoki *et al.*, 1992) ou par leur nature chimique (les lignines) (Otsuka *et al.*, 2003, Hofrichter, 2002, Kapich *et al.*, 1999, Call et Mucke, 1997, Kurek *et al.*, 1997, Zapanta et Tien, 1997, Lundquist et Kirk, 1978).

C. La bioassimilation

Alors que les deux précédentes étapes avaient lieu à l'extérieur des cellules microbiennes, cette dernière phase implique un passage intracellulaire. Elle correspond au stade de biodégradation le plus avancé, celui qui permet d'aboutir aux molécules les plus simples. La bioassimilation est définie par une utilisation de molécules par les micro-organismes pour se développer. Concrètement, ils ont besoin de trois sources pour proliférer : une source d'énergie, une source d'électrons et une source d'atomes (Meyer et Deiana, 1984) (figure 2).

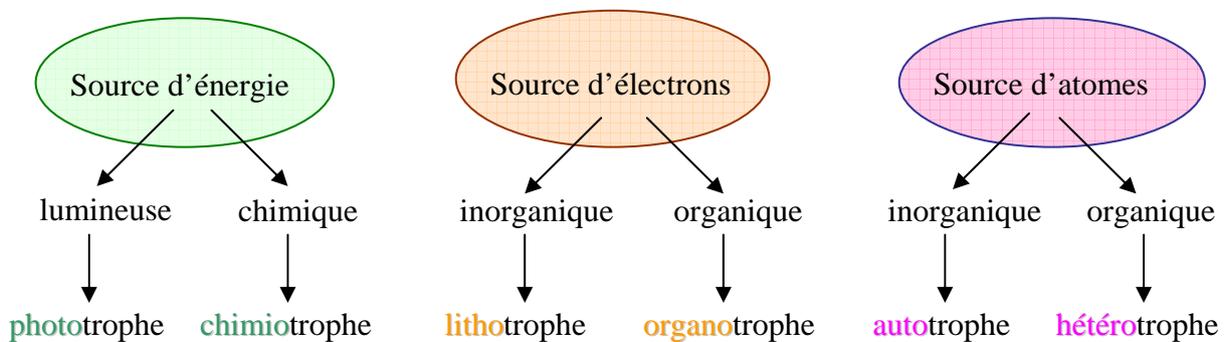


Figure 2 : Les différents types trophiques

Dans l'objectif d'une biodégradation des biomolécules et biomatériaux issus de la valorisation des agro-ressources, la description de la bioassimilation se limite à l'utilisation de la matière organique comme source d'énergie, donc aux chimiotrophes.

La membrane cellulaire constitue une barrière entre le milieu extracellulaire, lieu où les substrats potentiels sont abondants, et le cytoplasme, lieu des réactions métaboliques. Le passage du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire s'appelle l'absorption. Il existe trois principaux mécanismes d'absorption chez la cellule microbienne (Pollard and Earnshaw, 2004):

- la diffusion passive, par gradient de concentration, du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré, à travers la bicouche lipidique pour les petites molécules hydrophobes (figure 3a) ou à travers des canaux pour les ions (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , etc.) ou des pores (H_2O , peptides, nucléotides) (figure 3b),

- la diffusion facilitée, à l'aide de transporteurs membranaires spécifiques appelés perméases, toujours dans le sens du gradient de concentration (figure 3c),
- le transport actif, à l'aide de perméases, contre le gradient de concentration en utilisant l'énergie métabolique (figure 3d).

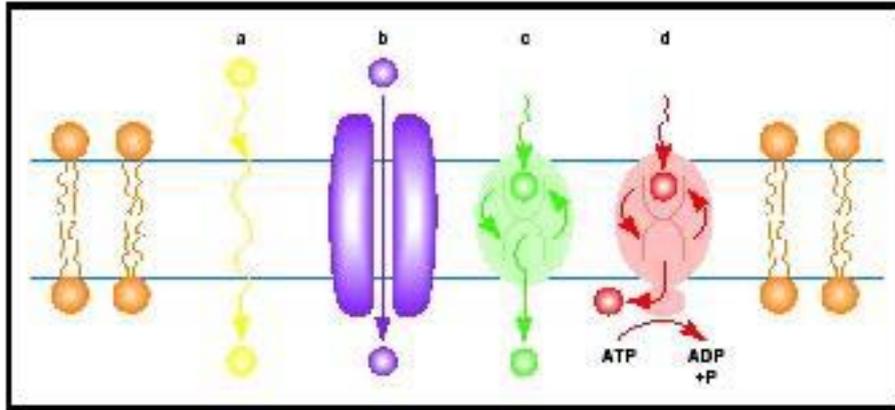


Figure 3 : Les différents transports membranaires

(www.biologyreference.com/Ma-Mo/Membrane-Transport.html)

Dans le cytoplasme, les molécules intègrent les voies métaboliques. Le métabolisme énergétique est l'ensemble des réactions et échanges chimiques qui se produisent au niveau cellulaire pour permettre à la cellule de dégager et de transformer l'énergie nécessaire à sa vie. Ces réactions vont dans le sens de la dégradation (catabolisme) ou de la synthèse (anabolisme) (Gourdon, 2002).

1. Catabolisme

En biochimie, les molécules nutritives sont classées en trois groupes : les protéines, les lipides et les glucides. Les protéines sont coupées en peptides puis en acides aminés à l'aide de protéases. Les lipides sont transformés par voie enzymatique (lipases, estérases) en glycérol et en acides gras. Ces longues chaînes de carbones sont dégradées par la β -oxydation. Les oses, après des réactions d'hydrolyse et/ou d'interconversion si nécessaire, intègrent la glycolyse et fournissent le pyruvate, qui, après avoir subi une décarboxylation oxydative, suit le cycle de Krebs et est ainsi transformé en CO_2 (Alberts *et al.*, 1995) (figure 4).

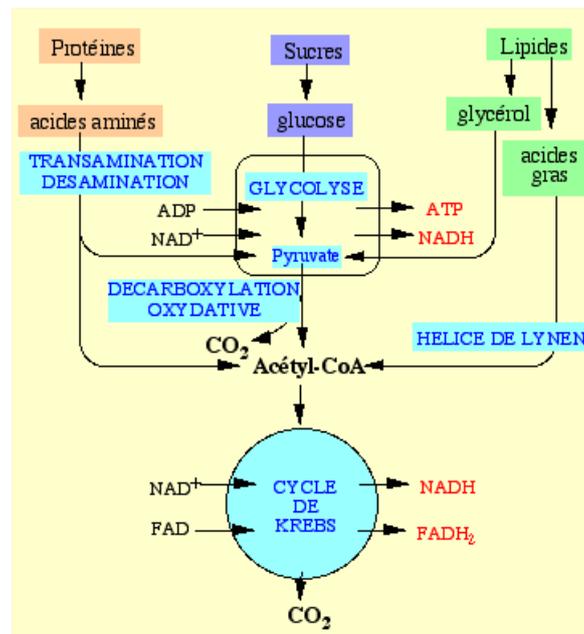


Figure 4 : Les principales voies du catabolisme (www.snv.jussieu.fr)

Les micro-organismes possèdent la particularité de synthétiser des polymères de réserve, source nutritive éventuelle si les molécules exogènes font défaut. Les polymères les plus connus sont l'amidon, les polyhydroxyalcanoates (PHA) et les réserves lipidiques.

Cette première partie catalytique fournit des molécules comme les acides aminés, le pyruvate ou l'acétylcoenzyme A qui peuvent intégrer les voies anaboliques pour synthétiser les molécules nécessaires à la vie cellulaire et à la croissance microbienne.

En revanche, l'oxydation est incomplète et libère assez peu d'énergie (+5ATP pour une molécule de 6 carbones). La seconde phase du catabolisme dépend du type respiratoire des micro-organismes, c'est-à-dire de la chaîne de transfert d'électrons qu'ils possèdent et de l'accepteur final d'électrons. Il existe trois types respiratoires.

a) La respiration aérobie : Les coenzymes réduites (NADH, FADH₂) au cours des voies cataboliques (glycolyse, cycle de Krebs et β -oxydation) sont réoxydées par une chaîne membranaire respiratoire constituée de transporteurs d'électrons et de protons dont l'accepteur final est l'oxygène (molécule exogène issue du milieu extérieur) (figure 5). Le potentiel d'oxydoréduction du couple O₂/H₂O est très haut (+820 mV). Ainsi, en aérobose, l'oxygène est le principal accepteur d'électrons. Le gradient électrochimique généré par les transferts d'électrons fournit l'énergie nécessaire à la protéine membranaire ATPase dont le rôle est de produire de l'ATP (80 ATP pour une molécule à 6 carbones).

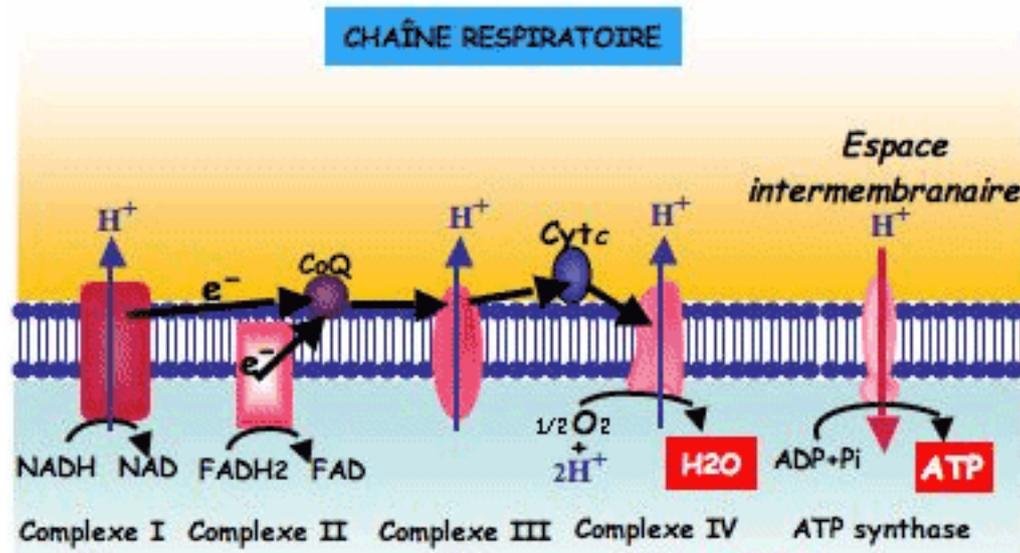


Figure 5 : La chaîne respiratoire aérobie (www.sciencebio.com)

b) La respiration anaérobie : En absence d'oxygène, certains micro-organismes sont capables de réduire des molécules minérales (nitrates, nitrites, sulfates, etc.), organiques (fumarate) ou des ions métalliques (Fe, Mn). Ce type respiratoire est appelé **respiration** (présence de la chaîne membranaire de transfert d'électrons qui permet la phosphorylation oxydative) **anaérobie** (en absence d'oxygène) (figure 6). Le composé azoté, soufré ou organique n'est pas utilisé comme source de matière, la réduction s'effectue sur la face externe de la membrane. C'est une voie dissimilatrice, par opposition aux voies d'assimilation des composés azotés et soufrés (Pelmont, 1993).

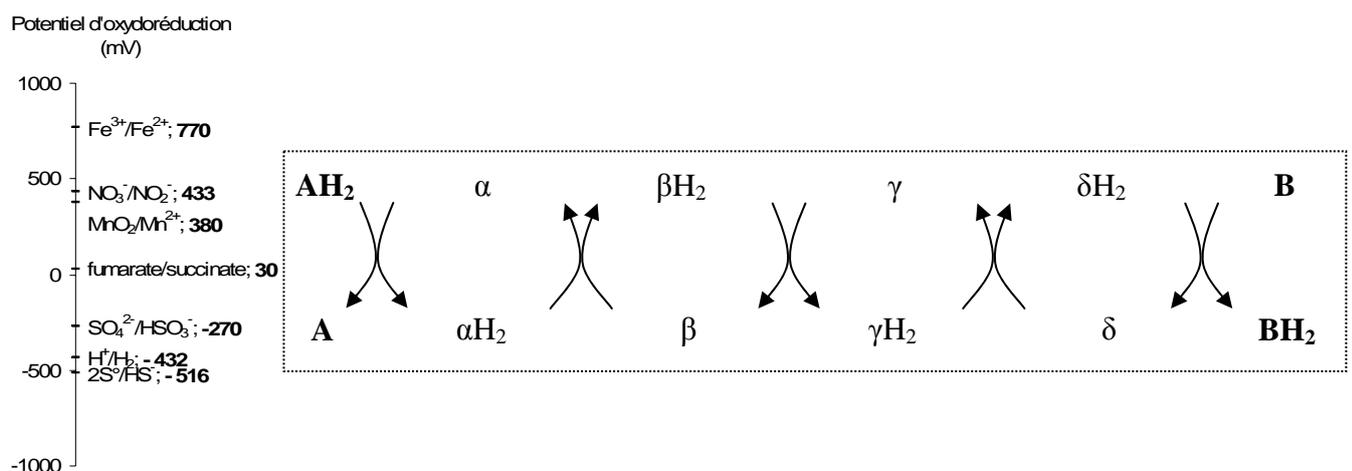


Figure 6 : Les couples redox potentiels en respiration anaérobie (Gourdon, 2002)

c) Les fermentations : Lorsque aucune respiration n'est possible (absence d'accepteur d'électrons externe), la fermentation est l'ultime procédé. Elle est caractérisée par une

Tableau 2 : Principaux éléments constitutifs d'une cellule procaryote

Éléments de structure	Composition chimique	Anabolisme
Paroi	Osamines	Addition d'une fonction amine sur un ose
	Acides aminés	Monomères de base
	Acides teichoïques	Polymères de glycérol (ou ribitol) reliés par des groupes phosphate. Acides aminés et oses attachés sur le polyol
	Oses	Monomères de base
	Lipides	Hélice de Walkyl (acides gras)
Membranes	Phospholipides	Estérification du glycérol + acide phosphatidique
	Protéines	Traduction de l'ARN
	Glucides	Interconversion et polymérisation
Appareil nucléaire Plasmides	ADN	Base purique ou pyrimidique + ose + phosphate
Capsule	Polysaccharides	Gluconéogénèse + polymérisation
	polypeptides	Traduction de l'ARN
Cils/flagelles/pili	Protéines	Traduction de l'ARN
Inclusions	Polysaccharides	Polymérisation des oses
	PHB	Polymérisation du 3-hydroxybutyrate

Tableau 3 : Principaux éléments constitutifs d'un mycète

Éléments de structure	Composition chimique	anabolisme
Paroi	Cellulose	Polymérisation du glucose
	Chitine	
	Glucane	Polymérisation du glucose
Membranes	Phospholipides	Estérification du glycérol + acide phosphatidique
	Protéines	Traduction de l'ARN
	Glucides	Interconversion et polymérisation
	Lipides complexes	
Appareil nucléaire	ADN	Base + ose + phosphate
Cils, flagelles	Protéines	Transcription de l'ARN
Réserves	lipides	

L'anabolisme conduit à la biosynthèse d'une multitude de molécules intégrant le métabolisme secondaire, il est impossible de décrire les voies anaboliques car elles sont nombreuses. Les molécules issues du métabolisme secondaires (antibiotiques, antifongiques,

pigments, molécules tensio-actives, toxines, stéroïdes, terpènes, etc.) servent à améliorer les conditions de vie du micro-organisme au niveau de sa propre croissance, de la modification du milieu environnant, de la compétition avec les autres membres de la l'écosystème, etc.

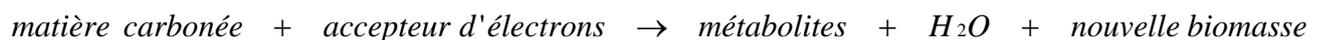
Parmi ces trois degrés de biodégradation, seule la bioassimilation permet d'assurer l'utilisation de la matière par les micro-organismes et son insertion dans les cycles biogéochimiques. Une biodétérioration est une biodégradation superficielle, la majeure partie du substrat reste donc présente dans le milieu récepteur. La biofragmentation et la dépolymérisation conduisent à des fragments bioassimilables ou non. Les matières plastiques contenant des pro-oxydants photosensibles fournissent une quantité non négligeable de fragments récalcitrants et toxiques suite à leur recyclage en enfouissement dans le sol (Bewa, 2005). Ainsi, nous avons choisi d'orienter notre étude vers la mise au point d'un test de bioassimilation afin de prouver que le substrat est un réel nutriment pour la flore. Pour une première version de ce test de bioassimilation, sa mise en oeuvre s'exécutera sans intervention des paramètres abiotiques (soleil, vent, pluie, cycles gel/degel, etc.) qui, dans la nature, collaborent à la biodégradation.

Au préalable, il est nécessaire de connaître les tests de biodégradabilité existants, de considérer leur mise en œuvre, d'identifier les diverses techniques de mesures et de les discuter en fonction de leur relation avec les différents degrés de biodégradation.

II. Biodégradabilité

La biodégradabilité correspond à une estimation de la biodégradation par le suivi d'un ou de plusieurs paramètres de ces réactions. Ce dernier doit se révéler suffisamment significatif de l'avancement de la réaction pour ne pas gêner la sensibilité des techniques employées.

Le mécanisme de biodégradation peut être représenté par cette équation simplifiée :



La biodégradabilité s'évalue par la modification d'un ou plusieurs éléments de cette équation et peut être schématisé sous la forme (figure 8) :

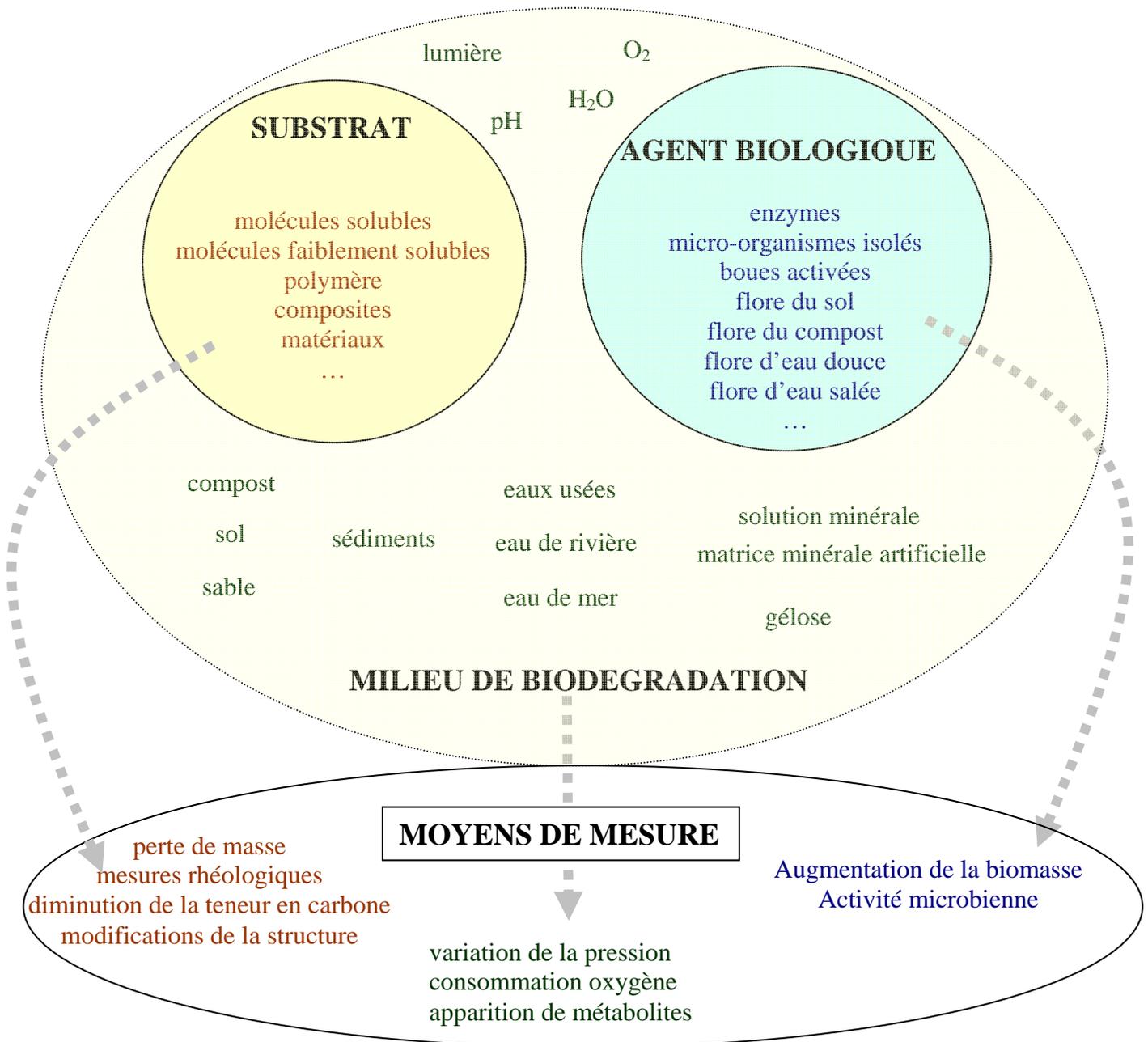


Figure 8 : Schématisation des différents acteurs et paramètres au sein d'un test de biodégradabilité.

La mesure de la transformation de la matière carbonée sans connaître son devenir est définie comme **biodégradabilité primaire**, elle correspond à une disparition de substrats. L'évaluation des produits ultimes (CO₂, CH₄, ...) est appelée **biodégradabilité ultime**.

Selon la directive OCDE, un composé est considéré biodégradable si, lors d'un essai de biodégradabilité ultime (OCDE 301 et versions apparentées), il possède une biodégradabilité supérieure ou égale à 70 % par la mesure du carbone organique dissous ou 60% par la mesure du dégagement de CO₂ ou consommation d'O₂ en 28 jours.

A. Mise en place du test

Tous les tests de biodégradabilité sont basés sur le même principe : le produit à tester, unique source de carbone est placé au contact d'une flore biologique afin d'évaluer son aptitude à la biodégradation. En revanche, la nature des substrats testés, les conditions du test, la flore utilisée et les moyens d'évaluer la biodégradabilité sont variés. La diversité des tests est amplifiée par les différents assemblages que chacun effectue pour des raisons qui lui sont propres (représentativité régionale, climatique ; disponibilités des techniques ; coût ; etc.). Il existe ainsi une multitude de test de biodégradabilité.

1. Le composé à tester

La plupart des tests de biodégradabilité qui ont été élaborés et standardisés sont applicables aux molécules solubles (OCDE 301, 302 et les versions apparentées) (annexe 2), avec une tolérance pour des molécules faiblement solubles ou adsorbables (Reuschenbach *et al.*, 2003, Norr *et al.*, 2001). Ces mêmes tests ont été adaptés pour des polymères, notamment les plastiques (ISO 14852, ASTM D 5209-92, Pagga *et al.*, 2001). Ces derniers peuvent se trouver sous la forme broyée, d'éprouvettes, de films, etc. **La forme employée a-t-elle une influence sur le taux de biodégradabilité ?** L'étude de Yang *et al.* (2005) n'a montré aucune influence de la forme pour un matériau rapidement biodégradable mais une biodégradabilité plus importante sur une forme poudre par rapport à une forme film pour les matériaux plus récalcitrants, en raison de l'augmentation de la surface accessible.

La concentration de la substance à tester dans un réacteur est-elle représentative de sa teneur dans le milieu naturel ? Athiainen *et al.* (2003) précisent que la concentration dans les stations d'épuration ou dans l'environnement est de l'ordre du ng- μ g de carbone par litre alors que les tests de biodégradabilité sont effectués avec des concentrations de 20/400 mg de carbone/L. Dans ce cas, **le test de biodégradabilité est-il significatif ?** Tester des concentrations aussi faibles que le microgramme risque de ne pas être décelable par la sensibilité des appareils de mesure. De plus, si un composé est considéré comme biodégradable à forte concentration, il le sera, *a fortiori*, à plus faible concentration. Le problème se pose pour des composés évalués non biodégradables dans les tests alors qu'ils pourraient l'être dans la nature.

2. Les conditions de culture

Il existe trois catégories de tests : les **tests laboratoire** (la majorité) (tableau 4), les **tests de simulation** (tableau 5) et les **tests *in situ*** (tableau 6), chacune présentant des avantages et des inconvénients.

- Les tests en laboratoire : un milieu minéral artificiel (liquide ou solide) défini estensemencé avec une flore microbienne et constitue le milieu de biodégradation d'un composé donné. Les paramètres abiotiques (température, pH, humidité, O₂, lumière) sont établis et contrôlés. Toutes les phases de la biodégradation peuvent être analysées (la matière première, les produits intermédiaires, les résidus finaux, la biomasse, les échanges gazeux, les molécules volatiles libérées, les produits solubles, les nouveaux composés formés, etc.). Avantage pour étudier le mécanisme de biodégradation d'un composé donné, ce type de test est le plus éloigné des conditions naturelles.

Tableau 4 : Les tests de biodégradabilité réalisés en laboratoire

Normes	Intitulé
OCDE 301 A (1981) OCDE 301 E (1981) ISO 7827 (1994), EN ISO 7827 (1995)	DOC Die-Away-Test. Modified OECD Screening Test. Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds - method by analysis of dissolved organic carbon.
OCDE 301 B (1981) ISO 9439 (1999), EN ISO 9439 (2000)	CO ₂ Evolution Test. Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution test.
OCDE 301 C (1981)	Modified MITI Test (I).
OCDE 301 D (1981) ISO 10707 (1994), EN ISO 10707 (1997)	Closed Bottle Test. Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - method by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test).
ISO 10708 (1997)	Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - method by determining the biochemical oxygen demand in a two-phase closed bottle test.
OCDE 301 F (1981) ISO 9408 (1999), EN ISO 9408 (1999)	Manometric Respirometry Test. Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium by determination of oxygen demand in a closed respirometer.
OCDE 302 A (1981) ISO 9887 (1992), EN ISO 9887 (1994)	Modified SCAS test. Water quality: evaluation of the aerobic biodegradability of organic compound in an aqueous medium – Semi-continuous activated sludge method (SCAS).

OPPTS 835.3210 (1998)	Modified SCAS test.
OCDE 302 B (1981) ISO 9888 (1999), EN ISO 9888 (1999)	Zahn-Wellens/EMPA test. Water Quality— Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium—Static test (Zahn-Wellens method).
OPPTS 835.3200 (1998)	Zahn-Wellens/EMPA test.
OCDE 302D (2001) ISO 14593 (1999)	Inherent Biodegradability - Concawe Test. Water quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds - Method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO ₂ headspace test).
OCDE 309 (2001)	Aerobic mineralisation in surface water.
OCDE 310 (2002)	Ready Biodegradability – CO ₂ in sealed vessels (Headspace Test).
OCDE 311 (2002) ISO 11 734(1995)	Anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge: measurement of gas production. Water Quality - Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge - Method by measurement of the biogas production.
ISO 10634 (1996), EN ISO 10634 (1995)	Water Quality -Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
ISO 14852 (1999) ASTM D 5209-92 (1992)	Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium - Method by analysis of evolved carbon dioxide. Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials in presence of municipal sewage sludge.
ASTM G21-70 (1980)	Standard practice for determination the resistance of synthetic polymeric material to fungi.
ASTM G22-76 (1996)	Standard practice for determining the resistance of synthetic polymeric materials to bacteria.
ASTM G29-75 (1980)	Standard practice for determining the resistance of synthetic polymeric materials to algae.
ISO 846 (1997) DIN 53739 (1994)	Plastics: determination of behaviour under the action of microorganisms. Evaluation by visual examination or measurement of changes in mass or physical properties. Determination of the resistance of plastics to fungi and bacteria.
NF X41-514 (1981)	Basic environmental testing procedures for electronic equipment.
NF X41-513 (1961)	Resistance of plasticisers to attack by microorganisms.

- Les tests de simulation : ce sont des tests dont la matrice, issue du milieu naturel (sol, compost, eau de mer, de rivière, etc.), est placée dans un réacteur en laboratoire. Certains paramètres comme la température, le pH, l'humidité ou l'oxygène peuvent être contrôlés et ajustés. Techniquement, les moyens

d'évaluation de la biodégradabilité sont identiques à ceux des tests en laboratoire.

Tableau 5 : Les tests de biodégradabilité en conditions de simulation

OCDE 303 (1981) ISO 11733 (1995), EN ISO 11733 (1998)	Simulation test. Water quality: evaluation of the elimination and biodegradability of organic compounds in an aqueous medium – Activated sludge simulation test.
OCDE 306 (1992) ISO 16221 (2001)	Biodegradability in seawater. Water quality: guidance for determination of biodegradability in marine environment.
OCDE 304 (1981) OPPTS 835.3300 (1998) EPA 96-088 (1996) X 31-220 (1997) ISO 11266 (1994) DIN 53739 (1984)	Soil biodegradation.
OCDE 307 (2000)	Transformation in soil.
OCDE 308 (2000)	Transformation in sediment.
ISO 14855 (1999) ASTM D 5338-92 (1994)	Determination of the ultimate aerobic biodegradability and disintegration of plastic materials under controlled composting conditions - Method by analysis of evolved carbon dioxide. Standard test method for determining the aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions.

- Les tests en milieu réel : ils représentent la catégorie la plus représentative du comportement du composé dans l'environnement. Les paramètres abiotiques (température, humidité, UV) ne sont pas maîtrisés mais peuvent être indiqués (pluviométrie, ensoleillement, vent, température) et les moyens d'évaluer la "biodégradabilité" sont limités à la perte de masse et au changement de structure du composé. En général, ces tests sont effectués pour les composés solides, des matériaux plastiques ou des composites. **Ces méthodes n'indiquent qu'une biodétérioration voire une biofragmentation mais en aucun cas une bioassimilation.**

Tableau 6 : Les tests de biodégradabilité en conditions réelles

NF EN ISO 13432(2000) ASTM D 5509-96 (2003)	Emballage: exigences relatives aux emballages valorisables par compostage ou biodégradation – Programme d'essai et critères d'évaluation de l'acceptation finale des emballages. Standard practice for exposing plastics to a simulated compost environment.
--	---

3. La flore

Pour les seconde et troisième catégories, la flore microbienne est intrinsèque au milieu de dégradation choisi. En revanche, dans la majorité des tests, elle constitue un critère de sélection par l'expérimentateur qui tente de se rapprocher de la réalité. Les inoculums les plus utilisés sont les boues activées de stations d'épuration municipales, les lixiviats de sols ou de compost. Ces inoculums sont constitués d'un mélange de micro-organismes dont la diversité présente l'avantage de multiplier les capacités de dégradation. Il existe également des tests avec des souches pures ensemencées de façon isolée ou en mélange.

Dans les tests de biodégradabilité en laboratoire, l'influence de l'inoculum est la principale difficulté de reproductibilité des résultats (Athiainen *et al.*, 2003). Mezanotte *et al.* (2005) précisent que la variabilité des résultats est faible pour des polysaccharides car les glycosidases sont ubiquitaires mais elle devient une difficulté pour des composés plus récalcitrants comme les plastiques et les composites.

Malgré cette variabilité, la solution minérale définie ensemencée reste le test privilégié pour étudier la biodégradabilité d'une molécule soluble en présence d'une flore de boues activées. **Ce test est-il toujours significatif avec une autre flore? Avec un autre composé ?** Un lixiviat de matrice solide (sol, compost) conserve-t-il son potentiel catalytique lorsqu'il est ensemencé dans une solution minérale ? Dans le but de simuler les tests de biodégradabilité afin de se rapprocher de la réalité, des supports inertes (vermiculite, pouzzolane) sont utilisés (Bellia *et al.*, 1999, Grima, 2002). Les particules minérales sont alors inoculées par des micro-organismes et servent de supports de dégradation.

B. Les techniques d'évaluation usuelles

La biodégradabilité est évaluée par différentes techniques dont les plus utilisées sont citées dans le tableau suivant (tableau 7).

Tableau 7 : Les techniques d'évaluation de la biodégradabilité

			Outils analytiques	Références
Disparition du substrat	Perte de la matière		Mesures gravimétriques	Bikiaris <i>et al.</i> , 2006, Kim <i>et al.</i> , 2005, Rizzarelli <i>et al.</i> , 2004, Preeti <i>et al.</i> , 2003, Gattin <i>et al.</i> , 2002, Ki and Park, 2001, Weiland <i>et al.</i> , 1995
			Analyses microscopiques	Kim <i>et al.</i> , 2005, Marquès-Calvo <i>et al.</i> , 2005, Tchmutin <i>et al.</i> , 2004, Preeti <i>et al.</i> , 2003, Ki and Park, 2001, Hakkarainen <i>et al.</i> , 2000, Peltola <i>et al.</i> , 2000
			Mesure du carbone organique dissous	Pagga, 1997, Reuschenbach <i>et al.</i> , 2003, Richterik <i>et al.</i> , 2004
	Modification de la structure	Changement des propriétés mécaniques	Mesures des résistances mécaniques (élongation, traction)	Tserki <i>et al.</i> , 2006, Kim <i>et al.</i> , 2005, Domenek <i>et al.</i> , 2004, Ratto <i>et al.</i> , 1999
		Changement des propriétés thermiques	Calorimétrie à balayage Différentielle Analyse thermogravimétrique Diffraction aux rayons X	Bikiaris <i>et al.</i> , 2006, Morancho <i>et al.</i> , 2006, Tserki <i>et al.</i> , 2006, Zhao <i>et al.</i> , 2005, Gan <i>et al.</i> , 2004, Rizzarelli <i>et al.</i> , 2004, Ki and Park, 2001, Hakkarainen <i>et al.</i> , 2000, Ratto <i>et al.</i> , 1999
		Changement de la viscosité	Mesure de la viscosité	Eisentraeger <i>et al.</i> 2002
		Analyses chromatographiques	Perméation de gel	Bikiaris <i>et al.</i> , 2006, Tsuji <i>et al.</i> , 2006, Kim <i>et al.</i> , 2005, Marten <i>et al.</i> , 2005, Marquès-Calvo <i>et al.</i> , 2005, Massardier-Nageotte <i>et al.</i> , 2005, Zhao <i>et al.</i> , 2005, Kawai <i>et al.</i> , 2004, De Jong <i>et al.</i> , 2001, Witt <i>et al.</i> , 2001, Hakkarainen <i>et al.</i> , 2000, Ratto <i>et al.</i> , 1999, Weiland, 1995
		Analyses spectroscopiques	Infra-rouge Résonance magnétique nucléaire Spectrométrie de masse	Bikiaris <i>et al.</i> , 2006, Marten <i>et al.</i> , 2005, Massardier-Nageotte <i>et al.</i> , 2005, Baddi <i>et al.</i> , 2004, Kalbitz <i>et al.</i> , 2003, Zaccheo <i>et al.</i> , 2002, Akin <i>et al.</i> , 1996, Gilardi <i>et al.</i> , 1995
		Tests enzymatiques		Bikiaris <i>et al.</i> , 2006, Rizzarelli <i>et al.</i> , 2004, Tchmutin <i>et al.</i> , 2004, Belal, 2003

Disparition de l'accepteur d'électrons		O ₂	Electrolyse Mesures manométriques Mesures de l'O ₂ dissous	Massardier-Nageotte <i>et al.</i> , 2005, Alexy <i>et al.</i> , 2004, Chamorro <i>et al.</i> , 2001, Pagga <i>et al.</i> , 2001, Govajn <i>et al.</i> , 1999, Richterik <i>et al.</i> , 1998
Apparition de métabolites	Sous forme gazeuse	CO ₂	Infra-rouge Chromatographie en phase gazeuse Titrimétrie pHmétrie Conductivité	Battersby, 1997, Srinivasan and Viraraghavan, 2000, Van der zee, 1998 Larson <i>et al.</i> , 1996, Norr <i>et al.</i> , 2001
		Autre biogaz	Mesures manométriques Chromatographie en phase gazeuse	Massardier-Nageotte <i>et al.</i> , 2006
	Sous forme soluble		Chromatographie liquide haute performance	Gattin <i>et al.</i> , 2002, De Jong <i>et al.</i> , 2001, Bellia <i>et al.</i> , 1999
Mesures de l'activité microbienne	Croissance de la biomasse		Observations macro et microscopiques	Chandra and Rutsi, 1998, Weiland <i>et al.</i> , 1995
	Activité		ATP	Hongwei <i>et al.</i> , 2002, Srinivasan and Viraraghavan, 2000
			Activité enzymatique	Davet, 1996

Relation biodégradation-biodégradabilité

La mesure gravimétrique doit être interprétée avec précaution en fonction de la nature et surtout de la complexité du produit à tester (par exemple, un composite avec des liants, des additifs éventuels) et des conditions de dégradation. La perte de masse peut être due à l'utilisation du substrat par les micro-organismes mais également à des phénomènes d'évaporation ou de solubilisation, surtout dans les tests de biodégradabilité en conditions réelles. La mesure gravimétrique indique une disparition de matière, sans fournir aucune information sur le phénomène de biodégradation ni sur le fait qu'il ait eu lieu ou pas.

La mesure des paramètres physiques (mécaniques, thermiques, rhéologiques) indique un changement de la qualité des polymères ou des molécules étudiés. La structure a été modifiée sans en connaître l'importance. Ces analyses ne peuvent mesurer qu'une (bio)détérioration.

La consommation d'oxygène est, dans la plupart des cas, due à une utilisation microbienne (phosphorylation oxydative). Mais l'oxygène peut également être utilisé dans des réactions d'oxydation d'origine biotique ou abiotique. Comment savoir quelle proportion d'oxygène est impliquée dans la respiration microbienne, preuve d'une bioassimilation ?

Concernant la croissance des micro-organismes, certains se servent du support pour proliférer. Une colonisation microbienne ne prouve pas une utilisation nutritive du support sur lequel le micro-organisme croit.

L'apparition de molécules solubles peut être le fruit du métabolisme (bioassimilation) autant que celui d'une (bio)fragmentation. L'identification de la molécule apparue (étapes complémentaires d'analyses) peut permettre de déceler si elle est d'origine métabolique ou issue d'une dépolymérisation dans la limite de nos connaissances (complexité du mode microbiologique, voies métaboliques inconnues).

Parmi les tests de biodégradabilité existants, seule la mesure du dioxyde de carbone dégagé confirme une insertion du substrat dans les voies métaboliques microbiennes et ainsi peut s'avérer être une estimation de la bioassimilation. En effet, seule l'assimilation du carbone par la voie de minéralisation est quantifiée. Le métabolisme microbien ne se limite ni à cet atome ni à cette voie. Les cycles biogéochimiques peuvent représenter de bons modèles pour visualiser les flux métaboliques.

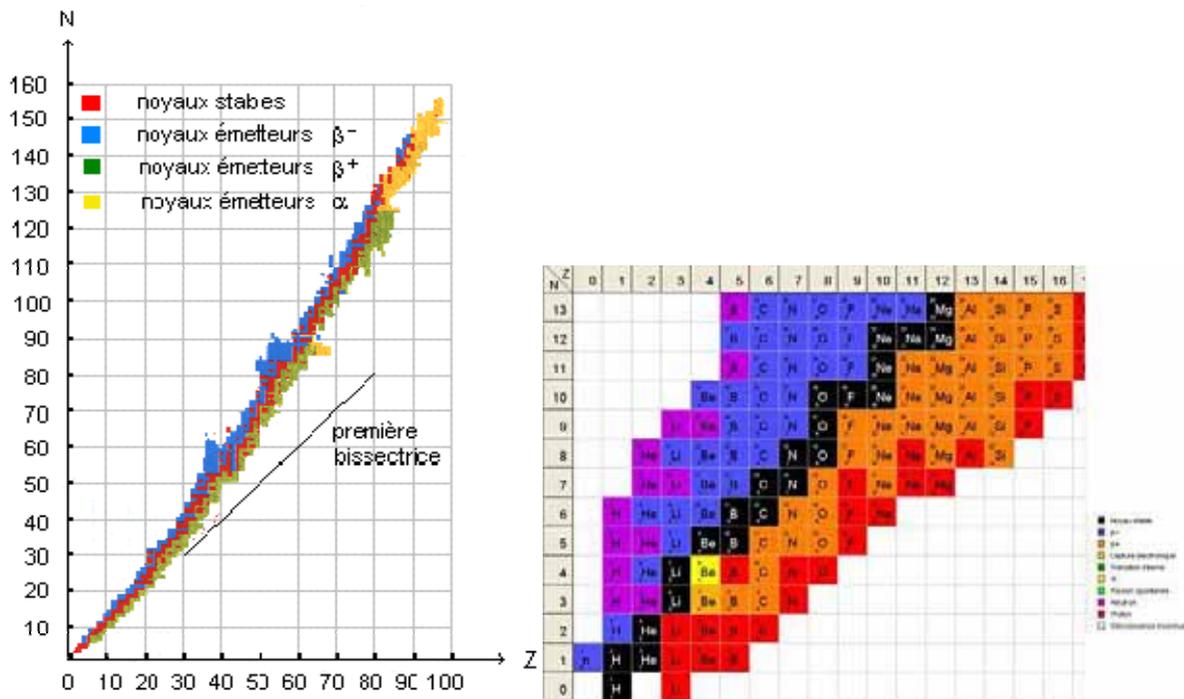
C. Une nouvelle approche dans l'évaluation de la bioassimilation :
les isotopes, traceurs des flux biogéochimiques.

1. Généralités

a) Les isotopes stables

Les isotopes sont des atomes de même numéro atomique mais de masse différente ($^{12}_6\text{C}$ et $^{13}_6\text{C}$; $^{16}_8\text{O}$, $^{17}_8\text{O}$ et $^{18}_8\text{O}$; $^{14}_7\text{N}$ et $^{15}_7\text{N}$; etc.). L'inégalité de masse influe sur leurs propriétés physico-chimiques (température de fusion, viscosité, vitesse de réaction, constante d'équilibre, ...).

Certains isotopes sont pourvus d'un noyau dont la structure se révèle stable c'est-à-dire qu'ils ne subissent aucune modification au cours du temps en l'absence d'apport d'énergie extérieur. Les isotopes à noyaux instables (radioactifs) cherchent à retrouver la stabilité après émission d'un rayonnement. Tous les isotopes stables sont regroupés autour d'une courbe appelée "la vallée de la stabilité" (figures 9 et 10). Elle correspond au minimum des énergies d'assemblage nucléaire.



Figures 9 et 10 : La vallée de la stabilité (www.web-sciences.com, http://missiontice.ac-besancon.fr/sciences_physiques/physique_chimie/Lycee/physiqueTS/radioactivite/Diagramme_NZ/index.htm)

L'abondance naturelle est définie par la concentration en isotopes présents dans la nature. Les abondances naturelles des principaux isotopes stables impliqués dans les cycles biogéochimiques sont indiquées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Abondance naturelle des principaux atomes de la matière organique (fraction molaire)

Carbone	Oxygène	Hydrogène	Azote
$^{12}\text{C} = 0,988944$	$^{16}\text{O} = 0,9976206$	$^1\text{H} = 0,99984426$	$^{14}\text{N} = 0,996337$
$^{13}\text{C} = 0,01156$	$^{17}\text{O} = 0,0003790$	$^2\text{H} = 0,00015574$	$^{15}\text{N} = 0,003663$
	$^{18}\text{O} = 0,0020004$		

b) Le rapport isotopique

Le rapport isotopique est défini arbitrairement par le rapport de la concentration en isotopes stables rares sur la concentration en isotopes stables abondants: par exemple, $R_c = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $R_o = ^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $R_n = ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

Ces mesures sont réalisables avec nos outils actuels (spectromètres de masse des rapports isotopiques). Pour limiter les fluctuations dues aux appareils et comparer l'ensemble des travaux internationaux dans ce domaine, les rapports isotopiques des échantillons sont comparés à un rapport isotopique standard international (tableau 9) :

Tableau 9 : Les rapports isotopiques des standards internationaux

Rapport isotopique	Standard	Valeur isotopique
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	PDB (Pee Dee Belemnite)	$R=0,0112372$
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	SMOW (Standard Mean Ocean Water)	$R= 2005,2 \cdot 10^{-6}$
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	N_2 atmosphérique	$R= 0,0036765$

Les standards sont choisis pour leur composition isotopique homogène et stable, dans leur plus grand compartiment afin d'être en quantité suffisante, utilisables par l'ensemble des laboratoires internationaux.

- PDB (Pee Dee Belemnite) pour le carbone

Les valeurs isotopiques des échantillons sont exprimées par rapport au $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ d'un rostre de bélemnite (Céphalopode) datant du Crétacé supérieur et issu de la formation rocheuse Pee Dee en Caroline du Sud (Etats-Unis). Il ne s'agit donc pas d'une source inépuisable. Toutefois ce choix se justifie parce que ce fossile appartient aux sédiments calcaires et que les roches carbonatées, essentiellement d'origine marine, représentent environ 80% du carbone de la

lithosphère. Il est assimilé au plus grand compartiment de carbone sur Terre. Il n'existe plus de standard PDB mais d'autres standards ont été calibrés par rapport au PDB, ce qui permet de continuer à utiliser la référence du PDB. Son rapport isotopique, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, est de 0,0112372.

- SMOW (Standard Mean Ocean Water) pour l'oxygène

La référence est le rapport isotopique de l'oxygène océanique pour la dimension du réservoir.

- N_2 atmosphérique pour l'azote

Cet élément compose environ 80 % de la masse atmosphérique, homogénéisée par brassage par les vents.

Une nouvelle notation arbitraire est alors adoptée :

$$\text{la composition isotopique } \delta = \frac{R_{\text{échantillon}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \times 1000, \text{ en } \text{‰}.$$

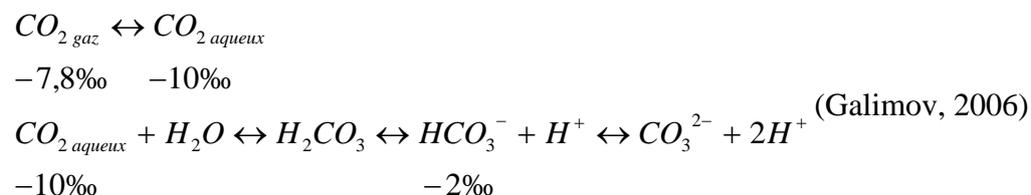
Si $\delta > 0$, la concentration en isotopes lourds dans l'échantillon est supérieure à celle du standard, et inversement. Le δ est proportionnel à la concentration en isotopes lourds ; si δ augmente, la teneur en isotopes lourds également.

c) Le fractionnement isotopique

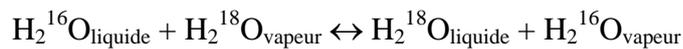
Le fractionnement isotopique correspond à une distribution différente des isotopes entre des composés différents ou entre des phases différentes. Il apparaît au sein de chacun de ces processus :

- La diffusion : le fractionnement isotopique se produit au cours du transport du composé, en fonction de la mobilité des espèces isotopiques. La masse de la molécule est davantage impliquée que celle des atomes (18, 19 et 20 g/mol pour respectivement $^1\text{H}_2^{16}\text{O}$, $^1\text{H}^2\text{H}^{16}\text{O}$, $^1\text{H}_2^{18}\text{O}$).

- Échanges isotopique à l'équilibre : il se produit un échange d'isotopes entre deux composés au sein d'une même phase (par exemple , les carbonates) ou au sein d'un même composé entre deux phases (par exemple, la molécule d'eau en phases liquide et vapeur):



Dans cet exemple, la dissolution du dioxyde de carbone génère un premier fractionnement où les isotopes légers sont plus facilement solubilisés. La réaction avec l'eau engendre un enrichissement en isotopes lourds du carbonate.



Les isotopes légers s'évaporent plus facilement que les isotopes lourds. Ainsi, la vapeur d'eau est plus "légère" ($\delta^{18}\text{O}$ diminue) que l'eau liquide.

- Effet cinétique : Le fractionnement a lieu en présence de réactions (bio)chimiques irréversibles. Les effets cinétiques sont plus importants que les effets à l'équilibre, précisément car les réactions sont unidirectionnelles et amplifient l'effet isotopique. Lors de réactions cinétiques, les atomes légers réagissent plus vite que les atomes lourds. En considérant une réaction enzymatique (substrat \rightarrow produit), la distribution des isotopes légers est majoritaire dans le produit, par conséquent le substrat résiduel est enrichi en isotopes lourds.

Dans le cas où le réservoir est quasi infini (cas du CO_2 atmosphérique), la réaction ne provoque pas de diminution significative de ce réservoir. Le fractionnement reste constant tout au long de la réaction, avec un enrichissement ou un appauvrissement isotopique du produit par rapport au substrat qui est constant. C'est le cas des réactions photosynthétiques. Par contre, dans le cas où la réaction est complète (épuisement du substrat), les isotopes légers réagissent les premiers mais ils sont suivis des isotopes lourds. Le produit prend alors l'empreinte isotopique du substrat.

2. Les isotopes dans les cycles biogéochimiques

L'abondance naturelle des divers isotopes des éléments constitutifs de la matière est une source d'informations des origines et de la transformation de la matière. Les sciences de l'environnement, notamment la géochimie a été l'une des premières disciplines à s'intéresser à l'analyse isotopique (White, 1997) :

- datation dans les roches, les carottes glaciaires, paléoclimatologie,
- origine des pollutions dans les sédiments, des régimes alimentaires dans les chaînes trophiques,
- visualisation et modélisation des cycles biogéochimiques : O, C, N, ...,
- des cycles biologiques : photosynthèse, respiration, biodégradation, assimilation de l'azote, ...

a) Le fractionnement de l'azote

Le $\delta^{15}\text{N}$ est utilisé dans les études de pollution azotée (identification des polluants, leur source, leur évolution spatiale et temporelle) au sein de l'hydrosphère et de l'atmosphère ainsi que l'étude du cycle biogéochimique azoté (figure 11).

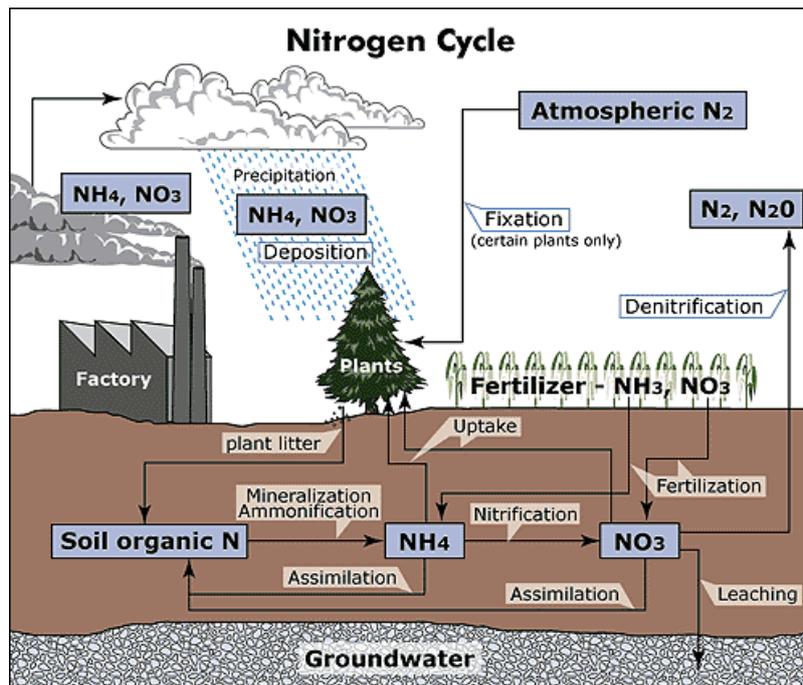


Figure 11 : Le cycle de l'azote

(www.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/nitrogen.html)

La dissolution de N_2 dans l'eau est l'unique fractionnement à l'équilibre, les autres réactions au sein du cycle de l'azote révèlent un fractionnement cinétique (figure 12).

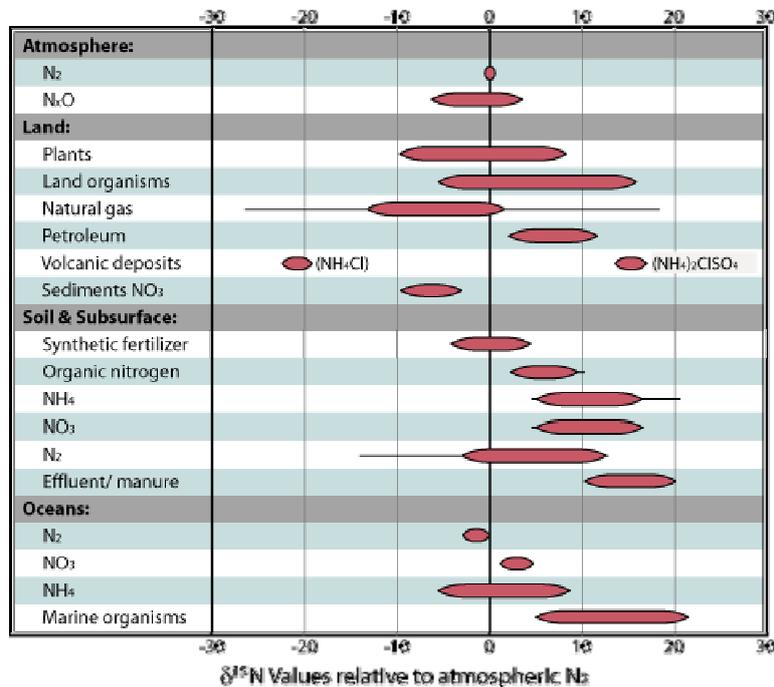


Figure 12 : $\delta^{15}N$ des principaux composés azotés du cycle biogéochimique

(www.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/nitrogen.html)

Une brève analyse de ce graphique montre que les principales transformations de l'azote opèrent un enrichissement en isotopes lourds (minéralisation, assimilation, décomposition), un appauvrissement (dénitrification) ou un fractionnement négligeable (nitrification).

b) Le fractionnement de l'oxygène

La vapeur d'eau est plus riche en isotopes légers que l'eau liquide ($\delta^{18}\text{O}_{\text{vapeur}} < \delta^{18}\text{O}_{\text{liquide}}$). Le fractionnement devient constant (absence d'équilibre) si le vent évacue la vapeur produite au dessus d'une eau qui stagne (lac). Ainsi, les nuages possèdent une signature isotopique inférieure à celle des océans qui leur ont donné naissance.. Au cours de la condensation, les isotopes lourds passent plus facilement en phase liquide. Donc la pluie est plus "lourde" que les nuages dont elle est issue (figure 13).

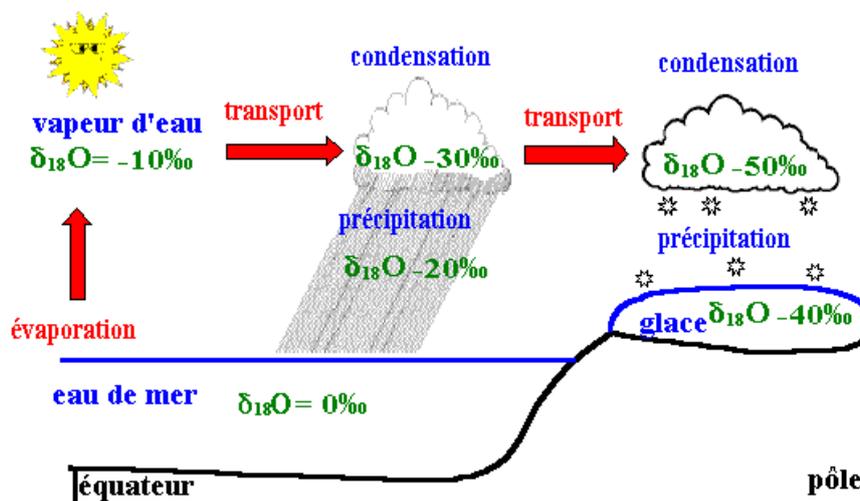


Figure 13 : Le fractionnement de l'oxygène au cours du cycle de l'eau

(www.inrp.fr/biotic/environ/paleoclimats/html/paleoO18.htm)

Le fractionnement est accentué avec la température qui augmente le phénomène d'évaporation. Ainsi, les nuages formés en été sont isotopiquement plus légers que ceux d'hiver. Les isotopes peuvent servir de traceurs des fronts de recharges hivernaux et estivaux et permettent de'identifier les vitesses d'infiltrations et les mécanismes d'écoulement.

c) Le fractionnement du carbone

Le dioxyde de carbone atmosphérique est appauvri en ^{13}C par rapport aux carbonates marins. Il existe des différences entre le CO_2 atmosphérique au dessus des océans et celui des continents. Ce dernier se révèle plus négatif en raison des mélanges de CO_2 d'origine biosphérique et anthropique (combustion des produits fossiles, notamment). De la même

façon, le CO_2 tellurique dépend de la nature de la matière organique présente (respiration microbienne et racinaire) et peut se révéler beaucoup plus négatif que le CO_2 atmosphérique.

La biomasse végétale principalement synthétisée à partir du CO_2 atmosphérique (photosynthèse) subit un fractionnement cinétique pour les plantes dites C3 et CAM (Crassulacean Acid Metabolism) et un double fractionnement (cinétique et à l'équilibre) pour les plantes dites C4.

Fruit d'une lente dégradation, les matières fossiles sont les plus négatives. La signature isotopique est inférieure à -30‰ pour les produits d'origine pétrochimique et peut atteindre -70‰ pour le gaz naturel (figure 14).

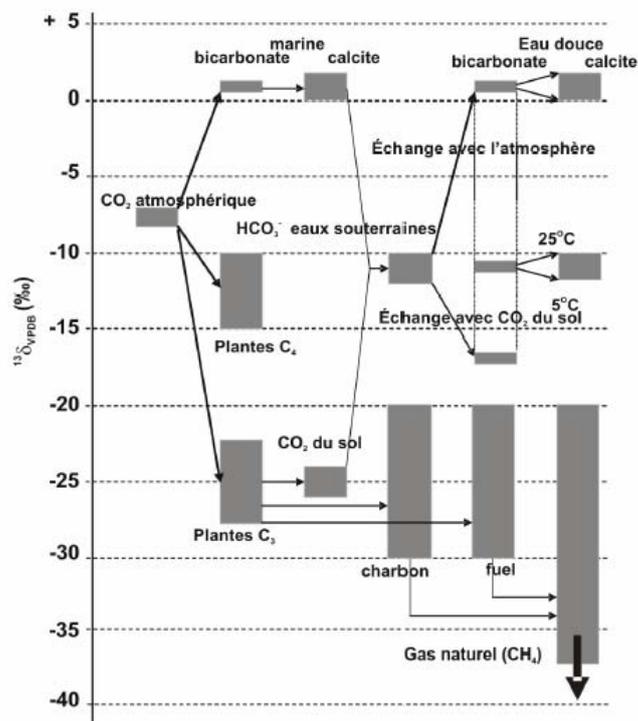


Figure 14 : $\delta^{13}\text{C}$ des composés carbonés (www.cerege.fr)

3. Les plantes C3 et C4

Les végétaux peuvent être classés en plusieurs catégories selon les premières molécules organiques formées lors de la fixation du CO_2 au cours de la photosynthèse :

- **C3** : le premier produit résultant de la fixation du CO_2 est un composé à trois atomes de carbone, le phosphoglycerate.
- **C4** : le premier produit est un composé à quatre atomes de carbone, l'oxaloacétate.
- **CAM** (Crassulacean Acid Metabolism) : le premier composé peut être un composé à trois ou à quatre atomes de carbone, selon que la fixation du CO_2 s'effectue à l'obscurité ou à la lumière.

Il se produit, lors de la photosynthèse, un fractionnement isotopique entre le CO₂ atmosphérique et la biomasse végétale qui est appauvri en ¹³C.

$$^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ des plantes C3 : } R = 0,0109338 \rightarrow \delta^{13}\text{C} = -27\text{‰}$$

$$^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ des plantes C4 : } R = 0,0111136 \rightarrow \delta^{13}\text{C} = -11\text{‰}$$

$$^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ des plantes CAM : } R = \rightarrow \delta^{13}\text{C} = -13 \text{ à } -27\text{‰}$$

a) Les plantes C3

Les plantes C3 sont composées d'un seul type de cellules mésophylliennes. L'assimilation du CO₂ atmosphérique s'effectue dans ces cellules à l'aide d'une enzyme, la ribulose biphosphate carboxylase, plus connue sous le nom de rubisco. Cette étape est la première du cycle de Calvin (figure 15). Cette voie d'assimilation est majoritaire et utilisée chez la plupart des espèces végétales des zones tempérées.

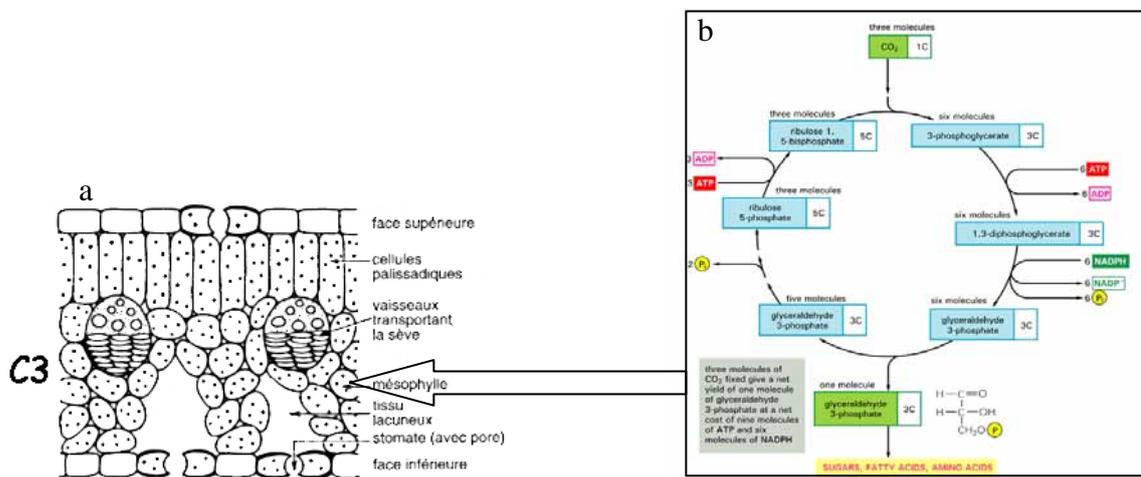


Figure 15 : L'incorporation du CO₂ atmosphérique chez les plantes en C3. a. Anatomie ; b. Le cycle de Calvin (<http://ead.univ-angers.fr>)

La diffusion du CO₂ de l'air ambiant vers la feuille à travers les stomates et la fixation du CO₂ par la Rubisco sont deux étapes qui discriminent (respectivement 4,4‰ et 30‰) le ¹³C, favorisant l'assimilation de l'isotope léger (Ghashghaie *et al.*, 2001). Les plantes en C3 possèdent une signature isotopique vers -27‰.

b) Les plantes C4

Les plantes C4 possèdent une anatomie différente (figure 16). Deux types de cellules interviennent dans l'assimilation du CO₂ :

- les cellules du mesophylle, dépourvues du rubisco, intègrent le carbone sous forme de carbonate HCO₃⁻ grâce à la phosphoénol pyruvate carboxylase (PEPc).

- les cellules de la gaine périvasculaire, pourvues de rubisco, décarboxylent l'oxaloacétate et intègrent le CO₂ dans le cycle de Calvin.

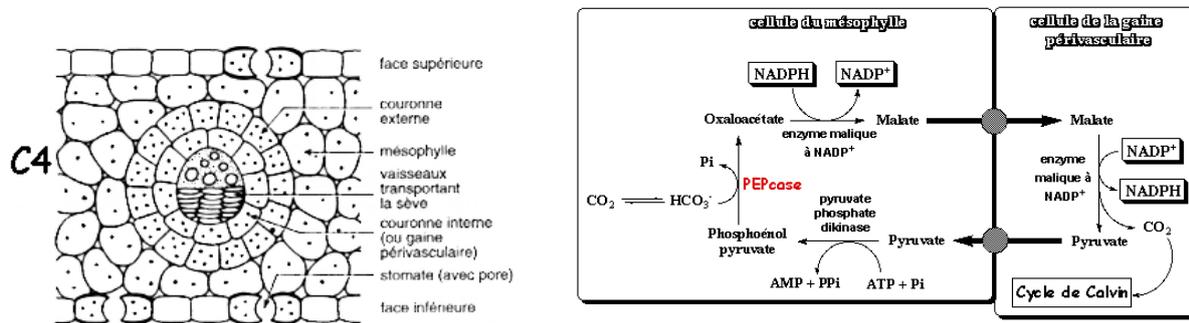


Figure 16. L'incorporation du CO₂ atmosphérique chez les plantes en C4

(<http://ead.univ-angers.fr>)

Les plantes en C4 discriminent moins que les plantes en C3. Les isotopes lourds sont plus facilement solubilisés, donc l'hydratation du CO₂ atmosphérique dans la solution cytoplasmique engendre un enrichissement isotopique en ¹³C des carbonates par rapport au CO₂. La PEPc discrimine moins que la rubisco en raison des vitesses de réaction différentes. La troisième raison est l'étanchéité des cellules de la gaine périvasculaire : l'ensemble du CO₂ (¹²CO₂ et ¹³CO₂) issu de la décarboxylation dans les cellules de la gaine périvasculaire est utilisé par la Rubisco. Dans ce cas, elle n'est pas discriminante.

c) Les plantes CAM

Les plantes CAM ont une structure anatomique similaire à celle des plantes C3 et une incorporation du CO₂ atmosphérique en deux étapes comme les plantes C4. La séparation n'est pas spatiale mais temporelle. Elles possèdent à la fois la Rubisco et la PEPc dans les cellules du mésophylle. La carboxylation s'effectue la nuit (PEPc), la décarboxylation et le cycle de Calvin (Rubisco) se produisent pendant le jour (figure 17).

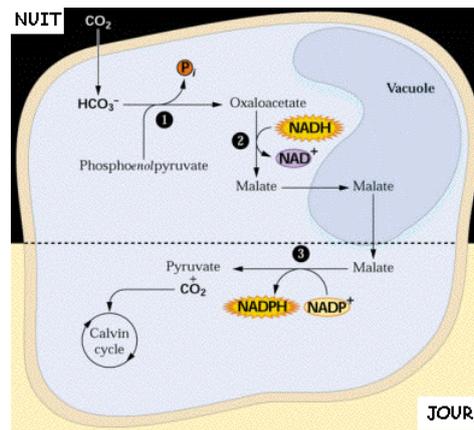


Figure 17 : L'incorporation du CO₂ atmosphérique chez les plantes en CAM (<http://ead.univ-angers.fr>)

La signature isotopique des plantes CAM couvre l'étendue des plantes C3 et C4.

d) Les disparités isotopiques au sein de la plante

Les plantes chlorophylliennes sont autotrophes, la photosynthèse leur permet de fixer le CO₂ atmosphérique pour produire des molécules grâce au cycle de Calvin. Les protéines, les glucides, les lipides, les acides nucléiques sont obtenus par des voies anaboliques différentes, avec une disparité isotopique potentielle. John Hayes (2001) relate le fractionnement isotopique du carbone au sein des voies de biosynthèse. Les lipides sont appauvris en ¹³C par rapport à la plante totale, la cellulose également. Mariotti (1991) trouve que les sucres, la cellulose et les hémicelluloses présentent un δ¹³C équivalent à celui de la plante entière, le radical carboxyle et les pectines sont enrichis en ¹³C alors que la lignine et surtout les lipides sont appauvris en ¹³C. Pour les acides aminés, la fonction acide est enrichie en ¹³C par rapport à l'ensemble de la molécule. Chez les chlorelles, le groupement carboxylique est enrichi de 12‰ pour l'acide glutamique, de 20‰ pour la thréonine et même de 23‰ pour la lysine (O'Leavy, 1981). Par voie de conséquence, les organes des plantes peuvent afficher une signature isotopique légèrement différente. Par exemple, les tiges et les racines de tomates sont appauvris en ¹³C par rapport aux feuilles, les tubercules de pommes de terre sont enrichis (O'Leavy, 1981).

Malgré cette hétérogénéité interne, une disparité isotopique des plantes en C3 et des plantes en C4 se révèle dans la matière organique issue de ces végétaux. Il est possible, en analysant la matière organique du sol, d'identifier le type de végétation source. Ainsi, dans les agrosystèmes, l'étude de l'incorporation de carbone dans les sols est réalisée par une monoculture de plantes C4 sur des sols antérieurement occupés par une végétation C3. L'enrichissement progressif de ¹³C de la matière organique indique la biodégradation

végétale. Dignac *et al.* (2004) ont appliqué cette méthode pour voir la biodégradation et le turn-over des lignines. Une déclinaison de cette stratégie est applicable au maillon manquant de la chaîne, entre la matière végétale initiale et la matière organique finale, les micro-organismes décomposeurs.

En conclusion, un test de biodégradabilité est un système à quatre composantes non imposées mais dépendantes les unes des autres. Le substrat à dégrader en général est connu puisqu'il fait l'objet du test ; les agents biologiques décomposeurs et les conditions de dégradation (milieu, paramètres abiotiques) dépendent du substrat par respect de la représentativité de son milieu récepteur ; le choix de la technique de mesure de la biodégradabilité ne doit pas être négligé car elle est étroitement associée au mécanisme de biodégradation. Par exemple, une perte de masse ne peut pas être la preuve d'une bioassimilation.

Parmi les tests de biodégradabilité existants, l'unique test de bioassimilation actuel est le dosage de CO₂ dégagé par la flore microbienne au cours de la dégradation d'un substrat. Cette voie de minéralisation constitue un des axes de bioassimilation de la matière carbonée mais est limité d'une part au devenir du carbone et d'autre part n'est pas l'unique voie de bioassimilation. En fonction de l'environnement biotique et abiotique, le micro-organisme peut orienter son métabolisme vers la synthèse de biomasse ou vers la synthèse de molécules de réserve. Un nouveau test de bioassimilation est donc nécessaire pour visualiser l'incorporation du substrat dans le métabolisme microbien, indépendamment des voies empruntées. Depuis de nombreuses années, la géochimie utilise les isotopes stables en tant que traceurs pour observer et quantifier certains flux atmosphériques, hydrologiques et/ou géologiques.

A l'issue de cette synthèse bibliographique, nous avons orienté notre étude vers la mise au point d'un nouveau test de bioassimilation par l'utilisation des isotopes stables. Contrairement à une application des tests de biodégradabilité, aucune des quatre composantes n'est identifiée. L'ensemble des différents éléments (substrat, agent biologique, conditions de dégradation, technique de mesure) est à identifier, discuter et choisir en fonction de notre objectif et de nos moyens (financiers, humains et techniques).

Certaines limites se posent naturellement par nos objectifs. En effet, nous avons souhaité estimer la bioassimilation car c'est le seul mécanisme qui assure une insertion du substrat biodégradable dans le cycle de la matière. A l'ère du développement durable et du caractère renouvelable de nos produits de consommation, les bioproduits issus de la valorisation des agro-ressources (annexe 3) s'avèrent être un choix pertinent pour la mise en œuvre et pour le résultat du test de bioassimilation. Leur origine végétale se révèle en adéquation avec la nature de la matière organique recyclée lors des cycles biogéochimiques naturels. Se basant sur ce modèle, les micro-organismes décomposeurs du sol, principaux acteurs de ce recyclage (annexe 4), devraient présenter les caractéristiques attendues pour la bioassimilation. Cette dernière s'évalue par des méthodes indirectes (minéralisation du substrat en CO₂) mais aucun test, à ce jour, ne montre l'incorporation du substrat dans l'organisme décomposeur. Utilisés dans l'observation des flux biogéochimiques, les isotopes servent de marqueurs de localisation et de transformation. Transposés au test de bioassimilation, ils pourraient nous indiquer la présence du substrat initial ou les fragments qui en sont issus dans le décomposeur.

CHAPITRE II

MATERIEL

ET

METHODES

I. Matériel

A. Les substrats de dégradation

1. Les feutres végétaux

Les feutres réalisés à partir de la valorisation des fibres végétales de lin et/ou de betterave sont mis au point par le Laboratoire des Technologies Innovantes et font l'objet d'un brevet. Leurs formulations ne peuvent pas être indiquées. Le feutre à base de lin est symbolisé par la lettre "L" et celui composé d'un mélange de lin et de betterave, par les lettres "LB".

Les fragments de feutres servant à cette étude sont des parallélépipèdes de 5×5×2,5 cm pour L et de 8×7×1,5 cm pour LB. Ils sont placés dans des bocaux de stérilisation de 500mL du commerce avec 10 mL d'eau osmosée pour homogénéiser la stérilisation. Les bocaux sont autoclavés 17 min à 120°C. Le choix de ces paramètres est basé sur le savoir-faire du Laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire afin d'allier une stérilité du milieu sans dégrader les fibres végétales.

2. Les films de paillage

La société commercialisant ces films tient à garder l'anonymat. Nous avons reçu deux échantillons :

- 50m d'un film de polyester de 100µm d'épaisseur dont la référence est KR 103/197 B. Ce film sera symbolisé par la suite par "polyester".
- 50m d'un film contenant de la farine de céréales et des polyesters de 100µm d'épaisseur dont la référence est KR103/197 C. La proportion de chacun des composés est la propriété de l'industriel. Cet échantillon sera symbolisé par la suite par "farine/polyester".

Des fragments (5cm × 7cm x 100µm) sont découpés et disposés dans des bocaux de stérilisation de 500mL. 2mL d'eau osmosée sont ajoutés de façon à homogénéiser la stérilisation. Les échantillons sont autoclavés 17 min à 120°C.

Lors d'une seconde étude, les fragments sont stérilisés par passage dans un bain d'alcool à 70° puis séchés dans un rayon de 20cm autour du bec bunsen (zone de stérilité).

3. Autres films de paillage, le néosac

Deux échantillons de néosacs ont été fournis par Mme Silvestre. Leur composition nous est inconnue. Le neosac 1 (BDB 0308) est transparent et épais, le néosac 2 (HDA 1519) possède une légère coloration beige et une épaisseur plus fine.

Des fragments de 5x5 cm sont découpés, stérilisés par passage dans un bain d'alcool à 70° puis séchés dans la zone de stérilité. Ils sont disposés dans des boîtes de Pétri.

4. Une substance à activité biocide

Une substance à activité biocide (JK05123, Avr 05) a été développée et fournie par ARD (Agro-industrie Recherches et Développements) qui détient sa formulation. L'un des composants entrant dans la formulation est issu de la valorisation des co-produits de l'industrie sucrière. Il se présente sous la forme d'une pâte solide.

5. Un feutre/biocide

Un feutre à base lin a été imprégné par aspersion du biocide cité ci-dessus. Une solution à 1g/L est préparée puis aspergée à l'aide d'un pulvérisateur du commerce sur une seule face, identifiée comme la face supérieure, celle qui sera ensemencée.

Les fragments de feutres lin/biocide et lin témoin de 6x5x1,5 cm sont placés dans des bocaux de stérilisation de 500mL avec 10 mL d'eau osmosée pour homogénéiser la stérilisation. Les bocaux sont autoclavés 17 min à 120°C.

B. La flore

Le Muséum National d'Histoire Naturelle nous a gracieusement fourni trois souches de champignons telluriques sur milieu malt-agar en tubes inclinés :

- *Chaetomium globosum*, n°87.3518, ascomycète soft-rot fungi
- *Phanerochaete chrysosporium*, n°87.3505, basidiomycète, white-rot fungi
- *Trichoderma viride*, n°83.3354, ascomycète, white-rot fungi

1. La conservation des souches

A leur arrivée, les souches sont repiquées sur une gélose malt-agar en boîte de Pétri. La composition du milieu malt-agar est la suivante :

extrait de malt :	20 g/L
agar :	20 g/L

Le milieu est autoclavé 17 min à 120°C, refroidi à 60°C et coulé dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur d'environ 1cm. L'ensemencement est réalisé par étalement du mycélium sur la gélose, à l'aide d'une anse. Après colonisation de la gélose (20°C), les boîtes de Pétri sont conservées en chambre froide (+4°C). Un repiquage est opéré tous les six mois pour la conservation des souches.

2. La culture des souches fongiques en milieu liquide

Trois types de pré-culture sont effectuées : dans un milieu malt, dans un milieu spécifique C3 et dans un milieu spécifique C4. Un test de bioassimilation est réalisé en milieu liquide avec la substance à activité biocide.

- La pré-culture en milieu malt liquide

Cette pré-culture en milieu malt est de composition similaire à la gélose malt en éliminant l'agar.

La composition du milieu malt liquide est la suivante :

extrait de malt :	20 g/L
-------------------	--------

Le milieu est autoclavé 17 min à 120°C.

Le premier ensemencement est réalisé par prélèvement de mycélium à l'anse sur une boîte de Pétri. Un maintien de la culture liquide est effectué par repiquage tous les mois. Les fioles à baffles sont placées dans un incubateur à une température de 27°C et à 110 rpm.

- La pré-culture spécifique C3

La source carbonée utilisée est un sirop de glucose de blé (plante C3) fourni par ARD.

La composition du milieu est la suivante :

Glucose de blé	30 g/L
NH ₄ NO ₃	7 g/L
KH ₂ PO ₄	5 g/L
MgSO ₄	1 g/L

150 mL de milieu sont disposés dans des fioles à baffles puis autoclavés 17 min à 120°C.

Le premier ensemencement a été réalisé à partir d'une culture en milieu malt liquide. Un maintien de la culture en milieu C3 est réalisé par repiquage mensuel. Les fioles à baffles sont placées dans un incubateur à une température de 27°C et à 110 rpm.

- La pré-culture spécifique C4

La source carbonée utilisée est du glucose de maïs (plante C4) fourni par ARD (poudre de maïs cerestar lot BX 200701001) sous forme cristalline. La composition du milieu de culture est la suivante :

Glucose de maïs	30 g/L
NH ₄ NO ₃	7 g/L
KH ₂ PO ₄	5 g/L
MgSO ₄	1 g/L

150 mL de milieu sont disposés dans des fioles à baffles puis autoclavés 17 min à 120°C.

Le premier ensemencement a été réalisé à partir d'une culture en milieu malt liquide. Un maintien de la culture en milieu C4 est réalisé par repiquage mensuel. Les fioles à baffles sont placées dans un incubateur à une température de 27°C et à 110 rpm.

- La culture en milieu liquide avec la substance à activité biocide

La source carbonée utilisée est la substance à activité biocide (JK05123, Avr 05) fournie par ARD. La composition du milieu de culture est la suivante :

Biocide	10 g/L
NH ₄ NO ₃	7 g/L
KH ₂ PO ₄	5 g/L
MgSO ₄	1 g/L

150 mL de milieu sont disposés dans des fioles à baffles puis autoclavés 17 min à 120°C.

L'ensemencement est réalisé à partir des souches pré-cultivées dans les milieux C3 et C4. Les fioles à baffles sont placées dans un incubateur à une température de 27°C et à 110 rpm.

La partie microbiologie (préparation des milieux, stérilisation, incubation, repiquages des différentes souches) est réalisée au sein du Laboratoire de Génie Enzymatique et

Cellulaire (UMR CNRS 6022. 33, rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex 1) avec l'accord de M. J.-N. BARBOTIN (Directeur) sous l'encadrement de M. J.-E. NAVA-SAUCEDO.

II. Méthodes

A. Respirométrie selon la directive OCDE 301F

Un volume mesuré de milieu minéralensemencé, contenant une concentration connue de substance d'essai (100 mg/l de substance d'essai, donnant une DThO d'au moins 50 à 100 mg/l) comme unique source nominale de carbone organique, est soumis à une agitation dans un flacon fermé à température constante (20°C) pendant une durée de 28 jours. La consommation d'oxygène est déterminée en mesurant la quantité d'oxygène (produit par électrolyse) nécessaire pour maintenir un volume gazeux constant dans le flacon respirométrique. Le dioxyde de carbone qui se dégage est absorbé par une solution d'hydroxyde de potassium ou par un autre absorbant approprié. La quantité d'oxygène consommée par la population microbienne lors de la biodégradation de la substance d'essai (corrigée de la quantité d'oxygène consommée par le témoin contenant l'inoculum, mené en parallèle) est exprimée sous forme de pourcentage de la DThO.

Les critères généraux de validité sont :

- La dégradation du produit de référence (acétate de sodium) doit atteindre le niveau seuil de 60% en moins de 14 jours.
- La répétabilité doit être inférieure à 20%.

Les critères spécifiques de validité à l'utilisation du respiromètre sont :

- L'inoculum doit provenir de stations d'épuration d'eaux ménagères.
- Il faut travailler à 100 mg maximum de substance /l (ou à une DThO minimum de 50 à 100 mg/l).
- La consommation du témoin (inoculum seul) doit être comprise entre 20 et 30 mg/l et maximum à 60 mg/l à 28 jours.
- Le pH dans les réacteurs à la fin de la manipulation doit être compris entre 6 et 8,5.
- La dégradation de la substance d'essai doit être supérieure ou égale à 60% dans un intervalle de 10 jours après avoir atteint 10 % de biodégradation et dans tous les cas avant 28 jours.

- Lorsqu'il est réalisé, l'essai de toxicité, mettant en œuvre à la fois la substance à tester et le produit de référence, doit présenter une biodégradation supérieure à 25% de la DThO au bout de 14 jours d'analyse. Sinon, il y a effet inhibiteur et, dans ce cas, il faut recommencer l'essai avec une concentration plus faible de la substance d'essai.

L'appareil est un respiromètre de type IBUK type U1. La durée de l'essai est de 28 jours à 20°C.

B. Observations macroscopiques

Pour le suivi de l'évolution de la colonisation microbienne et de la dégradation macroscopique des agro-matériaux, des photographies sont prises à intervalles de temps réguliers (mensuels) à l'aide d'un appareil numérique SONY DSC-W7 (Sony Corporation, Japan).

C. Observations microscopiques

1. Microscope photonique

Après observation sous la loupe binoculaire, les lames sont disposées sur la platine porte-objet d'un microscope inversé de type IMT2-RTL (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Ce microscope peut être couplé à de nombreuses techniques complémentaires de l'observation classique en fond clair, telle l'observation en fond noir, en lumière polarisée, en contraste de phase, en contraste interférentiel, et en épifluorescence (annexe 5).

Les observations aux microscopes photoniques sont réalisées au Laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire (UMR CNRS 6022. 33, rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex 1) avec l'accord de M. J.-N. BARBOTIN (Directeur) sous l'encadrement de M. J.-E. NAVA-SAUCEDO.

2. Microscopie électronique

Si le vide au niveau du canon à électrons doit toujours être excellent pour réduire la probabilité de collision d'un électron et d'une molécule du gaz résiduel, il est parfois intéressant, au voisinage de l'objet, de maintenir un vide moins poussé. Il permet d'observer, sans les métalliser en surface, les échantillons isolants (matériaux isolants, objets biologiques...) et d'éviter l'altération de certains échantillons par la mise sous vide poussé, qui peut entraîner un dégazage naturel ou une transformation destructrice.

Le MEB « environnemental » (ou ESEM Environmental Scanning Electron Microscopy) permet de différencier fortement les niveaux de vide entre le canon, la colonne électronique et la chambre-objet et de placer la chambre-objet sous pression réduite, voire sous pression atmosphérique. Il permet d'observer des échantillons non conducteurs maintenus en atmosphère à pression élevée, neutre, sèche ou humide.

Les applications se sont particulièrement développées avec l'apparition des microscopes à chambre environnementale.

- En génie biologique : l'observation *in situ* de micro-organismes dans le microscope environnemental sans préparation particulière voire l'observation d'organismes vivants).
- En génie des matériaux : l'observation des microstructures, des états de surfaces, de la matière dite "molle" (matériaux souples (papiers, cartons, cuirs...), des gels (cosmétiques...), des suspensions (encre...), des matériaux fortement hydrophiles, etc.).

Les observations au microscope électronique sont réalisées au Laboratoire de Réactivité et Chimie du Solide (LRCS) (UMR CNRS 6007. 33, rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex 1) grâce à la collaboration de M. B. BEAUDOUIN et de M. J.-E. NAVA-SAUCEDO.

D. Analyse isotopique

Les rapports isotopiques sont mesurés à l'aide d'un spectromètre de masse (Spectromètre de masse des rapports isotopiques ou SMRI). Un échantillon de valeur isotopique inconnue est injecté dans le spectromètre sous forme gazeuse et comparé à un gaz de référence (étalonné par rapport au standard international). Le gaz pur (gaz échantillon ou gaz de référence) est introduit dans la source du SMRI où il est bombardé par les électrons. Le gaz ainsi ionisé est accéléré et projeté sous forme d'un faisceau très fin dans un champ magnétique. Les ions sont déviés sur des trajectoires circulaires en fonction de leur masse. Les ions ainsi séparés arrivent dans trois collecteurs réglés pour collecter les masses 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$) et 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$). Un amplificateur est relié aux collecteurs et amplifie les signaux électriques. Ces derniers sont transmis à un ordinateur qui les convertit en rapport de masses isotopiques, les compare au gaz de référence et indique la valeur de $\delta^{13}\text{C}$.

Différents systèmes peuvent être couplés au SMRI en fonction de la nature de l'échantillon (liquide, solide), avec ou sans purification préalable. Deux équipements

disponibles au Centre de Recherche Pétrographique et Géologique (CNRS, 15 rue Notre Dame des Pauvres, 54501 VANDOEUVRE LES NANCY) sont utilisés, sous l'encadrement de M. C. FRANCE-LANORD (Directeur du Laboratoire des isotopes stables) et formée par M^{me} C. GUILLEMETTE.

1. EA-IRMS (Elemental analyzer – Isotopes Ratio Mass Spectrometer)

Le rapport isotopique ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) d'un échantillon de matière organique est mesuré sur le CO_2 moléculaire, forme gazeuse de la totalité du carbone de l'échantillon. Le passage de la forme solide à la forme gazeuse est effectué par un analyseur élémentaire (EA 3028) qui permet la combustion de l'échantillon solide en présence d'oxygène dans une atmosphère d'hélium. Les gaz issus de cette combustion sont séparés dans une colonne chromatographique. Le pic d'intérêt passe ensuite, poussé par le flux d'hélium, dans le spectromètre de masse (IRMS Isoprime). La figure 18 décrit le principe de la technique.

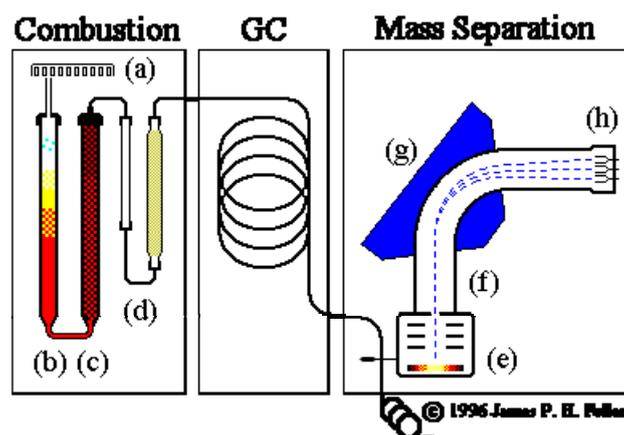


Figure 18 : Schéma descriptif du spectromètre de masse des rapports isotopiques avec analyseur élémentaire.

Le système de combustion est constitué de :

a : le passeur automatique. 1 mg pour du matériel biologique et 0,5mg pour les agromatériaux sont pesés dans un creuset d'étain. Le creuset est fermé par pliages successifs et disposé dans le passeur automatique. Par rotation, le creuset tombe dans la chambre de combustion.

b : la colonne de combustion. Elle est constituée de quartz et chauffée à 1100°C. Une impulsion d'oxygène entraîne la combustion instantanée de l'étain et de l'échantillon organique qu'il contient. Les gaz produits (CO_2 , N_2 , NO_x , H_2O , etc.) sont transportés par un flux constant d'hélium (100 mL/min), gaz inerte.

c : la colonne de réduction. L'excès d'oxygène est capté par un piège de cuivre, à 650°C.

d : la colonne de séchage. Elle retient l'eau.

La colonne chromatographique (3m Porapak Q) à 40°C sépare les différents gaz restant. Le N₂ est élué en premier, le CO₂ est retardé. Le détecteur est un TCD, un appareil qui mesure les variations de conductivité thermique.

Le spectromètre de masse est composé de :

e : la chambre d'ionisation. Le gaz à doser est injecté dans une chambre de volatilisation. Un canon à électrons bombarde les molécules gazeuses qui s'ionisent.

f : le tunnel de vol. Les ions passent dans un champ électrique où ils sont accélérés dans un tunnel.

g : le champ magnétique. Les ions pénètrent dans un champ magnétique intense où ils sont déviés et adoptent une trajectoire circulaire dont le rayon dépend de leurs masses. Les ions sont soumis à une force centripète, les ions légers sont davantage déviés que les ions lourds.

h : les collecteurs. Les ions atteignent différents collecteurs placés pour recevoir certaines masses (44, 45 et 46 pour le dioxyde de carbone). L'impact des ions transmet un signal électrique à un ordinateur qui l'analyse et le transforme en données exploitables (rapport de masses isotopiques puis $\delta^{13}\text{C}$).

2. "Dual inlet" ou double introduction

Le principe est similaire. La première différence se situe un niveau de la préparation de l'échantillon. L'introduction dans le spectromètre s'effectue par une ampoule contenant le gaz à analyser. Ainsi, il faut au préalable et de façon manuelle, opérer la combustion de la matière organique et la purification du CO₂. La seconde différence réside dans la double introduction du gaz à analyser et du gaz référence de façon alternative. Un circuit double, un côté échantillon et un côté référence, amène les gaz au SMRI via deux volumes variables. Le gaz est mesuré alternativement côté échantillon et côté référence. Les volumes variables permettent de travailler avec la même intensité de signal des deux côtés afin de s'affranchir des problèmes de fractionnement isotopique lors de l'ionisation du gaz (le rendement d'ionisation dépendant de la pression en gaz). Cette technique permet ainsi d'atteindre la plus grande précision possible. C'est une méthode plus longue et qui nécessite de la main d'œuvre à cause de la préparation des gaz à la paillasse.

- La préparation des échantillons

Les échantillons sont d'abord conditionnés dans un tube à essai (figure 19).

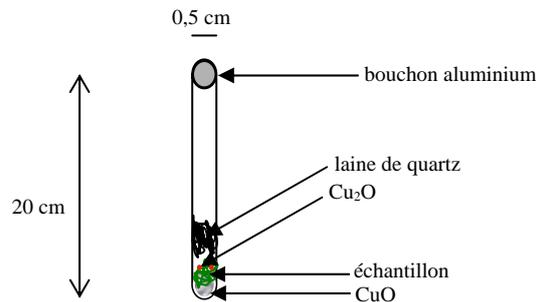


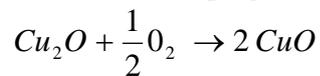
Figure 19 : La préparation des échantillons pour la combustion de la matière organique

L'oxyde de cuivre (CuO) apporte l'oxygène nécessaire à la combustion de la matière organique. Quelques grains sont disposés dans le fond du tube.

L'échantillon est ajouté :

- glucose : ≈ 2 mg
- agro-matériau : ≈ 4 mg
- micro-organismes : ≈ 8 mg

Le Cu_2O est un piège à oxygène en cas de présence d'oxygène dans les échantillons :



La laine de quartz permet de nettoyer les fragments d'échantillon résiduels sur les parois du tube et évite l'entraînement lors du vide d'air.

Les tubes sont séchés sous vide avant d'être scellés à la flamme (figure 20) et identifiés par gravure sur verre.



Figure 20 : Le scellage des tubes à essais à la flamme

- La combustion

Les tubes à essais sont placés dans un four (950°C) pendant une heure (figure 21). Les échantillons sont transformés en carbone inorganique (CO₂).



Figure 21 : La combustion de la matière organique

- Collecte et purification du CO₂

A la sortie du four, l'échantillon est minéralisé sous forme de gaz et de cendres. Il faut collecter le CO₂ et le purifier afin de l'analyser en spectrométrie de masse. La technique utilisée est basée sur l'unique changement d'état du CO₂ (phase gazeuse en phase solide) à -180°C ; les autres gaz restent incondensables dans ces conditions. Le système de purification et le mode opératoire sont présentés en annexe 6.

- Spectromètre de masse

L'ampoule contenant le CO₂ à analyser est placée sur le circuit, sous vide, adjacent au spectromètre de masse. L'ouverture de la vanne permet l'introduction du CO₂ dans le spectromètre de masse VG 602D. Le gaz est introduit à une pression de l'ordre de 10⁻⁷ mmHg, ionisé sur un filament par bombardement d'électrons puis accéléré dans un champ électrique. Le faisceau ainsi formé entre dans un champ magnétique où il est dévié en fonction de la masse des ions. A la sortie du champ, les différentes masses sont mesurées sur un double collecteur Faraday. La mesure sur le double collecteur permet de calculer le rapport des masses. L'échantillon est mesuré en alternance avec un gaz de référence. Le résultat est la déviation du rapport de l'échantillon par rapport à celui de la référence. Il est exprimé en δ¹³C et exprimé en ‰.

Les valeurs de δ¹³C sont calculées à partir des rapports 45/44. La masse 44 correspond à la molécule ¹²C¹⁶O¹⁶O, la masse 45 aux molécules ¹³C¹⁶O¹⁶O ou ¹²C¹⁶O¹⁷O. La contribution de l'oxygène 17 sur la masse 45 est corrigée selon Craig (1957).

La précision au spectromètre de l'ordre du centième de ‰, ce qui est supérieure à la reproductibilité des extractions. La précision des analyses est conditionnée par les erreurs engendrées lors des extractions et est d'environ 0,2‰.

CHAPITRE III

MISE AU POINT D'UN TEST DE BIOASSIMILATION

Actuellement, le seul test de bioassimilation réalisé est le test de Sturm, avec la quantification du CO₂ dégagé par l'activité respirométrique des micro-organismes. Ce test est réalisable en milieu minéral liquide (OCDE 301B), en milieu complexe solide (OCDE 304) et sur support inerte en utilisant des particules minérales comme la vermiculite ou la pouzzolane (Grima, 2002 ; Bellia *et al.*, 1999, Degli-innocenti, 1998, Tosin *et al.*, 1998). L'évaluation de la biodégradabilité s'effectue par le dégagement de dioxyde de carbone, métabolite rejeté par les voies cataboliques microbiennes. La biodégradabilité mesurée est une évaluation de la bioassimilation. Seulement, l'assimilation des molécules organiques est un phénomène complexe qui ne se limite pas au rejet de CO₂. En effet, une grande partie de la matière carbonée est utilisée pour la synthèse de la nouvelle biomasse microbienne, le reste étant distribué entre les métabolites secondaires, les vésicules de réserves et une activité métabolique intracellulaire.

De plus, la flore utilisée dans les tests de biodégradabilité est généralement celle des boues activées ou un lixiviat de sol/compost. Dans tous les cas, la biomasseensemencée comprend différentes espèces qui peuvent se nourrir mutuellement de leur matière organique morte. Ainsi, l'estimation de la biodégradabilité est majorée.

Partant de ces constats, nous avons envisagé de mettre au point un nouveau test de bioassimilation qui permettrait de démontrer le flux de matière du substrat dans la biomasse. Dans une première version, nous nous limiterons à l'étude du flux de matière carbonée dans la biomasse microbienne. Par la suite, une extension de ce test pourra être réalisée sur l'ensemble de la matière organique (C, N, S, P, etc.) et sur l'ensemble des décomposeurs (vers de terre, arthropodes, etc.) voire de l'écosystème local en fonction de l'application de la molécule ou du matériau à étudier. Le but ultime reste la simulation de son cycle de vie dans son milieu récepteur.

La mise au point d'un test de déroule en 3 étapes :

1. Détermination d'un mode opératoire : choix des substrats à dégrader, choix des conditions de dégradation, choix des décomposeurs, choix de la technique d'évaluation de la bioassimilation.
2. Réalisation du test
3. Observations

La validation de ce test sera exposée dans le prochain chapitre (chapitre IV) à travers la bioassimilation de différents agroproduits.

PHASE A

CHOIX DES CONDITIONS

EXPERIMENTALES

La première phase de mise au point d'un test commence par un choix des différents paramètres du test en prenant en compte l'efficacité du test dans un temps raisonnable et avec un coût acceptable. Ainsi chacun des éléments du test a fait, au préalable, l'objet d'une réflexion avec recherche d'informations et calcul de coût si nécessaire.

Tout d'abord, il faut choisir des substrats de dégradation qui nous imposeront des conditions de dégradation en fonction de leurs applications donc de leur localisation dans le milieu récepteur. Ce dernier nous indiquera quels décomposeurs seront présents. Il nous restera à déterminer la méthode d'évaluation de la bioassimilation quand ces différents paramètres seront connus.

I. Choix des substrats

Pour répondre à notre volonté de généralisation du test, il faudrait qu'il soit applicable à la fois sur des molécules et sur des polymères, en milieu liquide et en milieu solide. Le centre de recherche ARD (Pomacle, 51), co-financeur de cette thèse, a proposé une étude sur deux des produits qu'il a mis au point, une résine époxydée à base végétale et un agro-solvant, issu de la valorisation des co-produits des industries céréalières et sucrières. Ces produits étant innovants et protégés, aucune information concernant leur biodégradabilité n'est disponible dans la littérature. Une étude de biodégradabilité rapide (28 jours) est réalisée selon la norme OCDE 301F (respiromètre disponible dans les locaux d'ARD).

A. Les résines époxydées

Les résines époxydées sont des matériaux composés d'un système époxyde-anhydride durcissant à chaud. La polymérisation de ce système conduit à la création d'un polymère thermodur (réseau tridimensionnel). L'intérêt réside dans l'importante variété des propriétés qu'il est possible d'obtenir en faisant varier l'origine botanique de l'huile (souplesse ou rigidité, et tous les intermédiaires). S'incluant dans le contexte stratégique d'ARD, ces matériaux synthétisés à partir d'agro-ressources, sont destinés à remplacer ceux d'origine pétrochimique. Des applications potentielles existent dans des domaines aussi variés que l'équipement automobile, aéronautique ou encore les sports et les loisirs.

L'expérience est réalisée sur les deux types de résines broyées à 0,5 mm, une résine à base de lin et une résine à base de colza. Leur biodégradabilité est évaluée selon la directive OCDE 301F en conditions biotiques et abiotiques et présentée sur la figure 22.

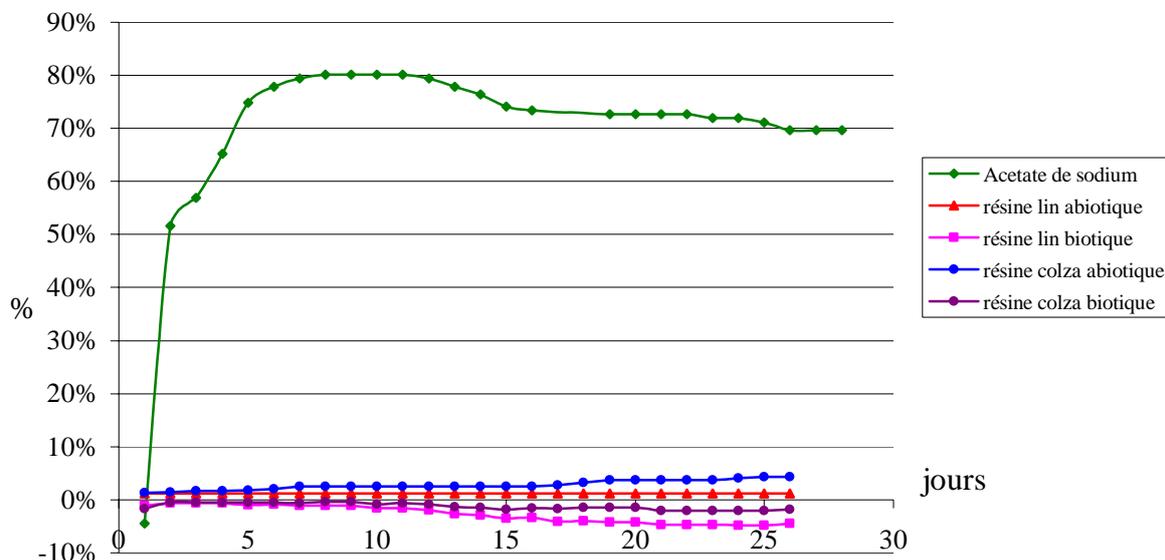


Figure 22 : Biodégradabilité des résines époxydées selon la directive OCDE 301F

Le test est considéré comme valide si :

- La dégradation du produit de référence (acétate de sodium) atteint le niveau seuil de 60% en moins de 14 jours.
- La répétabilité est inférieure à 20%.

La biodégradabilité de l'acétate de sodium est de 65% en 4 jours, la répétabilité entre les deux essais est inférieure à 20% (tableaux de valeurs en annexe 7), le test donc est valide.

Est considérée comme facilement biodégradable une substance dont le taux de biodégradation est supérieur ou égale à 60% en 28 jours. La figure 22 montre qu'aucune des deux formulations de résines époxydées n'est considérée comme facilement biodégradable. D'ailleurs, en se référant aux applications auxquelles elles se destinent, cette non-biodégradabilité est plutôt un gage de qualité mais elles ne constituent pas les substrats potentiels de mise au point d'un test de bioassimilation. La question concernant leur recyclage en fin de vie reste ouverte, en écartant les possibilités de compostage et intégration dans le cycle de la matière organique naturelle.

B. Fus X, un tensio-actif

Cette biomolécule est un alkylpolyglycoside (APG) constitué d'un ou plusieurs sucres pour la partie hydrophile et d'un alcool pour la partie hydrophobe. Ce caractère amphiphile lui procure des propriétés détergentes. Elle est synthétisée à partir de co-produits issus des industries céréalière et sucrière locales. Cette origine végétale pourrait lui conférer un caractère biodégradable qui est vérifié par un test de biodégradabilité facile selon la directive OCDE 301F. Les résultats sont présentés sur la figure 23.

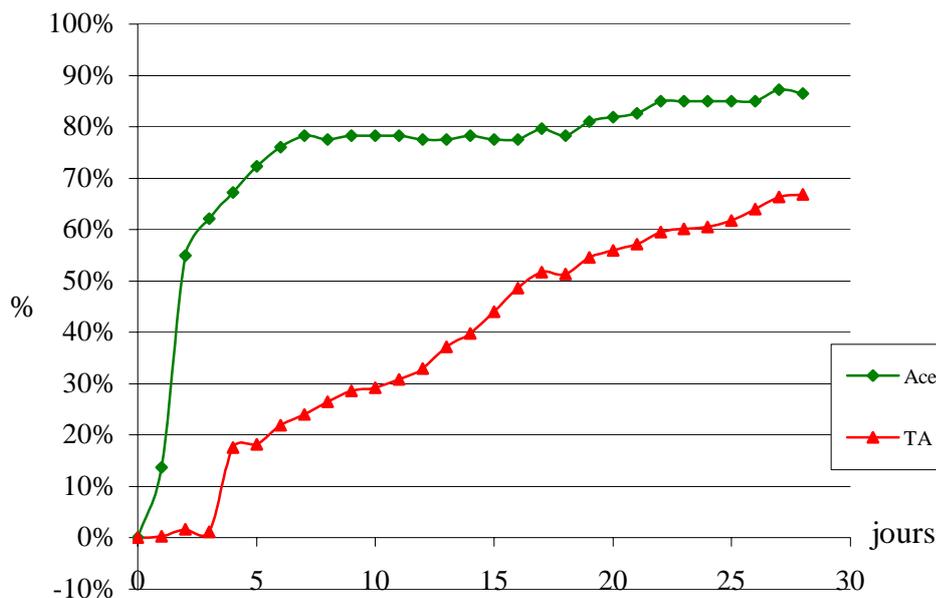


Figure 23 : Biodégradabilité du Fus X selon la directive OCDE 301F

Les critères de validité et de biodégradabilité sont les mêmes que précédemment. Le test est valide et Fus X est considéré comme facilement biodégradable (tableaux de valeurs en annexe 8). Il peut être un substrat de choix pour mettre au point le test de bioassimilation en milieu liquide. Connaissant sa structure moléculaire, Fus X ne pose, en théorie, aucun problème de bioassimilation pour les bactéries présentes dans les boues activées. Sa bioassimilation théorique est précisée en annexe 9. Une biomolécule présentant un doute quant à sa bioassimilation aurait permis d'allier la réalisation du test à la confirmation ou l'infirmité de sa réelle bioassimilation.

Nous arrivons donc au système de biodégradation suivant :

- le substrat : Fus X
- son application : la détergence

- son milieu récepteur : les stations d'épuration
- les décomposeurs : la flore des boues activées
- les conditions de biodégradation : le substrat en unique source de carbone dans une solution minérale, en réacteur, à pH 7, à 20°C, dans le respiromètre IBUK
- l'évaluation de la bioassimilation : à déterminer

Pour visualiser l'incorporation d'une molécule dans la biomasse microbienne, il faut un traceur. Il peut être externe (anticorps, chromophores, fluorophores) ou interne (marquage radioactif ou non). Les traceurs externes peuvent gêner la bioassimilation ou être perdus (hydrolyse, oxydation). Nous choisirons un marquage interne non radioactif. Il faut alors enrichir la molécule en ^{13}C lors de sa synthèse. Suite à des renseignements sur le coût des molécules commerciales marquées (Eurisotop) : 1 gramme de la partie sucre coûte 704 euros et 1g de la partie alcool coûte 6200 euros, le facteur financier non négligeable freine la possibilité d'utiliser Fus X pour démontrer la bioassimilation. Le simple marquage de la partie osidique est alors envisagé mais pose un problème de démarche scientifique (prouver, en 2004, la bioassimilation d'un monosaccharide par des bactéries est inutile voire aberrant).

Toutefois, afin de compléter l'étude du cycle de vie de la molécule Fus X en milieu liquide, un test d'écotoxicité en milieu aquatique (*Daphnia magna*) est réalisé. Le principe et les résultats sont rassemblés en annexe 10. La molécule Fus X n'est pas considérée comme toxique vis-à-vis des daphnies.

Parallèlement à la recherche de solutions pour pallier l'aspect économique (microsynthèse, recherche de financements), d'autres substrats sont envisagés. Ils doivent être biodégradables mais également présenter un caractère complexe qui suscite un doute quant à leur bioassimilation. Le test de bioassimilation permettra de lever le doute, positivement ou négativement.

C. Les fibres végétales

Les fibres végétales peuvent être un substrat intéressant car elles possèdent des polymères facilement biodégradables (pectines, hémicelluloses) et des polymères plus récalcitrants (cellulose, lignines). Elles sont biodégradables car s'intègrent dans le cycle biogéochimique du carbone. Le processus d'humification est un phénomène complexe et long qui requiert la participation d'un ensemble de conditions (les décomposeurs, l'humidité, la température, etc.). Parmi les micro-organismes, seule une certaine flore est capable de

dégrader les polymères pariétaux des fibres végétales. Certains micro-organismes sont cellulolytiques, d'autres lignolytiques et cellulolignolytiques pour un faible nombre d'entre eux. Ainsi, parallèlement à la mise au point du test de bioassimilation, notre étude pourrait apporter quelques informations sur les capacités ou non de la flore qui aura été choisie à dégrader la matière végétale. De plus, la cellulose est biréfringente et les lignines émettent naturellement une fluorescence lorsqu'elles sont excitées par des UV. Ces caractéristiques présentent un intérêt pour l'évaluation de la bioassimilation.

L'équipe Ingénierie des matériaux du Laboratoire des Technologies Innovantes (UPJV, Amiens) valorise des co-produits agricoles notamment dans le domaine du bâtiment (bétons de bois, isolants écologiques), de l'automobile (équipement) et de l'horticulture. Des feutres 100% végétaux ont été mis au point à partir de co-produits du lin et/ ou de la betterave et font l'objet d'un brevet.

D. Les plastiques biodégradables

Le secteur des plastiques biodégradables reste encore un thème de discordance entre les industriels et les scientifiques oeuvrant dans le domaine de l'environnement. En effet, le terme biodégradable est très général et englobe différents processus (cf chapitre I, I. La biodégradation). En fonction des techniques d'évaluation utilisées, certains résultats ne se réfèrent qu'à une partie du processus de biodégradation. Par exemple, les tests d'enfouissement dans le sol ne peuvent montrer qu'une biodétérioration, la partie superficielle de la biodégradation. La disparition de matière ou la perte de masse évoque une biodégradation sans aucune assurance qu'elle ait été réalisée par des agents biologiques (hydrolyse, oxydation abiotique notamment par les rayons du soleil) ni que les polymères plastiques aient servi de nutriments aux micro-organismes (fragmentation par des pro-oxydants). Une confusion subsiste dans le secteur des paillages agricoles biodégradables concernant le caractère fragmentable des films plastiques. Ce test de bioassimilation permettrait de s'assurer que la flore utilise le film comme source nutritive.

La société nous ayant fourni les films de paillage agricole tient à garder l'anonymat.

E. Les substances à activité biocide

Tous les nouveaux produits chimiques mis sur le marché doivent être considérés comme biodégradables selon la directive 67/548/CEE. Survient alors un non-sens pour les

substances à activité biocide. Comment une substance dotée de cette propriété peut-elle être testée ?

Le centre de recherche ARD a mis au point une molécule dotée d'activité biocide à partir des co-produits de l'industrie sucrière. La molécule a subi un test de biodégradabilité selon la directive OCDE 301F. Elle est considérée comme non facilement biodégradable. Cette molécule considérée comme non biodégradable par les tests normés serait-elle persistante au sein de l'environnement ou s'intégrerait-elle dans les cycles biogéochimiques ?

Nous possédons donc différents substrats d'études à la fois des polymères et des molécules, à tester en milieu solide ou liquide. Le test de bioassimilation doit s'avérer représentatif de leur milieu récepteur (tableau 10) :

Tableau 10 : Identification des milieux récepteurs pour chaque substrat d'étude

Substrats	Applications envisagées	Milieu récepteur	Recyclage
Fibres végétales	Isolation	Atmosphère confinée	Compostage, valorisation agricole
	Equip. automobile	Atmosphère confinée	
	Horticulture	sol	
Film plastique biodégradable	Paillage agricole	sol	Compostage, valorisation agricole
	Emballage	Multi-usage	
Substance à activité biocide	Algicide, bactéricide, fongicide	Multi-usage	

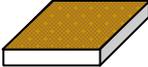
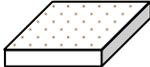
Les applications sont variées mais un test sur sol paraît convergent pour les deux substrats solides. La substance soluble sera testée en milieu liquide. Pulvérisée sur les cultures agricoles, elle se retrouvera dans la phase liquide du sol et sera au contact de la flore du sol.

II. Choix des conditions de biodégradation

Plusieurs scénarii ont été envisagés (tableau 11) :

1. Une biodégradation en sol reconstitué,
2. Un ensemencement du substrat par un lixiviat de sol
3. Une inoculation par des micro-organismes appropriés (possédant le système catalytique adéquat).

Tableau 11 : Choix du milieu de biodégradation

	<u>Scénario 1</u> Sol reconstitué	<u>Scénario 2</u> Flore d'un lixiviat	<u>Scénario 3</u> Micro-organismes sélectionnés
			
Avantages	- Proximité avec le milieu récepteur	- système simplifié - flore du milieu récepteur	- facilité d'interprétation - Extraction aisée de la biomasse néosynthétisée
Inconvénients	- système complexe - difficulté d'interprétation (interactions matrice-substrat, matrice-flore, substrat-flore) - difficulté d'extraire la biomasse néosynthétisée	- invasion microbienne - difficulté d'extraire la biomasse néosynthétisée	- Faible représentativité du milieu récepteur

Dans les trois scénarii, le coût est raisonnable, mais il faut prendre en compte le facteur temps (temps de colonisation des micro-organismes, temps de dégradation, temps d'extraction de la biomasse et temps d'analyse). Pour une première version du test, nous avons choisi le scénario le plus simple, le troisième, une monoculture sur un unique substrat, à température ambiante sous hotte stérile pour éviter les contaminations. En fonction de la rapidité d'obtention des résultats et de la difficulté ou non à les interpréter, le test pourra être amélioré.

III. Choix de la flore

La flore doit être représentative des milieux telluriques, être efficace sur nos différents substrats (compétences lignocellulolytiques pour dégrader les fibres végétales et esterasiques sur les films plastiques). Quatre groupes microbiens répondent à ces critères : les bactéries non filamenteuses, les actinomycètes, les basidiomycètes et les ascomycètes (tableau 12) :

Tableau 12 : Les activités catalytiques pour différents micro-organismes

Micro-organismes	Milieu récepteur	Activité dégradation	Culture
BACTERIES NON FILAMENTEUSES			
<i>Pseudomonas</i>	Ubiquitaire : sols, végétaux, eaux douces et marines	- Cellulolytique - Xénobiotiques	Chimioorganotrophe, Aérobie strict, 4 à 43°C
<i>Clostridium thermocellum</i>	Boues activées Matière organique	- Cellulolytique - Hémicellulolytique	Immobile, sporule FC : biotine, VitB12, 60-64°C – 37°C
<i>Ruminococcus</i>	Rumen	- Lignocellulolytique	Chimioorganotrophe, Anaérobie, 37-42°C
ACTINOMYCETES			
<i>Cellulomonas</i>		- Lignocellulolytique - Hémicellulolytique	Chimioorganotrophe 30°C, pH neutre, Aérobie
<i>Streptomyces viridosporus</i> <i>S. setonii</i> <i>S. thermocarboxydus</i>	Ubiquitaire	- Lignolytique - Polyesters	Colonisation de surface
<i>Microbispora</i>	Sols prairies Sols cultivés	- Lignocellulolytique - Polyesters	Thermophile
<i>T. fusca</i>		- Cellulolytique - Dépolymérisation	Thermophile
ASCOMYCETES			
<i>Aspergillus niger</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. spp</i>	Ubiquitaire Champignon filamenteux du sol, débris végétaux, fruit&légumes	- Polyesters - Cellulolytique - Hémicellulolytique - Composés aromatiques non complexes	3 à 5 jours
<i>Cladosporium</i>	Saprophyte du	- Cellulolytique	10 jours, 6 à 32°C,

<i>herbarum</i>	sol, plantes, céréales Intestin de la chenille	- Composés aromatiques - Plastifiants	Résiste aux UV Allergisant
<i>Fusarium solani</i>	Air, eau, sol, plantes	- Structures aromatiques - Lignocellulolytique	Croissance rapide Phytopathogène
<i>Trichoderma reesei</i>	Sol humide	- Cellulolytique - Hémicellulolytique	Croissance rapide
<i>T. viride</i>		- Lignocellulolytique	
BASIDIOMYCETES			
<i>Agaricus bisporus</i>	Prairies, forêts	- Lignocellulolytique	Humidité
<i>Gloeophyllum trabeum</i> (BRF)		- Dégrade le bois	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (WRF)	Sols	- Lignolytique - Dégradation non spfq - Dépollution xénobiotiques - Copolymères styène/lignine	
<i>Pleurotus ostreatus</i>		- Lignocellulolytique, - Métabolise hémicelluloses - Dépollution xénobiotiques - Copolymères styène/lignine	
<i>Trametes versicolor</i> (WRF)	Ubiquitaire	- Lignocellulolytique - Acide oxalique/métaux - Dépollution xénobiotiques - Copolymères styène/lignine	

Notre choix, dans un premier temps, s'est orienté vers le règne des mycètes, pour leurs conditions de culture (mésophiles, croissance rapide en milieu liquide comme en milieu solide, ...), pour leur large spectre de dégradation (polyosides, polyphénols, polyesters, etc.), pour leur propriété d'hétérotrophie (utilisation du carbone des molécules organiques) et pour leur représentativité écologique tellurique. De plus, les champignons augmentent leur

biomasse par croissance mycélienne. Il sera ainsi plus facile de prélever les filaments aériens néosynthétisés.

Parmi les mycètes, nous devons choisir entre les zygomycètes, ascomycètes, basidiomycètes et soft-rot fungi, brown-rot fungi et white rot-fungi, deux classifications différentes mais qui se superposent. Suite aux conseils de Mme Dupont du Museum National d'Histoire Naturelle de Paris, notre choix s'est porté vers trois souches :

- *Chaetomium globosum*, ascomycète, Soft-Rot Fungi
- *Trichoderma viride*, ascomycète, White-Rot Fungi
- *Phanerochaete chrysosporium*, basidiomycète, White-Rot Fungi

Cet éventail couvre les différents groupes existants et semble représentatif de la flore tellurique des sols cultivés (figure 24).

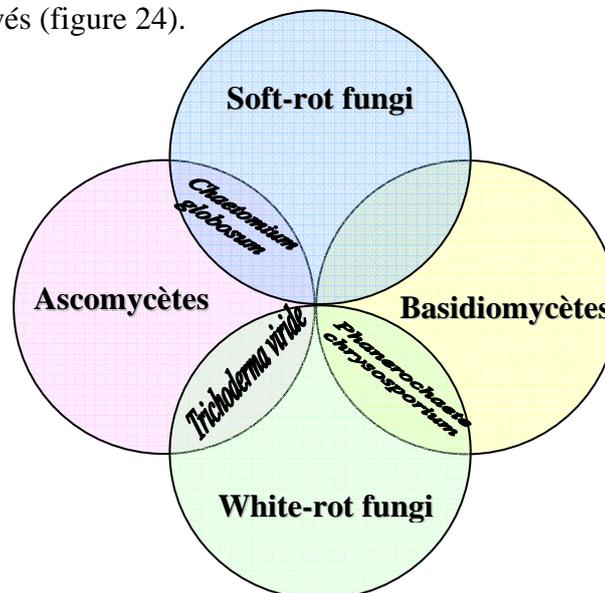


Figure 24 : La répartition des souches telluriques au sein des deux classifications des mycètes

La première partie de l'étude est réalisée avec deux souches pour des raisons de disponibilité spatiale, d'équipement et de matériel d'incubation. En raison de leur large spectre d'actions (lignocellulolytique et dépollution des xénobiotiques par exemple), les deux souches de la pourriture blanche (White-Rot Fungi) sont choisies. Cette étude sera poursuivie avec *Chaetomium globosum* et éventuellement d'autres souches appartenant aux Brown-Rot Fungi (ascomycètes et basidiomycètes) afin d'observer et de comparer les comportements fongiques.

IV. Choix de l'évaluation de la bioassimilation

Comment visualiser le transfert de matière carbonée du substrat vers le micro-organisme ?

Nous avons vu que sur une molécule l'enrichissement isotopique est trop onéreux, il n'est absolument pas envisageable sur des polymères. Nous avons donc adopté une nouvelle démarche : l'association d'observations de la croissance de biomasse microbienne et de la dégradation de polymères (sources uniques carbonées) devrait nous fournir des informations quant à la bioassimilation des polymères. En effet, en utilisant le polymère comme source unique de nutriments, la prolifération abondante de micro-organismes hétérotrophes (besoin d'atomes de carbone issus d'une source organique) chimioorganotrophes (besoin d'une source organique pour l'énergie et les électrons) indiquent la bioassimilation du polymère. Différentes techniques sont alors envisagées (tableau 13) :

Tableau 13 : Différentes techniques permettant l'évaluation de la bioassimilation

Observations de la croissance microbienne et de la dégradation des polymères	
Microscopie photonique	<p>Il existe différents procédés permettant d'orienter la lumière sur l'échantillon. Le fond clair, configuration habituelle, permet de voir les structures qui absorbent une partie de la lumière (mycélium, parois végétales, ...). Pour le fond noir, les rayons lumineux provenant du condenseur ne pénètrent plus directement dans l'objectif. Un ensemble de miroirs concaves les converge vers la préparation, ainsi seule la lumière diffusée par celle-ci pourra pénétrer dans l'objectif et servira à former l'image. Les parties de l'échantillon qui ne diffusent pas de lumière d'éclairage apparaîtront noires ; à l'inverse les zones de la préparation qui la diffuseront seront lumineuses sur fond noir. Le contraste de phase permet d'assombrir optiquement l'objet en appliquant un retard de phase à l'onde d'éclairage. Un polariseur placé après la source lumineuse permet d'obtenir une lumière polarisée. Les structures cristallines, comme les chaînes parallèles de cellulose, apparaissent biréfringentes en lumière polarisée. Deux rayons polarisés perpendiculairement peuvent être retardés différemment lors de la traversée de l'échantillon, en fonction des indices de réfraction ou de l'épaisseur (contraste interférentiel). A l'aide d'un filtre</p>

	<p>spécifique, un échantillon est excité à une longueur d'onde définie (λ_{exc}) et émet la lumière à une certaine longueur d'onde (λ_{em}) (épifluorescence). Les structures aromatiques (lignines, acide téréphtalique, par exemple) sont des fluorophores naturels.</p>
<p>Colorations et chromophores</p>	<p>La réponse à la lumière est parfois insuffisante. L'aide de colorants ou de fluorochromes spécifiques s'avère utile. Le bleu de toluidine colore les polyphénols (lignines, tanins) en vert-turquoise, la cellulose et les pectines en bleu-violet et les protéines en bleu (Akin and Rigsby, 1987). Le rouge neutre colore les domaines hydrophobes de la subérine (Lulai <i>et al.</i>, 1992). La solution de Mirande permet de distinguer les tissus cellulosiques qui fluorescent en vert et les tissus ligneux qui apparaissent en bleu (Mondolot <i>et al.</i>, 2001) en microscopie épifluorescente, avec une excitation dans l'UV. Un fluorochrome bien connu de la cellulose (parois végétales) et de la chitine (paroi mycélienne) est le "calcoluor white ST" [4,4'-bis(anilino-6-bis(2-hydroxyethyl)-amino-s-triazine-ylamino)-2,2'-stilbene disulfonic acid). La fluorescence est visualisable à l'aide d'un microscope à contraste de phase ou en épifluorescence (Choi and O'Day, 1984).</p>
<p>Immunolocalisation</p>	<p>Pour la recherche d'une molécule connue et spécifique, l'immunolocalisation est une technique efficace mais relativement coûteuse, du fait de la synthèse d'anticorps spécifiques. His <i>et al.</i> (2001) ont localisé, à l'aide d'anticorps anti-pectiques, les homogalacturonanes, présents exclusivement dans la lamelle moyenne et à la jonction cellulaire mais absent de la paroi secondaire des cellules végétales de lin. En revanche, les rhamnogalacturonanes, galactanes et arabinanes sont abondamment distribués dans les parois secondaires des fibres de lin matures. Afin de faciliter la visualisation, les anticorps peuvent être couplés à un fluorochrome : anticorps anti-cellulose couplé à rhodamine (Taylor <i>et al.</i>, 1996), anticorps anti-cellulose couplé à fluorescéine (Linder <i>et al.</i>, 2002).</p>
<p>Microscopie électronique à balayage</p>	<p>La microscopie électronique à balayage permet l'observation de la dégradation des tissus ou des polymères à la</p>

	<p>surface des échantillons. Elle fournit des informations sur les relations entre les micro-organismes et leur substrat (Varel <i>et al.</i>, 1991 sur la cellulose ; Akin <i>et al.</i>, 1995 sur la lignocellulose ; Dongowski, 2001 sur les pectines). La microscopie électronique à balayage possède différentes déclinaisons, comme chaque technique, par couplage avec des différents procédés afin d'obtenir des informations plus précises. Pour citation, sans approfondir ces domaines, Micic <i>et al.</i> (2004) ont exploré les propriétés physico-chimiques des lignines (notamment propriétés rhéologiques différentes de certaines régions), de la macromolécule individuelle à l'assemblage supramoléculaire (NSOM (Near-Field Scanning Optical Microscopy) couplée à l'AFM (Atomic Force Microscopy)) ; Fromm <i>et al.</i> (2003) ont étudié la distribution des lignines dans les parois cellulaires en utilisant la FE-SEM (Field-Emission-Scanning Electron Microscopy) et Radotic <i>et al.</i> (2001), l'organisation fractale des lignines (Scanning tunneling microscopy). L'autofluorescence des lignines se visualise également par CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) (Barsberg and Nielsen, 2003).</p>
<p>Microscopie électronique à transmission</p>	<p>La microscopie électronique à transmission permet l'observation des structures des parois et le mode de dégradation par les micro-organismes. L'identification de l'action des micro-organismes est ainsi plus précise. Rhoads <i>et al.</i> (1995) mettent en évidence que <i>Serratia marcescens</i> utilise ses polysaccharides pariétaux (glycocalix) pour s'attacher aux cellules végétales et dégrade les composants des parois secondaires fortement lignifiées. Plus spécifique qu'un micro-organisme, l'effet enzymatique est observable. Par exemple, Lequart <i>et al.</i> (2000) montrent des modifications significatives au niveau des polymères cibles lors de l'ajout d'une xylanase sur la paille de blé.</p>
<p>Evaluation de la transformation moléculaire</p>	
<p>Spectroscopie UV-visible</p>	<p>Les noyaux aromatiques absorbent à 280 nm, comme les monomères de lignines (alcool sinapylique et coniférylique) (Xiao <i>et al.</i>, 2001). Les esters d'acides hydroxycinnamiques (acides</p>

	<p>coumariques et féruliques, notamment) absorbent vers 310-320 nm. Akin <i>et al.</i> (1996) ont étudié la biodégradation de tiges de blé par deux champignons de la pourriture blanche, <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> et <i>Cyathus stercoreus</i>, en dissociant chaque tissu (épiderme, sclérenchyme, tissu adjacent au phloème et parenchyme). Excepté l'épiderme, la biodégradation de la lignocellulose engendre une diminution de l'absorbance des pics spécifiques à 280 et 320 nm. Il semble que les monomères de lignines soient transformés par les micro-organismes en molécules non aromatiques. Une autre équipe travaillant sur la matière organique dissoute issue de la biodégradation de la matière végétale dans le sol (Kalbitz <i>et al.</i>, 2003) trouve une augmentation de l'absorption UV à 280 nm, indiquant un enrichissement aromatique de la matière organique dissoute. Dans ce cas, les monomères de lignines ne sont pas minéralisés et sont directement convertis en matières humiques.</p>
<p>Spectroscopie de fluorescence</p>	<p>De la même façon que pour la microscopie, les noyaux aromatiques sont des fluorophores naturels et émettent donc de la fluorescence, mesurée par un spectrofluoromètre. En concordance avec les résultats obtenus par analyse UV, Kalbitz <i>et al.</i> (2003) constatent une augmentation de la fluorescence de la matière organique dissoute après biodégradation, reflet de son enrichissement en molécules aromatiques, donc de la dégradation des lignines et des tanins. La présence de liaisons aryl-carbonyles conjuguées influencent la fluorescence et la réduction des lignines augmentent l'intensité de la fluorescence (Machado <i>et al.</i>, 2001).</p>
<p>Spectroscopie IR-Raman</p>	<p>La spectroscopie infra-rouge étant basée sur les énergies de liaisons (vibration, rotation, élongation), toute modification au niveau des liaisons moléculaires entraîne un changement spectral. Elle est adaptée à l'étude des polymères et de leur dégradation (Zaccheo <i>et al.</i>, 2002). La dégradation des parois végétales entraîne une modification de l'intensité des pics, la disparition ou l'apparition de nouveaux pics, signifiant une néosynthèse moléculaire. Une analyse IR a été effectuée pendant un</p>

	<p>compostage (Baddi <i>et al.</i>, 2004). Le pic à 1540 cm^{-1}, représentatif des peptides, diminue, reflétant leur dégradation. Les pics à 1650 cm^{-1} et 1511 cm^{-1} augmentent, indiquant l'enrichissement en doubles liaisons C=C aromatiques caractéristiques des acides fulviques et humiques (humification).</p> <p>La spectroscopie Raman n'utilise que la partie diffusée lors de l'excitation d'un échantillon. L'effet Raman repose sur un changement de polarisabilité des électrons, une vibration d'élongation positive en IR deviendra négative en Raman. Edwards <i>et al.</i> (1997) dévoilent un tableau présentant les longueurs d'onde des réponses vibrationnelles des plantes ligneuses (ramie, sisal, lin, coton, ...) et leur identification. Par application du même principe, la dégradation des fibres entraîne la diminution de pics spécifiques de certains groupements et l'apparition de nouveaux pics. Plus intéressant pour notre étude, certains chercheurs présentent les spectres Raman des polymères pariétaux, à savoir cellulose, hémicellulose, pectines et lignines (Himmelsbach <i>et al.</i>, 1999 ; Kacurakova <i>et al.</i>, 1999). Ils utilisent un microscope IR-Raman pour observer la distribution des composés chimiques du lin.</p>
<p>Spectroscopie de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)</p>	<p>Les modifications chimiques transforment l'environnement des atomes, qui résonnent différemment. Gilardi <i>et al.</i> (1995) ont étudié la biodégradation de la lignocellulose par deux champignons, un appartenant au groupe de la pourriture brune (<i>Coniophora puteana</i>) et l'autre, à la pourriture blanche (<i>Coriolus versicolor</i>). Les spectres RMN révèlent une augmentation des teneurs en carbonyles traduisant une rupture des noyaux aromatiques des lignines, des clivages des chaînes aromatiques et des oxydations des chaînes aliphatiques. En accord avec la littérature, cette équipe de recherche précise que les champignons de la pourriture brune dégraderaient préférentiellement les polysaccharides, laissant des lignines chimiquement modifiées et les champignons de la pourriture blanche décomposeraient polyosides et lignines, Dans un milieu complexe, Vincelas-Akpa et Loquet (1997) caractérisent, par cette méthode, la transformation</p>

	de la matière organique en compost. L'interprétation montre une dégradation rapide des polysaccharides, une nette ligninolyse (déméthylations) et la production de nouvelles molécules aromatiques, exprimant la mise en œuvre du processus d'humification.
HPLC, CPG	Des dosages de produits spécifiques sont possibles, notamment les différents sucres, les monolignols et leurs dérivés aldéhydes ou acides, les acides humiques, ... Mais, il est nécessaire, au préalable de purifier les lixiviats obtenus. En effet, ceux-ci sont d'une grande richesse et complexité moléculaires.

Dans un premier temps, nous avons choisi une observation microscopique car elle permet de voir la croissance microbienne ainsi que la dégradation des polymères. La présence, la disponibilité, le savoir-faire et un coût raisonnable ont orienté notre choix vers la microscopie photonique avec ses différentes options et la microscopie électronique à balayage pour affiner les observations.

Nous avons sélectionné une technique permettant de visualiser la biodégradation sans toutefois démontrer de façon irréfutable la bioassimilation, notre objectif n'est pas encore atteint. En poursuivant les investigations dans la littérature, nous avons élargi notre champ de recherche à l'ensemble des traceurs environnementaux (datation, réseaux trophiques, cycle biogéochimiques, etc.). Un traceur de plus en plus utilisé est la distribution isotopique des atomes au sein d'une molécule, d'un polymère, d'un organe, d'un organisme ou d'un écosystème.

Les isotopes sont des atomes de même numéro atomique mais de masse différente ($^{12}_6\text{C}$, $^{13}_6\text{C}$; $^{16}_8\text{O}$, $^{17}_8\text{O}$; $^{14}_7\text{N}$, $^{15}_7\text{N}$; ...). L'inégalité de masse influe sur leurs propriétés physico-chimiques (volume molaire, température de fusion, viscosité, vitesse de réaction, constante d'équilibre, ...). Ces différences de propriétés génèrent une distribution non aléatoire des isotopes au cours de la transformation et/ou de l'assimilation des molécules.

Lorsque, au cours du déroulement d'une réaction faisant intervenir un mélange d'isotopes d'un même élément, la réaction a lieu préférentiellement avec un type d'isotope, il en résulte un **fractionnement isotopique**, caractérisé par le facteur de fractionnement α , défini comme :

$\alpha = R_A/R_B$ où R_A est le rapport des isotopes lourds sur les isotopes légers (par exemple $R = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) dans le cas du carbone dans la phase A,

et R_B le même rapport dans la phase B. (Dubois, 2003)

Le fractionnement isotopique peut être la conséquence d'une réaction à l'équilibre. Dans le cas où le réservoir est quasi infini (cas du CO_2 atmosphérique) la réaction ne provoque pas de diminution significative de ce réservoir. Le fractionnement reste constant tout au long de la réaction, avec un enrichissement ou un appauvrissement isotopique du produit par rapport au substrat qui est constant. C'est le cas lors des réactions photosynthétiques. Par contre, dans le cas où la réaction est complète, c'est-à-dire qu'il y a épuisement du substrat de départ, il n'y aura finalement ni enrichissement ni appauvrissement du produit par rapport au substrat car les molécules possédant les isotopes lourds réagissent même si elles le font plus tardivement.



$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{atmosphère}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} \times 1000 = -8 \text{ ‰}$$



Acide organiques en C3



$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{plantes C3}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} \times 1000 = -27 \text{ ‰}$$

Acides organiques en C4



$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{plantes C4}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} \times 1000 = -11 \text{ ‰}$$

Figure 25: Illustration de la distribution isotopique chez certains végétaux

Un substrat bioassimilable doit être totalement métabolisé par les micro-organismes. Donc, cette réaction peut être considérée comme complète. Ainsi, la nouvelle biomasse microbienne synthétisée à partir du substrat doit posséder une distribution isotopique similaire à celle du substrat bioassimilable. De plus, l'origine végétale de nos substrats nous oriente vers les différentes photosynthèses. En effet, les plantes C3 possèdent une valeur isotopique carbonée vers -27‰ et les plantes C4 vers -11‰ (figure 25). Un micro-organisme qui assimile les carbones d'une plante C3 devrait fournir une biomasse dont la valeur isotopique serait proche de -27‰, et pareillement pour les plantes C4. Le tableau 14 indique quelques exemples pour chaque type de photosynthèses.

Tableau 14: Des exemples de plantes C3, C4 et CAM

plantes C3	$\delta^{13}\text{C} = -24 \text{ à } -30 \text{ ‰}$	<ul style="list-style-type: none"> - les bactéries photosynthétiques comme les cyanobactéries, - les algues, - les mousses, - les fougères, - les conifères <p>et parmi les végétaux à fleurs, tous les arbres et beaucoup d'herbacées.</p> <p>Quelques exemples pris parmi</p> <ul style="list-style-type: none"> - les espèces cultivées : le blé, l'orge, la betterave, le coton, le riz, le tournesol, la pomme de terre, le tabac, ..., - la plupart des légumineuses (soja, pois, haricot, luzerne, ...), <p style="text-align: center;">des plantes ligneuses, des plantes maraîchères des adventices.</p>
plantes C4	$\delta^{13}\text{C} = -9 \text{ à } -14 \text{ ‰}$	<p>On en trouve parmi 18 familles de plantes à fleurs, comprenant plus de 600 espèces de Graminées, comme le maïs,</p> <p style="text-align: center;">la canne à sucre, le sorgho, le mil.</p> <p>Elles vivent principalement dans les régions tropicales sèches avec un fort éclaircissement, des températures élevées et une faible humidité. On peut les trouver en zone tempérée, mais elles poussent alors sur des sols salés et subissent donc, comme les plantes des régions sèches, un déficit hydrique.</p>
plantes CAM	$\delta^{13}\text{C} = -9 \text{ à } -30 \text{ ‰}$	<p>Ce sont des plantes adaptées aux conditions désertiques et qui stockent de l'eau en quantité plus importante que leur besoin immédiat (plantes grasses, cactus, orchidées).</p> <p>Exemple de plantes cultivées : l'ananas, le manioc, le ricin, l'oignon, ...</p>

Par comparaison de ces informations avec l'origine végétale de nos différents substrats d'études, nous avons émis des hypothèses quant aux différentes valeurs isotopiques de nos substrats d'études (tableau 15).

Tableau 15 : Les valeurs isotopiques supposées de nos différents substrats d'étude

Substrats	Origine	Type photosynthétique	$\delta^{13}\text{C}$
Feutres végétaux	Lin	Plante C3	$\approx -27\text{‰}$
	Betterave	Plante C3	$\approx -27\text{‰}$
Film paillage	Farine de céréales	Plante C3 ou C4 ou les 2	Indéterminé
	Polyesters	Pétrochimie	$\approx -30\text{‰}$
Substance à activité biocide	Betteraves	Plante C3	$\approx -27\text{‰}$

Afin de visualiser la bioassimilation de ces différents substrats et une différence de valeurs isotopiques, il serait nécessaire d'utiliser une biomasse prémarquée de la valeur isotopique de l'autre origine végétale que celle du substrat. Par exemple, il faudrait ensemercer une biomasse prémarquée C4 (-11‰) sur les feutres végétaux et sur la substance à activité biocide. Une valeur isotopique vers -27‰ apportera la preuve que le micro-organisme a bioassimilé le substrat d'étude. Le pré-marquage de la biomasse microbienne peut être réalisé avec du glucose de blé (plante C3, -27‰) ou de maïs (plante C4, -11‰), du saccharose de betterave (plante C3, -27‰) ou de canne à sucre (plante C4, -11‰).

Nous avons donc déterminé l'ensemble des paramètres du test de bioassimilation :

Substrats	Feutre végétaux	Film plastique	Substance à activité biocide
Applications et/ou fin de vie potentielle	Horticulture Recyclage agricole	Paillage	Pulvérisation sur les cultures
Milieu récepteur	Sol		
Les décomposeurs	Règne des Mycètes, plus précisément ceux des sols cultivés <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , Basidiomycète, White-rot fungi <i>Trichoderma viride</i> , Ascomycète, White-rot fungi En monoculture		
Les conditions de biodégradation	Milieu solide 20°C Enceinte stérile		Milieu liquide 20°C sous agitation

	Monosubstrat	Enceinte stérile Monosubstrat
Suivi de la biodégradation	Techniques microscopiques	
L'évaluation de la bioassimilation	Analyse isotopique	

En cours de test, un autre substrat nous a été fourni, un film plastique destiné au paillage agricole, le néosac. Son application étant en adéquation avec tous les paramètres du test envisagé, nous l'avons incorporé à l'étude. N'ayant aucune information sur sa composition, sa valeur isotopique n'est pas prédictible. En fonction des résultats de sa valeur isotopique, il sera ensemencé avec une flore C3, C4 ou les deux.

PHASE B

LA REALISATION

Après avoir déterminé de façon théorique tous les paramètres du test, nous avons envisagé la phase de réalisation technique du test avec une présentation du principe suivie de la description du protocole.

I. Principe du test

Le principe du test est le suivant : réaliser une pré-culture d'une flore microbienne dans un milieu liquide contenant un substrat facilement assimilable (par exemple du glucose ou du saccharose) provenant d'une origine végétale (C3, C4) pour effectuer un "pré-marquage" (tableau 16).

Tableau 16 : Exemples de substrats pour le pré-marquage isotopique

Substrats	Origine végétale	Exemples
Glucose	C3	Blé
	C4	Maïs
Saccharose	C3	Betterave
	C4	Canne à sucre

La flore ainsi marquée est ensuiteensemencée sur le substrat à dégrader. En fonction de la nature isotopique supposée du substrat végétal, l'ensemencement est réalisé avec la flore de l'autre origine végétale afin de visualiser le changement de signature isotopique (tableau 17) :

Tableau 17 : Ensemencement à réaliser en fonction de la nature isotopique du substrat

Nature isotopique du substrat	Pré-culture de la flore microbienne
Substrat végétal d'origine C3	Dans un milieu C4
Substrat végétal d'origine C4	Dans un milieu C3
Substrat d'origine pétrochimique	Dans les deux milieux C3 et C4
Composites (plusieurs sources)	Dans les deux milieux C3 et C4

La figure 26 présente le schéma de principe :

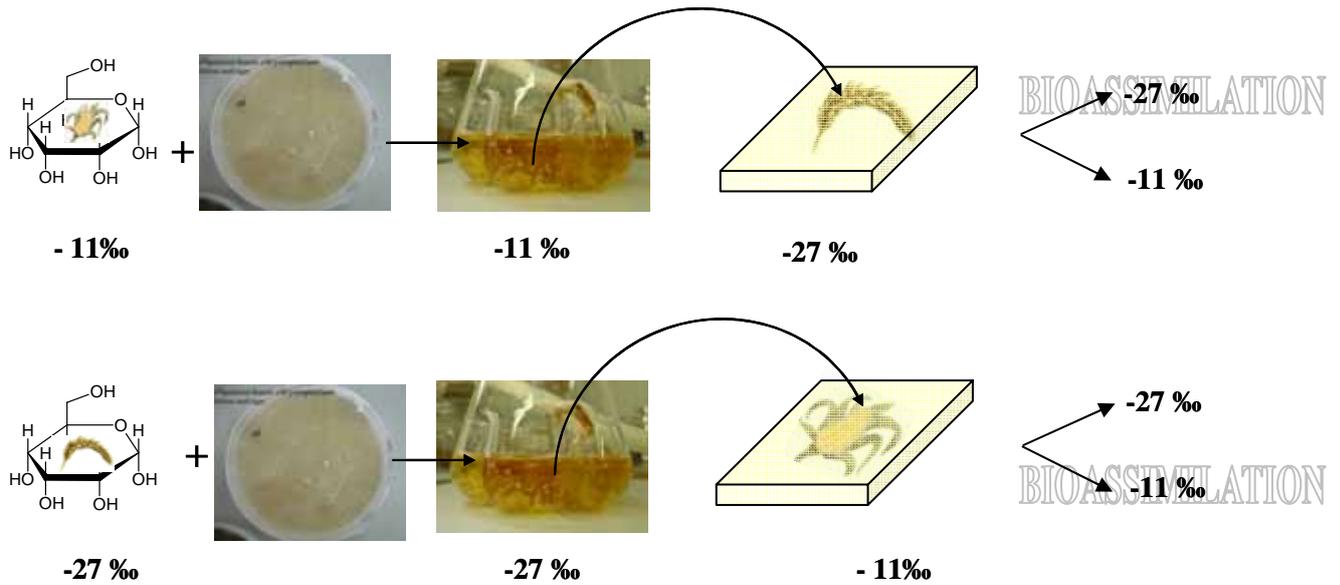


Figure 26 : Illustration du principe du test de bioassimilation

La biomasse fongique est pré-cultivée dans un liquide milieu contenant du glucose de maïs (plante C4). La nouvelle biomasse issue de ce substrat en prend la signature isotopique, elle est donc marquée C4 ($\approx -11\text{‰}$). Cette biomasse marquée C4 est alors ensemencée sur un substrat solide (ou liquide) possédant une signature isotopique différente, par exemple vers les valeurs des plantes C3. Si la nouvelle biomasse fongique possède une valeur isotopique vers -27‰ , cela signifie que le substrat solide a servi de nutriments à la biosynthèse de la nouvelle biomasse. Il est donc bioassimilable. Si la biomasse prélevée sur le substrat solide possède une signature isotopique vers -11‰ , le substrat solide n'a pas été bioassimilé. Le raisonnement est identique pour une pré-culture en milieu C3 (glucose de blé) et un ensemencement sur un substrat solide (ou liquide) élaboré à partir des plantes C4. En cas de bioassimilation, la biomasse microbienne possède la signature isotopique du substrat.

II. Le protocole

A. La pré-culture en milieu liquide

Dès réception, les souches fongiques sont mises en culture dans un milieu similaire à leur milieu de culture habituel, une gélose malt. Un milieu malt liquide est préparé en

conservant les nutriments sans l'agar. Les deux souches sont ensemencées dans un milieu malt liquide stérile. Cette opération, appelée repiquage, est effectuée mensuellement.

Pour le test de bioassimilation, les souches doivent être marquée C3 ou C4. Du glucose de blé (plante C3) et de maïs (plante C4) nous ont été gracieusement fourni par ARD. Ainsi, des milieux de culture liquide C3 et C4 sont préparés. Les souches fongiques, issues du milieu malt liquide, sont ensemencées, de façon stérile, dans les milieux C3 et C4. Des pellets mycéliens sont prélevés dans le milieu initial à l'aide d'une pipette de 10mL à usage unique dont l'embout est cassable. Après évacuation du milieu liquide, les pellets sont déposés dans le nouveau milieu de culture liquide stérile. Les repiquages sont effectués mensuellement. Les fioles à baffles sont incubées dans une enceinte thermostatée sous agitation. La figure 27 montre les différentes fioles à baffles, avant et après ensemencement, avec *P. chrysosporium* et *T. viride*.

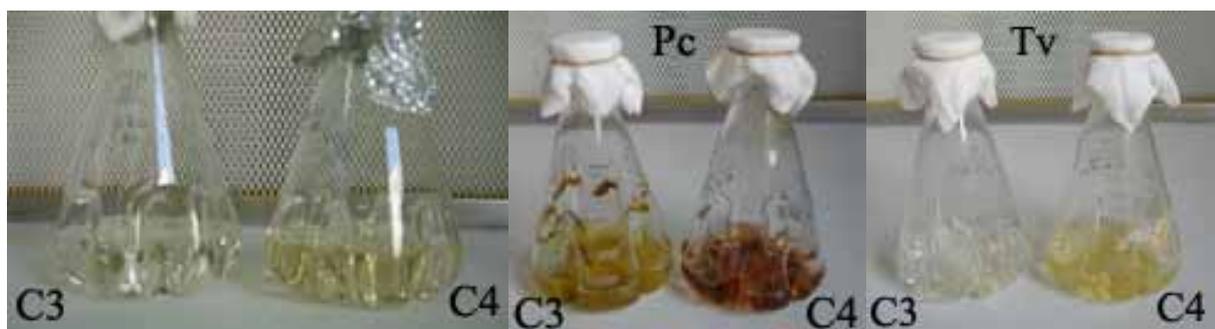


Figure 27 : Les milieux de culture C3 et C4 vierges et ensemencés par *P. chrysosporium* et *T. viride*.

B. La culture des souches en milieu solide

L'ensemencement des agro-composites est effectué, de façon stérile, à partir d'une culture de micro-organismes en milieu liquide. Quelques pellets sont prélevés, le mycélium est désagrégé dans 5mL de milieu de culture liquide à l'aide de deux pipettes de 1mL à usage unique. En fonction de la capillarité naturelle des agromatériaux, l'ensemencement s'effectue différemment.

❖ Les feutres végétaux

Le feutre végétal préalablement stérilisé est disposé dans la suspension (figure 28). La capillarité naturelle imbibe le feutre sur une face. Le mycélium résiduel est déposé sur le feutre, sur la même face (l'ensemencement est réalisé sur une seule face des feutres).

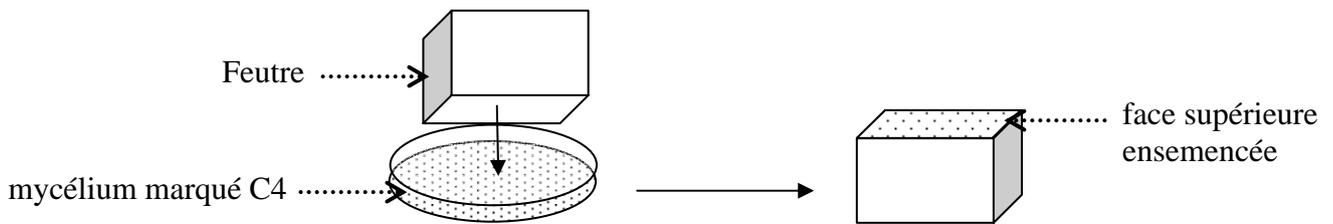


Figure 28 : Schéma de l'ensemencement des feutres végétaux

❖ Les films de paillage

Les films de paillage n'ayant pas la même absorption, le mycélium désagrégé et les 5mL de milieu de culture liquide sont ajoutés sur le film préalablement stérilisé.

Les échantillons sont incubés à température ambiante sous une hotte à flux laminaire. Les champignons ayant besoin d'humidité, un volume connu d'eau stérile est ajouté pour favoriser leur croissance.

C. La culture des souches en milieu liquide

Après stérilisation du milieu de culture liquide, des pellets de mycélium sont prélevés dans le milieu initial à l'aide d'une pipette à usage unique de 10mL et déposés dans le nouveau milieu de culture. La culture des deux souches fongiques dans un milieu liquide contenant la substance à activité biocide comme unique source de carbone est réalisée selon cette technique.

III. Les différentes séries d'expériences

Deux ensemencements sont réalisés avec les feutres végétaux et les films de paillage farine/polyester et polyester. Un premier essai de colonisation mycélienne est effectué avec une flore fongique cultivée dans le milieu liquide malt (figure 29). Sur cette série, la colonisation microbienne et la dégradation des agromatériaux sont suivies par des observations macroscopiques et microscopiques. La biomasse fongique est également ensemencée dans les milieux C3 et C4 afin d'obtenir une biomasse fongique marquée C3 et C4. En fonction de la valeur isotopique de la biomasse obtenue, la première partie du test pourra être validée et sera poursuivie par le second ensemencement sur les substrats à tester.

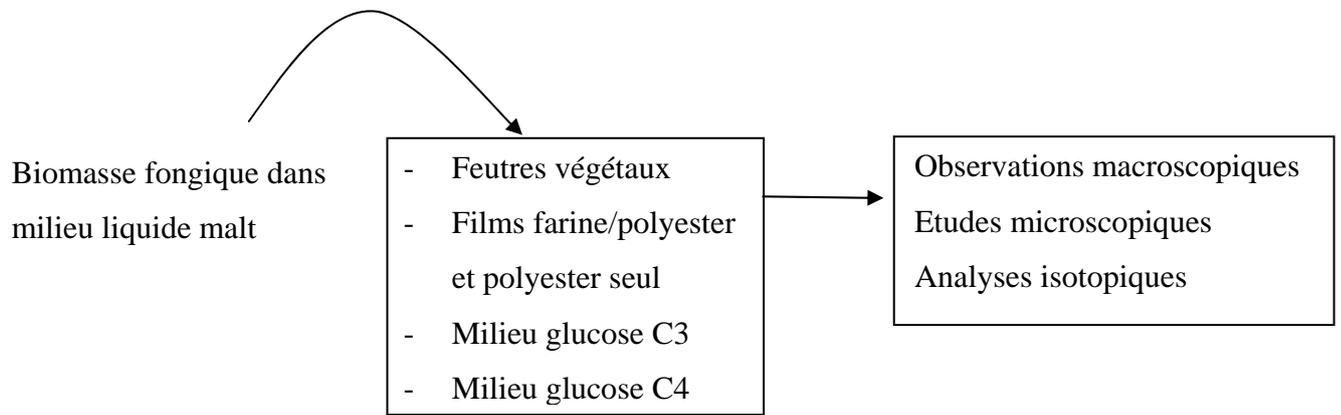


Figure 29 : Schéma de la première série d'expériences

Sur ce premier essai, suite à des observations microscopiques, nous avons remarqué que la technique de stérilisation du film de paillage farine/polyester n'est pas adaptée car l'autoclavage extrait les substances thermosolubles pour former une couche superficielle sur le film.

Après obtention d'une biomasse fongique marquée C3 ou C4, une seconde série d'ensemencements est réalisée sur les feutres végétaux, sur les films de paillage (farine/polyester, polyester, néosac) et sur la substance à activité biocide (figure 30). La prolifération mycélienne, la dégradation des substrats et la bioassimilation sont assurées par un suivi macroscopique, des observations microscopiques et une mesure de la distribution isotopique carbonée dans la nouvelle biomasse. Lors de l'ensemencement de la biomasse fongique marquée C3 ou C4 sur les films plastiques, la stérilisation s'effectue par passage dans un bain d'alcool puis séchage dans la zone de stérilité autour du bec bunsen.

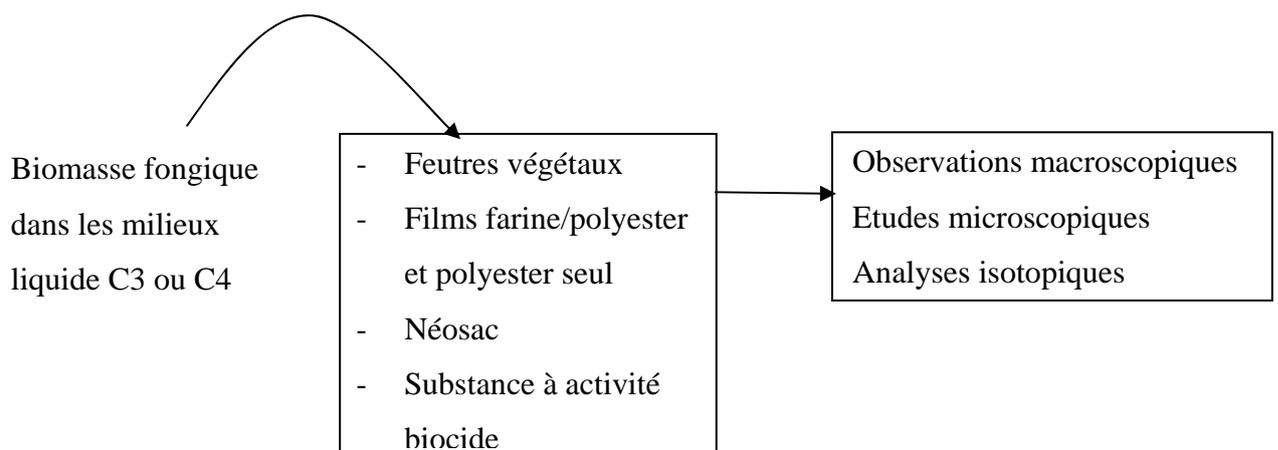


Figure 30 : Schéma de la mise en œuvre du test de bioassimilation

PHASE C

LA COLONISATION

MYCELIENNE

Les champignons possèdent deux structures différentes, l'une végétative, l'autre reproductrice. L'appareil végétatif se caractérise par une augmentation ainsi qu'une ramification de filaments appelés hyphes. L'ensemble des hyphes constitue le mycélium. Le champignon se reproduit au moyen des spores externes qui apparaissent sur les hyphes dans des structures spécialisées appelées conidiophores.

Les spores produites se classent en deux catégories. La première est celle des spores qui se produisent rapidement et en grandes quantités, mais qui résistent très mal au dessèchement, à la lumière du soleil et autres facteurs climatiques défavorables. Elles permettent le développement rapide des colonies lorsque les conditions sont favorables. L'autre type est celui des spores qui résistent beaucoup mieux aux conditions défavorables. Ces spores sont capables de demeurer dormantes et de permettre ainsi à l'organisme de traverser sans disparaître de longues périodes d'adversité.

Afin de suivre l'évolution de la prolifération et du comportement des champignons du sol, des photographies sont prises à intervalles de temps réguliers. La dégradation des différents substrats est également observée par des techniques microscopiques photonique et électronique.

I. Les feutres végétaux

A. Observations macroscopiques de la colonisation microbienne – Série I

Les feutres ont étéensemencés sur la face supérieure. L'ensemencement est réalisé à partir d'un milieu de culture liquide. Les champignons sont donc confrontés à un changement de substrat et à une double difficulté :

- adaptation d'un milieu de culture liquide à un nouveau milieu, solide
- adaptation d'un milieu de culture contenant des molécules facilement assimilables (molécules solubles simples, oses) à un milieu constitué de polymères plus ou moins assimilables (hémicelluloses, cellulose, lignines, ...).

L'ajout de quelques millilitres de milieu de culture (5 mL) permet au champignon de poursuivre sa croissance et de synthétiser le matériel cellulaire, notamment les enzymes, nécessaire à la dégradation du nouveau substrat. A l'échelle de plusieurs mois d'incubation, ces quelques millilitres sont négligeables.

1. Le feutre L

Le feutre est complètement colonisé dès le premier mois, quel que soit le champignon (figure 31). Ceci s'explique par la présence de substrats facilement assimilables (milieu liquide ajouté, présence de molécules accessibles dans le matériau).

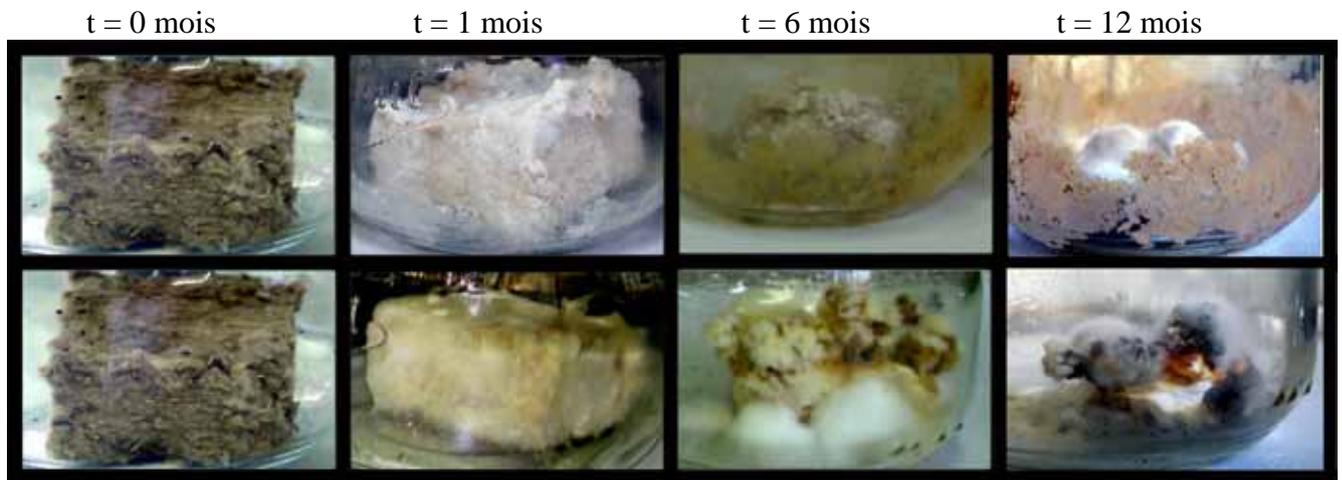


Figure 31 : Evolution macroscopique du feutre L sur 12 mois ensemencé par *Phanerochaete chrysosporium* (haut) et *Trichoderma viride* (bas).

Le mycélium de *P. chrysosporium* possède un aspect poudreux et non aérien (absence de duvet ou de poils). Le volume du feutre diminue progressivement. La biodégradation des fibres végétales dans la nature est un phénomène lent et le résultat d'une synergie entre micro-organismes, microfaune et microflore locale. Nous avons choisi une monoculture, ce qui ralentit d'autant la biodégradation.

Le mycélium de *T. viride* est plus aérien (présence de poils). Il ne semble pas s'épaissir au cours du temps. En revanche, au cours du 4^{ème} mois d'incubation, sont apparus des carpophores. Cet événement est relativement rare, surtout en conditions de laboratoire, car il faut rassembler un ensemble de conditions (humidité, température, rencontre aléatoire d'un mycélium "positif" et un mycélium "négatif", association de plusieurs mycéliums pour structurer la chair, ...) nécessaires à leur formation. Par ce comportement, le champignon multiplie ses modes de reproduction pour augmenter ses chances de survie dans un milieu peu favorable.

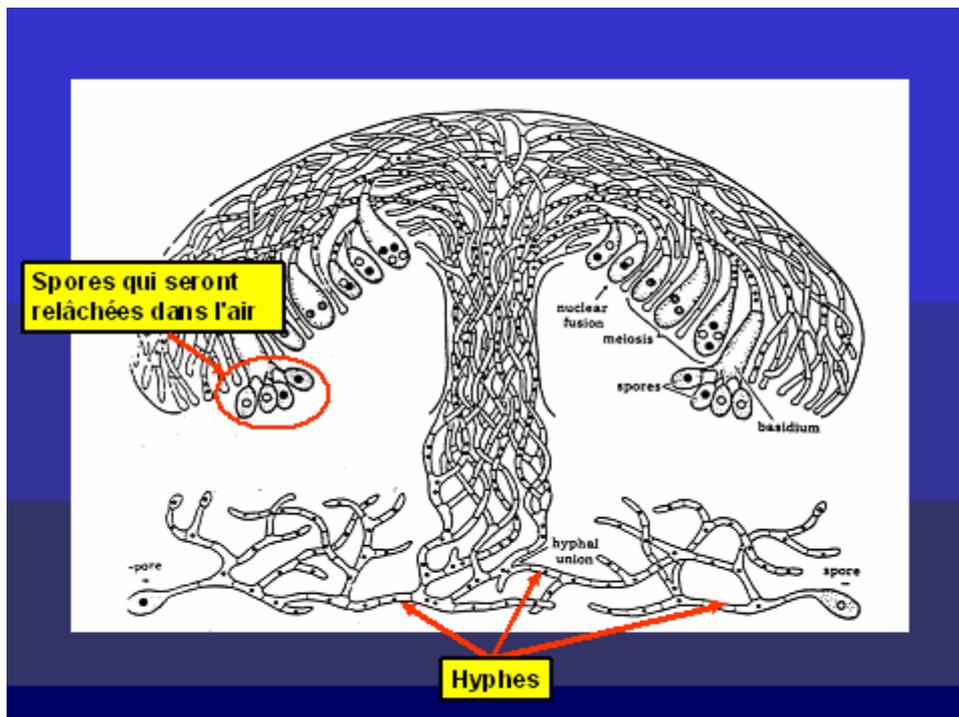


Figure 32 : Schéma indiquant la création d'un carpophore

La figure 32 montre un hyphe "négatif" schématisé avec un noyau blanc rencontrant un hyphe "positif" schématisé par un noyau noir. L'union de ces deux hyphes engendre un mycélium dinucléé qui forme une structure érigée maintenue par des protéines, des hydrophobines. Cette structure, appelée carpophore, est observée lors de la prolifération de *T. viride* sur le feutre L (figure 33).



Figure 33 : Les carpophores de *T. viride* en culture sur un agromatériau en lin

2. Le feutre LB

Les mycéliums de chacun des champignons présentent les mêmes aspects (poudreux pour *P. chrysosporium* et duveteux pour *T. viride*) que sur le feutre L. La nature différente des fibres végétales présentes n'a pas influencé l'aspect macroscopique des mycéliums (figure 34).

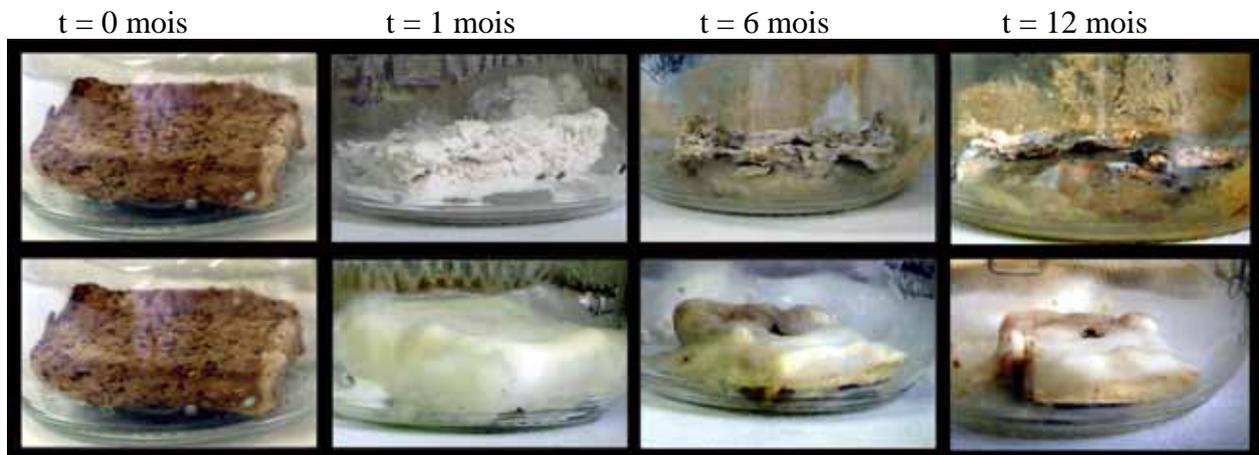


Figure 34 : Evolution macroscopique du feutre L sur 12 mois ensemencé par *P. chrysosporium* (haut) et *T. viride* (bas).

En revanche, la déstructuration du feutre est nettement visible avec *P. chrysosporium* dès le 2^{ème} mois d'incubation. Cette déstructuration forme une excroissance (figure 35). Le champignon s'est très bien adapté aux nutriments présents dans ce feutre en raison de la présence de betterave. Les parois cellulaires de la betterave sont moins lignifiées que celles du lin, donc plus facilement attaquables par les micro-organismes.

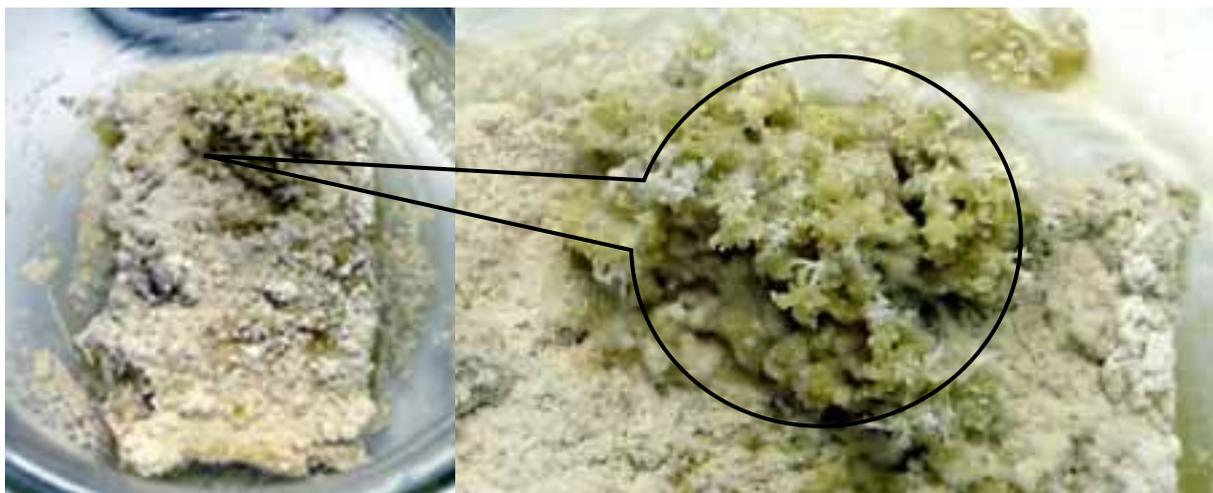


Figure 35 : Déstructuration du feutre LB

Le feutre LB est quasiment dégradé par *P. chrysosporium* au 5^{ème} mois d'incubation.

T. viride a enveloppé le feutre d'un mycélium cotonneux qui s'est épaissi durant le premier mois (présence de substrats facilement assimilables : milieu liquide, saccharose résiduel de la betterave, ...). Au cours du temps, une membrane se forme, elle enveloppe le feutre. Des spores noires apparaissent (figure 36).



Figure 36 : Spores de *Trichoderma viride*

Ce sont des spores de protection (production de mélanine) qui apparaissent lorsque l'environnement devient moins favorable. La membrane empêche la diffusion des nutriments vers l'extérieur, raison pour laquelle le mycélium extérieur se retrouve en pénurie de nutriments. Cette barrière doit également servir, dans le milieu naturel, à éviter d'une part la fuite et d'autre part l'accès aux nutriments pour les autres organismes.

Toutefois, une diminution du volume du feutre apparaît au cours du temps (figure 37).

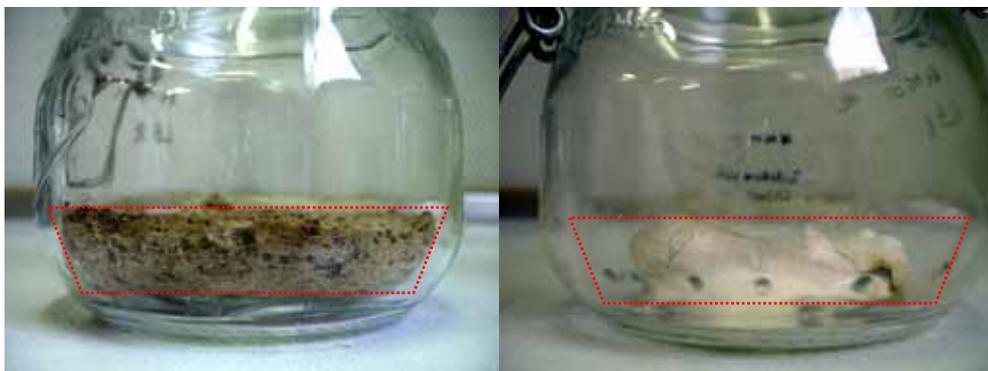


Figure 37 : Comparaison du feutre LB entre le témoin et 6 mois d'incubation

3. Conclusion

Les champignons semblent bien s'adapter aux feutres végétaux. Ce qui paraît normal car nous avons sélectionné des champignons telluriques dont l'un des rôles est de dégrader la matière organique. Le feutre LB se dégrade plus vite que le feutre L. Cette constatation est cohérente avec la nature des fibres végétales constitutives des matériaux. La présence de betteraves dont la structure des cellules ne nécessite pas une lignification importante fournit des polymères (cellulose, hémicelluloses) ou des molécules (saccharose, oses,...) facilement assimilables.

B. Observations macroscopiques de la colonisation microbienne – Série II

Cette seconde série d'ensemencements a été réalisée à partir d'une biomasse pré-cultivée dans un milieu liquide C4 (les feutres végétaux étant élaborés à partir de co-produits des plantes C3). L'ensemencement est effectué avec *P. chrysosporium* et *T. viride* sur le feutre L. Nous avons privilégié ce feutre en raison de sa composition plus importante en lignines (obstacles potentiels à la bioassimilation) et de la présence de carpophores, structures faciles à prélever.

A deux semaines d'incubation (figure 38), *P. chrysosporium* présente une morphologie différente entre les deux réplicats. Dans le bocal A, il se présente sous la forme de poudre verte (spores ?) alors que dans l'autre bocal, il est sous une forme mycélienne poudreuse. *T. viride* prolifère par un mycélium duveteux.

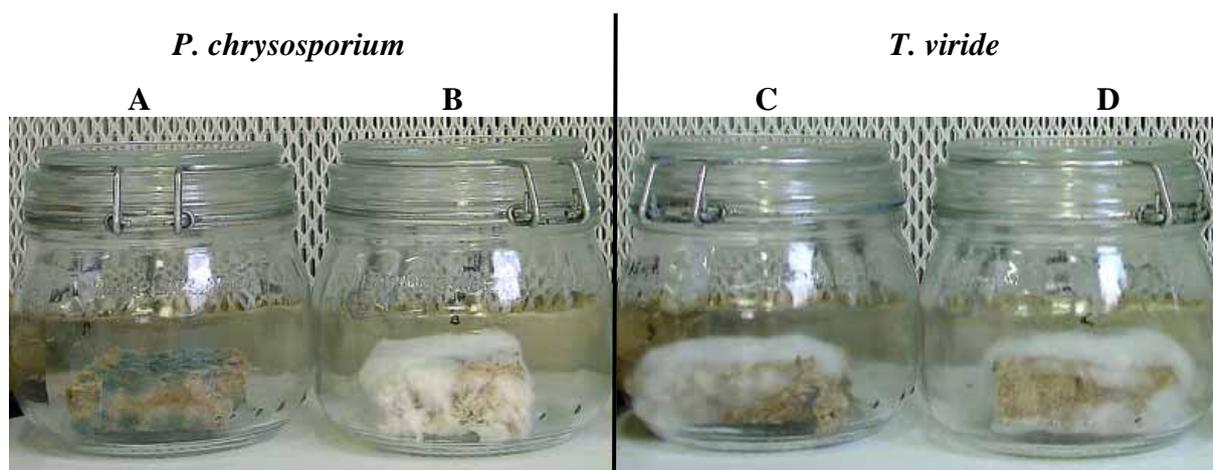


Figure 38 : Le feutre L ensemencé par *P. chrysosporium* et *T. viride* à deux semaines d'incubation.

A deux mois d'incubation (figure 39), *P. chrysosporium*, dans le bocal B, conserve sa forme sporulée et ne colonise pas le feutre. La biomasse est difficile à prélever pour les analyses isotopiques. Dans les autres bocaux, le mycélium envahit toutes les faces du feutre.

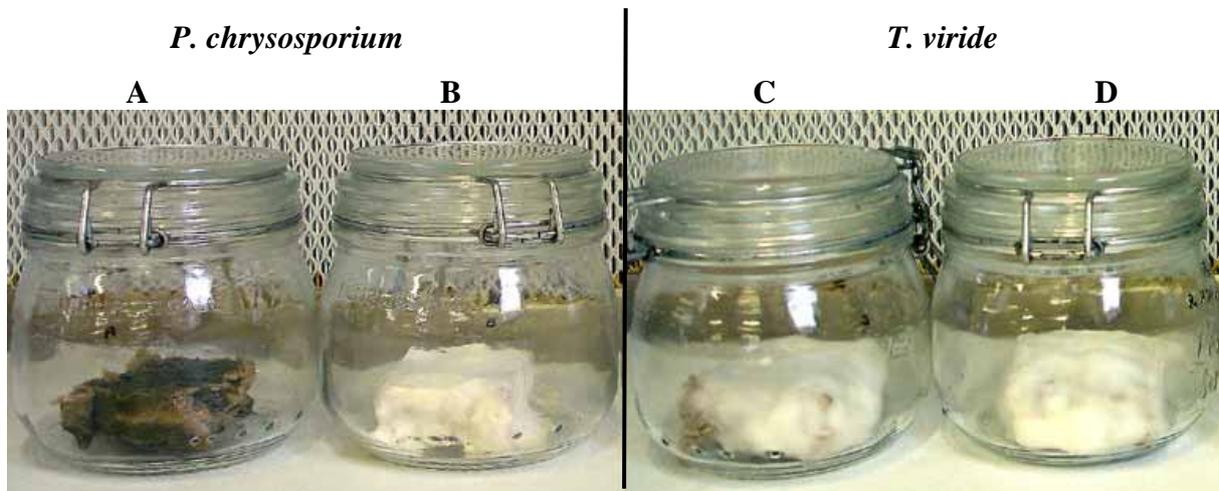


Figure 39 : Le feutre Lensemencé par *P. chrysosporium* et *T. viride* à deux mois d'incubation.

A quatre mois d'incubation (figure 40), des carpophores apparaissent à la fois avec *P. chrysosporium* (bocal B) et *T. viride* (bocaux C et D). Le mycélium est très envahissant, le milieu s'épuise, le champignon commence à tenter une dissémination de ses spores. Il adopte une nouvelle structure pour multiplier ses chances de survie. En effet, dans le milieu naturel, le carpophore permet une dissémination des spores de façon aérienne par les facteurs environnementaux (vent, pluie, etc.) et augmenter la probabilité de survie de l'espèce.

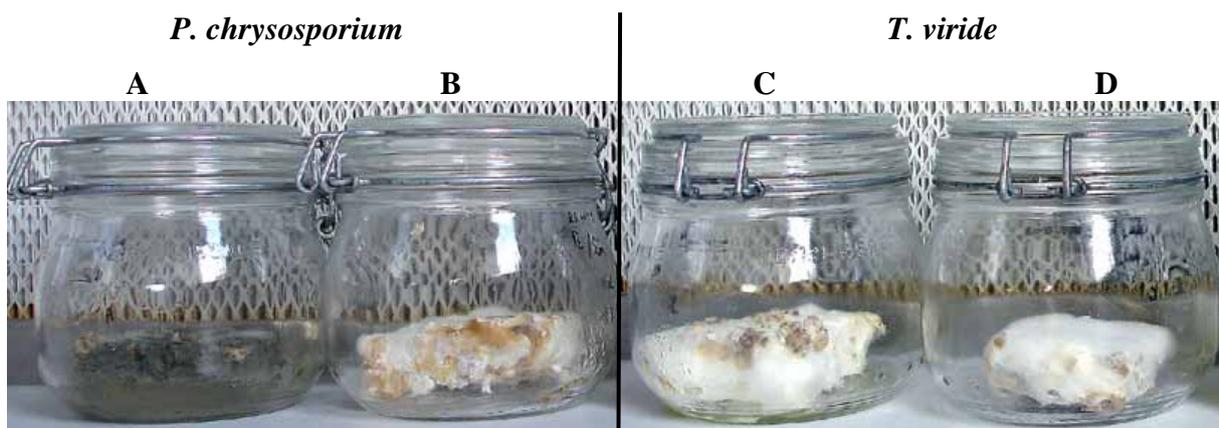


Figure 40 : Le feutre Lensemencé par *P. chrysosporium* et *T. viride* à quatre mois d'incubation.

C. Conclusion

Les deux souches fongiques prolifèrent sur les feutres végétaux. Cette observation était attendue en raison du rôle écologique de ces deux micro-organismes. *P. chrysosporium* adopte un comportement hétérogène, en fonction de la nature de la préculture (milieu malt et milieu C4) mais également au niveau des duplicats. En effet, dans la seconde série, il se présente sous deux formes, sporulée et mycélienne. Aucun polymorphisme concernant *P. chrysosporium* n'est cité dans la littérature. Cette expérimentation doit être renouvelée dans différentes conditions afin, d'une part, de vérifier ce dimorphisme, et d'autre part, d'essayer de le caractériser. Il est également capable de créer une structure érigée (carpophore). *T. viride* possède un comportement plus homogène avec une prolifération duveteuse et la formation de carpophores dans les deux séries.

II. Les films de paillage

Les deux souches fongiques ont étéensemencées sur les films, accompagnés de 5 mL de milieu de culture malt afin de faciliter le démarrage de la croissance sur un milieu peu favorable.

1. Le film farine/polyester

Au cours du premier mois, les champignons poussent sur le film farine/polyester. Le mycélium de *P. chrysosporium* est toujours de type poudreux et colonise de façon uniforme la surface du film. En revanche, *T. viride* ne semble pas se développer très rapidement, quelques poils se révèlent à la surface (figure 41).

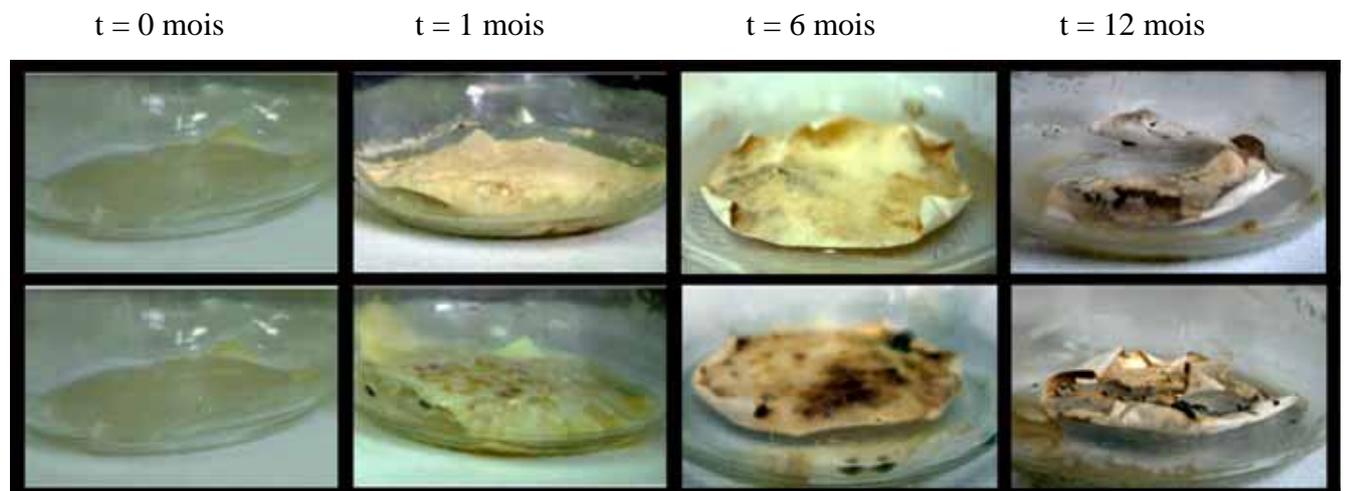


Figure 41 : Evolution macroscopique du film farine/polyester, sur 12 mois,ensemencé par *Phanerochaete chrysosporium* (haut) et *Trichoderma viride* (bas).

Macroscopiquement, la croissance de *P. chrysosporium* évolue peu au cours des 4 premiers mois d'incubation. En séchant, le film se courbe. L'ajout d'eau l'aplanit mais les cycles de dessèchement provoquent des ruptures (figure 42).



Figure 42 : Rupture du film farine/polyester

Au cours du 6^{ème} mois, apparaissent des spores noires de résistance (figure 43), les nutriments facilement assimilables font défaut.



Figure 43 : Apparition de spores de résistance de *P. chrysosporium* sur le film farine/polyester

La colonisation du film farine/polyester par *Trichoderma viride* n'est pas abondante. Toutefois, au cours du 5^{ème} mois d'incubation apparaissent des halos d'éclaircissement (figure 44).

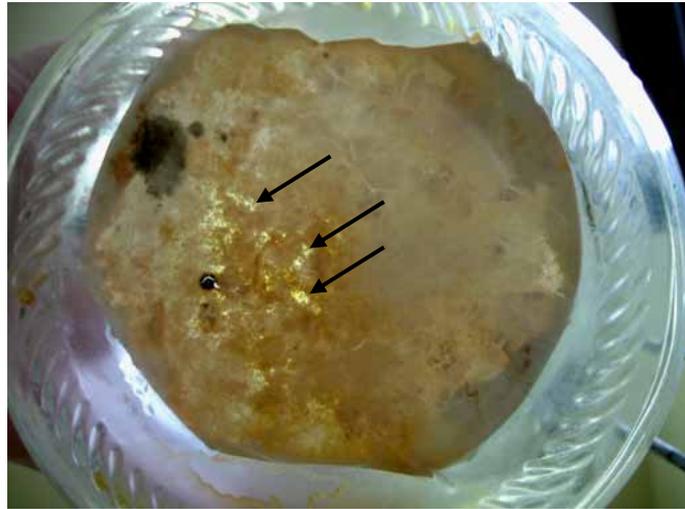


Figure 44 : Halos d'éclaircissement sur le film farine/polyester par *T. viride*

Cette observation paraît surprenante puisque macroscopiquement, *T. viride* possède la prolifération la moins abondante. Les halos d'éclaircissement laissent supposer une hydrolyse. Une observation macroscopique ne permet pas de différencier une hydrolyse spontanée d'une hydrolyse enzymatique, ni de savoir si elle a lieu sur les polymères de la farine ou du polyester.

2. Le film polyester

Le film polyester vierge est difficile à repérer sur la figure 45 car il est transparent. Les quelques millilitres de milieu nutritif permettent le développement des champignons au cours du premier mois mais les spores noires de résistance apparaissent très vite, dès le second mois d'incubation. Aucune évolution n'est visible au cours du temps.

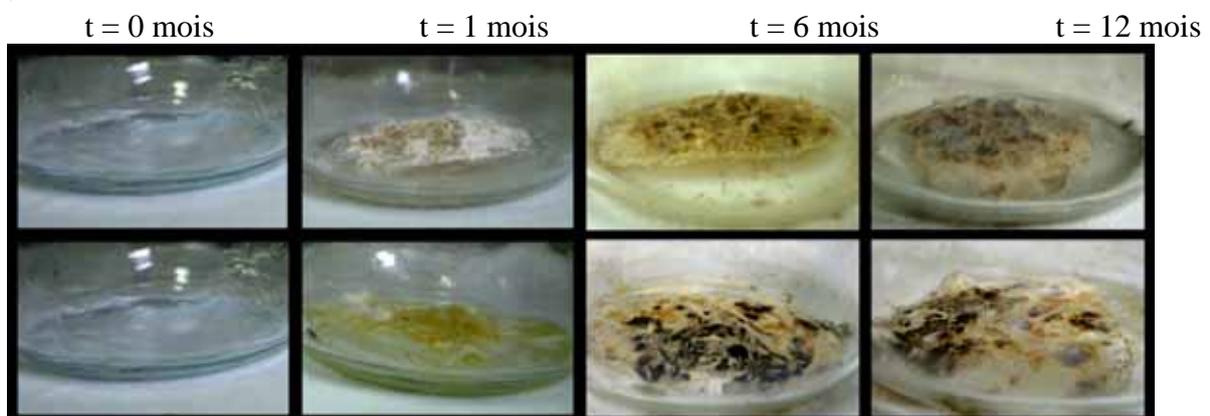


Figure 45 : Evolution macroscopique du film polyester sur 12 mois ensemencé par *Phanerochaete chrysosporium* (haut) et *Trichoderma viride* (bas).

3. Conclusion

Par comparaison aux feutres végétaux, les micro-organismes testés ne se développent pas facilement sur les deux types de films de paillage. La flore tellurique n'est pas dotée d'enzymes constitutives (synthétisées et sécrétées indépendamment de la présence d'un substrat spécifique) efficaces sur les polymères présents au sein des films. Le défaut d'éléments permettant ou accélérant leur croissance comme des acides aminés ou des vitamines représente une difficulté majeure. Toutefois, le film farine/polyester présente des indices de dégradation contrairement au polyester seul. En effet, des fissures apparaissent sur le film farine/polyester ensemencé par *P. chrysosporium*. Cette détérioration peut être le fruit d'une action simple ou conjuguées des agents catalytiques du champignon (enzymes, radicaux libres) ou la conséquence de l'enroulement/déroulement des cycles séchage/hydratation. Macroscopiquement, il est impossible de faire la différence. Toutefois, ces entailles offrent une entrée potentielle vers l'intérieur du film et l'accès à de possibles nutriments. A 12 mois d'incubation, le film est macroscopiquement détérioré mais en aucun cas biodégradé. Le film farine/polyester ensemencé par *T. viride* subit une détérioration différente. Contrairement au film ensemencé par *P. chrysosporium*, il ne se fissure pas alors qu'il est soumis aux mêmes conditions (ce qui permet de penser une participation biotique à la biodétérioration du film farine/polyester par *P. chrysosporium*) mais révèle la présence d'hydrolyses, biotique ou abiotique. Macroscopiquement, le film de paillage farine/polyester présente une (bio)détérioration, le film 100% polyester a simplement subi une colonisation de surface.

La mise au point de ce test de bioassimilation est une étape importante car l'efficacité et la pertinence du test repose sur le choix des paramètres (substrat, conditions de biodégradation, flore et techniques d'évaluation). Nous avons choisi de mettre en place un test de bioassimilation en système simple impliquant la prolifération d'un seul micro-organisme sans intervention des paramètres abiotiques simulant les conditions réelles (pluie, vent, soleil, etc.). Quatre substrats ont été sélectionnés (feutres végétaux, deux types de films de paillage pour le milieu solide et une substance à activité biocide pour le milieu liquide) grâce à différentes collaborations, académiques et industrielles, ayant répondu positivement à notre appel. Bien que de natures différentes, les applications des substrats étudiés semblent converger vers un milieu récepteur sur sols cultivés, orientant le choix de la flore vers les micro-organismes telluriques. *Phanerochaete chrysosporium* et *Trichoderma viride* sont alors privilégiés pour leur représentativité écologique en sols cultivés, pour leur large spectre catalytique et pour leur faculté de croissance rapide aussi bien sur substrat solide qu'en milieu liquide. La bioassimilation est évaluée à l'aide de deux techniques complémentaires :

- l'analyse isotopique qui permet de montrer l'incorporation du substrat dans la biomasse microbienne néosynthétisée,
- l'examen microscopique qui permet d'observer le comportement du micro-organisme face à ce substrat (intensité de la croissance, modes de prolifération, nutriments privilégiés, ...).

Une double innovation se présente dans la mise en place et le suivi de ce test. Contrairement aux travaux antérieurs qui proposent un marquage du substrat à l'aide d'un enrichissement (stable ou radioactif), notre étude concerne le marquage de la biomasse microbienne, même si indirectement le substrat utilisé est lui-même naturellement marqué. En effet, pour éviter l'utilisation d'un enrichissement isotopique, nous nous sommes appuyés sur une discrimination naturelle des isotopes lors des photosynthèses de type C3 ou de type C4. **Ainsi l'assimilation des molécules issues des plantes C3 ou C4 engendre le marquage de la biomasse microbienne et le marquage prouve la bioassimilation.**

Dans le protocole présenté, le pré-marquage de la biomasse microbienne s'effectue en milieu liquide car l'assimilation des oses simples, donc l'obtention d'une biomasse marquée, est rapide. En cas de besoin, il est possible d'adapter ce protocole en milieu solide, par exemple en utilisant de l'amidon de blé (marquage C3) et de l'amidon de maïs (marquage C4). Après l'obtention d'une biomasse marquée, les micro-organismes peuvent être ensemencés sur des substrats solides ou en milieu liquide.

Nous avons pu apprécier la prolifération des champignons de façon macroscopique. La croissance mycélienne a été rapide et abondante sur les substrats végétaux ce qui laisse supposer, sans surprise, une bonne adaptation des souches fongiques à ce substrat. En revanche, la prolifération mycélienne sur les films de paillage a été plus difficile. Mais les observations visuelles ont leurs limites, surtout dans le domaine de la microbiologie. La bioassimilation des agroproduits doit être vérifiée par des techniques adaptées. Elle est présentée dans le chapitre suivant qui permettra également de valider le test de bioassimilation mis en place.

CHAPITRE IV

BIOASSIMILATION

DE

DIFFERENTS

AGROPRODUITS

Suite à sa mise en place, le test doit être validé par l'évaluation de la bioassimilation des différents substrats. La première partie de ce chapitre est consacrée à la restitution des résultats de l'analyse isotopique. La seconde partie présente les comportements des deux souches fongiques face à ces différents agro-produits solides, observés à l'aide des techniques microscopiques.

I. Analyse isotopique

A. La pré-culture de la biomasse fongique en milieu liquide

Deux souches fongiques *Phanerochaete chrysosporium* et *Trichoderma viride* sont pré-cultivées en milieu liquide avec un substrat facilement assimilable afin d'opérer un pré-marquage isotopique. Les substrats choisis sont le glucose de blé (plante C3 vers -26, -28‰) et le glucose de maïs (plante C4 vers -11, -14‰).

1. Milieux de croissance

Sur la base du savoir-faire des microbiologistes du Laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire, nous considérons que trois repiquages sont nécessaires pour obtenir une biomasse fongique totalement issue des glucoses C3 et C4 (figure 46).

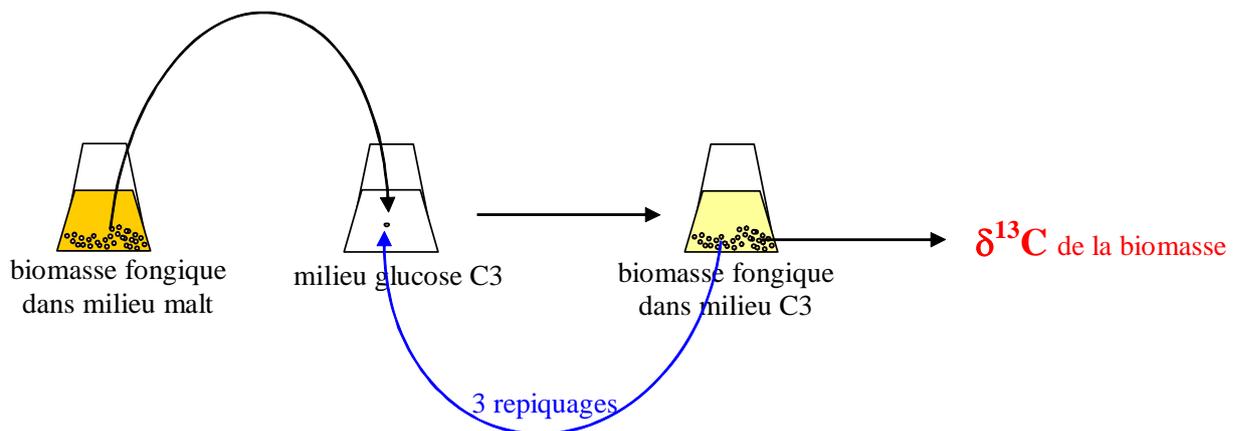


Figure 46 : Schématisation d'un repiquage microbien (exemple avec le milieu C3)

Le premier ensemencement concerne les deux souches fongiques issues du milieu liquide malt dans les milieux de culture liquide C3 et C4. Un repiquage signifie un ensemencement de la biomasse fongique du milieu de culture épuisé dans un milieu de culture de même composition vierge. Après trois repiquages, la biomasse fongique est prélevée pour une analyse isotopique.

Les figures 47 et 48 présentent l'aspect macroscopique des fioles avant ensemencement (a), après croissance de *P. chrysosporium* (b) et *T. viride* (c) dans le milieu C3 (figure 47) et dans le milieu C4 (figure 48).

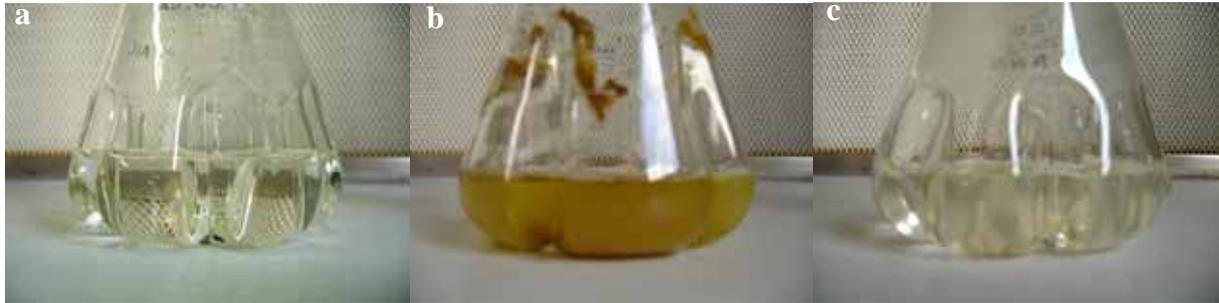


Figure 47 : Milieu C3 témoin (a), ensemencé avec *P. chrysosporium* (b) et *T. viride* (c)



Figure 48 : Milieu C4 témoin (a), ensemencé avec *P. chrysosporium* (b) et *T. viride* (c)

La première observation macroscopique à l'issue de l'autoclavage (photographies a, à la fois pour le milieu C3 et le milieu C4) montre que la solution glucosée C4 se colore à haute température. En effet, le glucose étant issu d'une production industrielle, certains résidus à l'état de traces ont pu se transformer à haute température (dérivés furfural pour les oses) et/ou réagir (Réaction de Maillard avec le nitrate d'ammonium). Les cultures microbiennes se colorent différemment en fonction de l'espèce fongique et de l'origine du glucose. Ce comportement est probablement dû à la présence d'impuretés.

Toutefois, la biomasse fongique s'est développée et a donc consommé du glucose, ce qui ne remet pas en cause notre stratégie de visualisation de la bioassimilation par analyse isotopique.

2. Résultats isotopiques

L'analyse isotopique concernant le sirop de glucose de blé a été réalisée en triplicat en raison de l'hétérogénéité due à la forme sirupeuse. Les résultats (tableau 18) montrent une très bonne répétabilité et correspondent aux valeurs attendues pour les deux origines

végétales. Un code couleur est adopté et conservé sur l'ensemble de la présentation des résultats isotopiques, à savoir le jaune pour la zone isotopique C3 et le rose pour la zone des valeurs isotopiques C4.

Tableau 18 : $\delta^{13}\text{C}$ des glucoses

substrats	$\delta^{13}\text{C}$ attendu (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ mesurés (‰)			$\delta^{13}\text{C}$ moyen (‰)
		essai 1	essai 2	essai 3	
glucose blé	-26 à -28	-26,30	-26,36	-26,33	-26,33 ± 0,02
glucose maïs	-11 à -15	-11,14	-11,22	-	-11,18 ± 0,04

Le tableau 19 présente les valeurs isotopiques de la biomasse fongique après incubation dans les milieux liquides C3 et C4.

Tableau 19 : $\delta^{13}\text{C}$ de la flore fongique pré-adaptée

	$\delta^{13}\text{C}$ biomasse initiale (‰)	glucose (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ biomasse finale (‰)		
			essai 1	essai 2	moyenne
<i>P. chrysosporium</i>	-26,83	-26,33	-25,75	-25,87	-25,81 ± 0,06
		-11,18	-11,18	-10,91	-11,04 ± 0,14
<i>T. viride</i>	-26,61	-26,33	-27,72	-25,88	-26,80 ± 0,92
		-11,18	-11,21	-11,21	-11,21 ± 0,00

La biomasse initiale possède un $\delta^{13}\text{C}$ correspondant à celui des plantes C3. Ce qui est cohérent puisqu'elle est cultivée dans un milieu minéral contenant du malt (orge, plante C3). Par conséquent, l'assimilation du glucose C3 ne peut pas être démontrée par le flux isotopique. Toutefois, la croissance de la biomasse dans le milieu C3 macroscopiquement abondante et la qualité nutritive de ce substrat suggèrent une bioassimilation du glucose C3. Concernant l'assimilation du glucose C4, la biomasse finale à -11‰ pour les deux champignons démontre le flux isotopique du substrat (-11,18‰) vers la biomasse fongique (elle est passée de -26‰ à -11‰). Le glucose C4 a bien été assimilé par les deux espèces fongiques.

Nous pouvons donc considérer que :

- **La méthode des flux isotopiques pour visualiser la bioassimilation des molécules simples en milieu liquide est validée.**
- **La préadaptation de la biomasse fongique est réussie.**

- Ces champignons n'utilisent pas un métabolisme discriminant lors de l'assimilation du glucose car la valeur isotopique de la biomasse obtenue est proche de celle du substrat bioassimilé.

Ces résultats sont en contradiction avec les travaux d' Abraham and Hesse (2003) qui trouvent une biomasse fongique appauvrie en ^{13}C lorsqu'elle est cultivée en présence de glucose à -23‰. Dans ce domaine, les travaux ne convergent pas : la biomasse fongique peut révéler un enrichissement en présence de mannose C4 ou de saccharose C3 et aucun fractionnement en présence de mannose à -23‰ ou de saccharose C4 (Abraham and Hesse, 2003, Henn and Chapela, 2000). Les études de fractionnement isotopiques dans le métabolisme fongique doivent être approfondies.

B. La culture de la biomasse fongique sur un feutre végétal

Nous avons choisi dans un premier temps d'effectuer le test de bioassimilation avec le feutre lin.

1. La signature isotopique du feutre végétal

Le feutre est synthétisé à partir de co-produits des coopératives linières, la valeur isotopique du feutre végétal lin est celui des plantes C3 (-26, -28‰). Les résultats de l'analyse isotopique du feutre sont présentés dans le tableau 20.

Tableau 20 : $\delta^{13}\text{C}$ du feutre végétal

substrats	$\delta^{13}\text{C}$ attendu (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ mesurés (‰)		$\delta^{13}\text{C}$ moyen (‰)
		essai 1	essai 2	
feutre lin	-26 à -28	-28,23	-28,36	-28,30 ± 0,07

Dans la gamme attendue, le feutre végétal possèdent un $\delta^{13}\text{C}$ de -28,3‰, à l'image des plantes C3. Les feutres sont ensemencés sur la face supérieure avec une biomasse fongique précultivée dans le milieu C4. Le mycélium néosynthétisé est prélevé sur une face latérale.

2. Signature isotopique de la biomasse fongique néosynthétisée

Les différentes formes fongiques de croissance (spores, mycélium et carpophores) ont été prélevées afin de réaliser l'analyse isotopique. Les résultats sont présentés dans le tableau 21 :

Tableau 21 : $\delta^{13}\text{C}$ de la biomasse fongique au cours du temps (‰)

		Nov	Dec	Jan	Fev	Mars	Avr	Mai	Juin
A	spores	-12,41	INCUBATION			-27,33	-26,92	-27,69	
(Pc)	mycélium	-12,41						-23,20	-23,39
B	mycélium	-12,41		-24,02	-23,76	-24,22	-25,07		
(Pc)	carpophore	-12,41						-24,56	-25,17
C	mycélium	-14,05		-25,23	-26,24	-26,03	-25,03		
(Tv)	carpophore	-14,05						-25,58	
D	mycélium	-14,05		-25,11	-25,00	-25,43	-25,25	-25,32	
(Tv)	carpophore	-14,05							-25,50

A et B, Cet D sont des réplicats. Dès le premier prélèvement, la biomasse se situe vers les valeurs isotopiques du substrat à bioassimiler, une transition progressive entre les deux types de marquage ne s'est pas produite sur la face de prélèvement.

Afin de mieux distinguer le passage d'un marquage C4 à un marquage C3, preuve de la bioassimilation du feutre végétal, les résultats sont présentés sous forme graphique. La zone de valeurs isotopiques des plantes C4 est repérée par la couleur rose, celle des plantes C3 par la couleur jaune. L'évolution de la valeur isotopique de la biomasse néosynthétisée est indiquée (figure 49 pour *P. chrysosporium* et 50 pour *T. viride*).

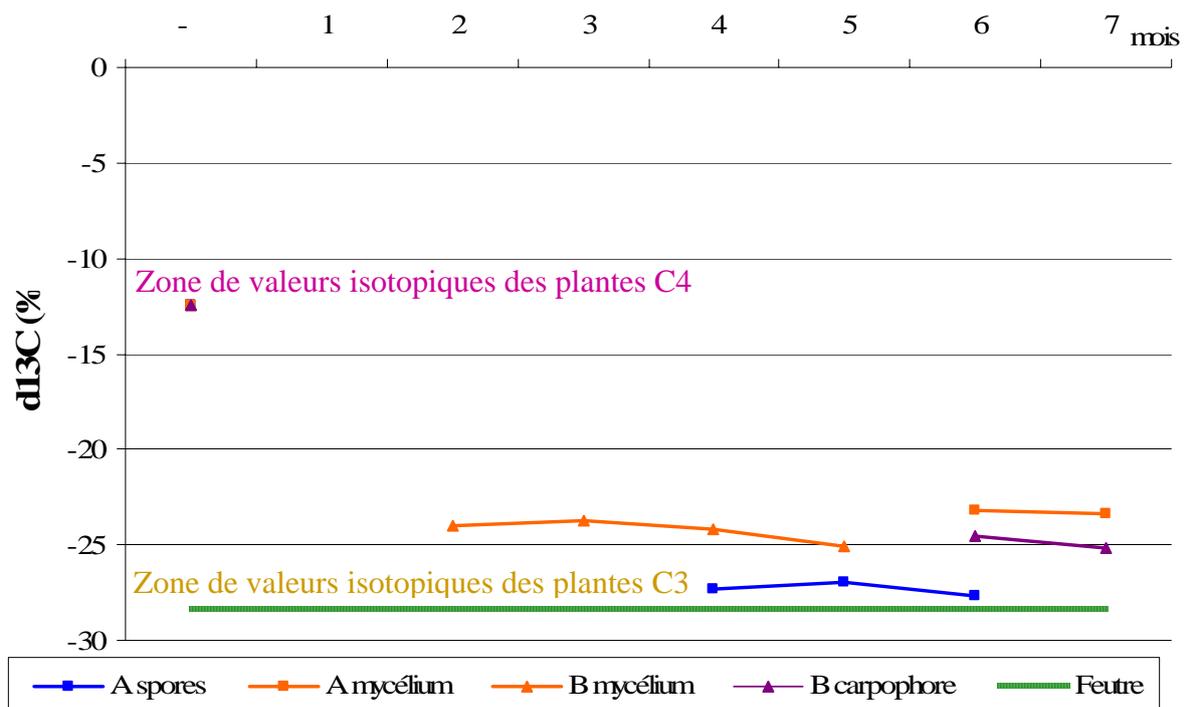


Figure 49 : Evolution des signatures isotopiques *P. chrysosporium* sur le feutre

D'une façon générale, la valeur isotopique de la nouvelle biomasse fongique de *P. chrysosporium* s'est approchée de celle des plantes C3. Il existe des différences en fonction de la structure de croissance. Les spores de *P. chrysosporium* possèdent une signature isotopique vers -27‰ et se situent ainsi dans la gamme des plantes C3. Le carbone des spores est issu du substrat : le feutre a été bioassimilé pour la synthèse des spores. La valeur isotopique du mycélium de *P. chrysosporium* se situe vers -24, -25‰, légèrement inférieure à celle des plantes C3. Les carpophores se situent dans les mêmes valeurs, ce qui est cohérent puisqu'un carpophore est le fruit d'une association de mycéliums. Le mycélium et les spores possèdent une anatomie différente donc ils sont issus de voies anaboliques différentes, ce qui peut expliquer la différence de valeurs isotopiques. Certaines voies anaboliques produisent des molécules plus ou moins enrichies par rapport au substrat initial (lignines appauvries, pectines enrichies par rapport à la plante entière) (Hayes, 2001).

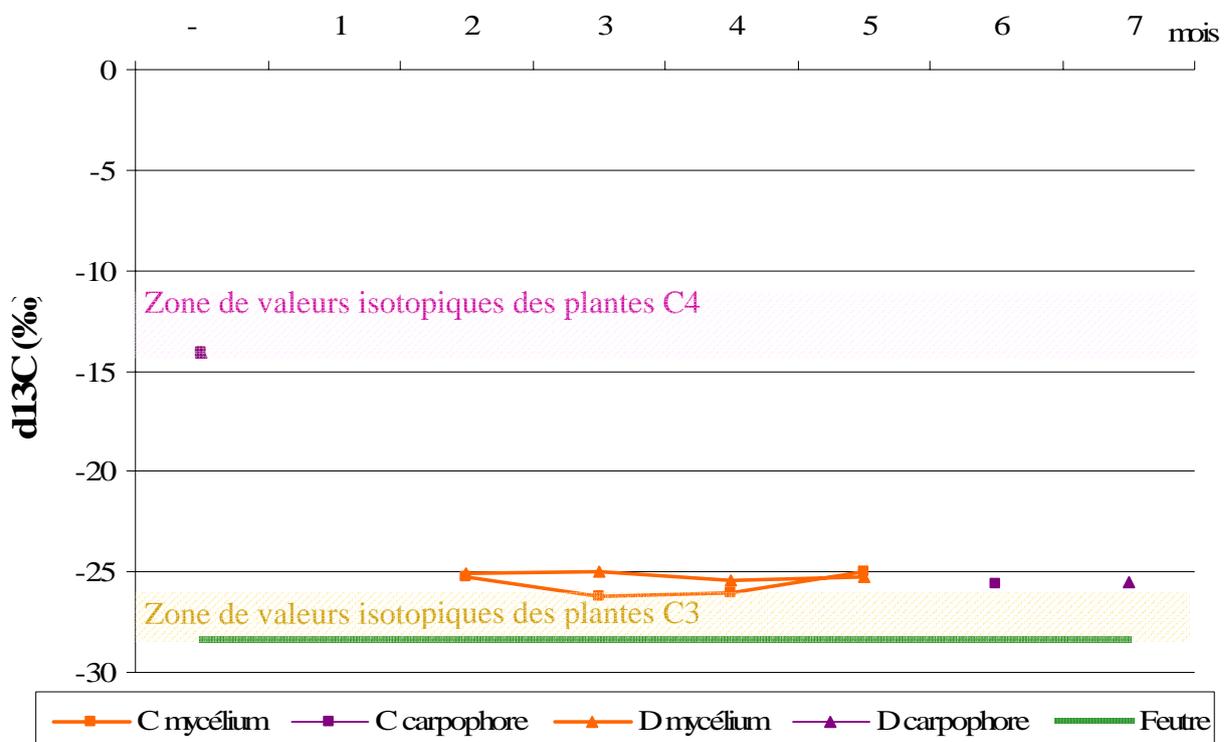


Figure 50 : Evolution des signatures isotopiques *T. viride* sur le feutre.

La valeur isotopique du mycélium de *T. viride* s'est approchée de celle des plantes C3. Le mycélium a été synthétisé à partir de la matière végétale, le feutre est considéré comme bioassimilable par *T. viride* en source unique de nutriments. Les valeurs isotopiques des carpophores se situent dans les mêmes valeurs que le mycélium.

3. Comparaison entre des valeurs isotopiques de la biomasse fongique

Les mycéliums des deux souches fongiques sont plus riches en ^{13}C que le feutre. Les champignons possèderaient un métabolisme discriminant qui peut se produire soit lors du catabolisme des nutriments, soit lors la synthèse du mycélium. La forme sporulée de *P. chrysosporium* ne montre pas ou faiblement de discrimination. Pour une même souche sur un même substrat, les voies cataboliques des fibres végétales sont identiques. La synthèse de spores et de mycélium donnant lieu à des valeurs isotopiques différentes, la discrimination devrait se produire lors des voies anaboliques.

Les valeurs isotopiques du mycélium de *P. chrysosporium* vers -23, -24‰ suggèrent une biomasse plus enrichie en ^{13}C que celle de *T. viride* (-25, -26‰). *P. chrysosporium* adopterait un métabolisme plus discriminant que *T. viride*.

Sans surprise, le feutre végétal testé est bioassimilable par les deux souches fongiques sélectionnées en substrat unique. En effet, les champignons telluriques sont impliqués dans la décomposition de la matière organique, ils possèdent le système de dégradation des fibres lignocellulosiques, constituants principaux des feutres. Ce témoin positif nous permet de valider ce test de bioassimilation en milieu solide et d'étudier un nouveau type de substrat, le film de paillage agricole.

C. La culture de la biomasse fongique sur les films de paillage

Le test de bioassimilation est réalisé sur deux films de paillage de composition différente, le premier est composé principalement de farine de céréales et de polyester, le second est constitué de polyester.

1. La signature isotopique des films

Le tableau 22 présente les résultats de l'analyse isotopique des films de paillage. La composition des films de paillage est sous la confidentialité de l'industriel qui nous les a fourni, nous ne pouvons pas prédire la valeur isotopique du film farine/polyester. En effet, nous ne connaissons pas la nature des céréales (C3 ou C4) ni les proportions farine/polyester. En revanche, la valeur isotopique du film principalement composé de polyester devrait tendre vers - 30‰ (teneurs isotopiques des produits pétrochimiques).

Tableau 22 : $\delta^{13}\text{C}$ des films de paillage

Substrats	$\delta^{13}\text{C}$ attendu (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ mesurés (‰)		$\delta^{13}\text{C}$ moyen (‰)
		essai 1	essai 2	
Film farine/polyester	inconnu	-26,14	-26,09	-26,12 ± 0,02
Film polyester	-30‰	-32,33	-32,34	-32,33 ± 0,01

La valeur isotopique du film de paillage farine/polyester se situe dans la zone des plantes C3, l'ensemencement est réalisé avec une biomasse issue d'un milieu C4. Le film polyester possède une signature isotopique vers -32‰, il est ensemencé avec les deux types de flore (C3 et C4) car la bioassimilation peut être visualisée dans les deux cas. Un nouveau code couleur apparaît (gris) pour les valeurs des produits issus de la pétrochimie.

L'ensemencement du film de paillage farine/polyester est également réalisé avec les micro-organismes marqués C3 pour deux raisons. La première se place sur un plan technique : afin de pouvoir comparer la bioassimilation, la croissance fongique ou une éventuelle biodétérioration du film contenant une source végétale avec le comportement de celui qui n'en possède pas, nous devons réaliser les mêmes ensemencements. La deuxième raison est d'ordre analytique : le film farine/polyester étant composé de différentes molécules, certaines peuvent posséder une valeur isotopique proche des plantes C4, notamment si le mélange de céréales contient des plantes d'origine C4.

2. Signature isotopique de la biomasse fongique néosynthétisée

Les photographies suivantes permettent d'observer la colonisation microbienne sur les films (figure 51). Les films de couleur sont composés de farine de céréales et de polyester, les films transparents sont constitués de polyester seul. Les taches plus foncées qui sont réparties sur la surface du film représentent les fractions de mycélium qui ont été ensemencées. Il ne faut pas les confondre avec des colonies microbiennes. Le champignon doit se développer sous forme de mycélium ou de spores.

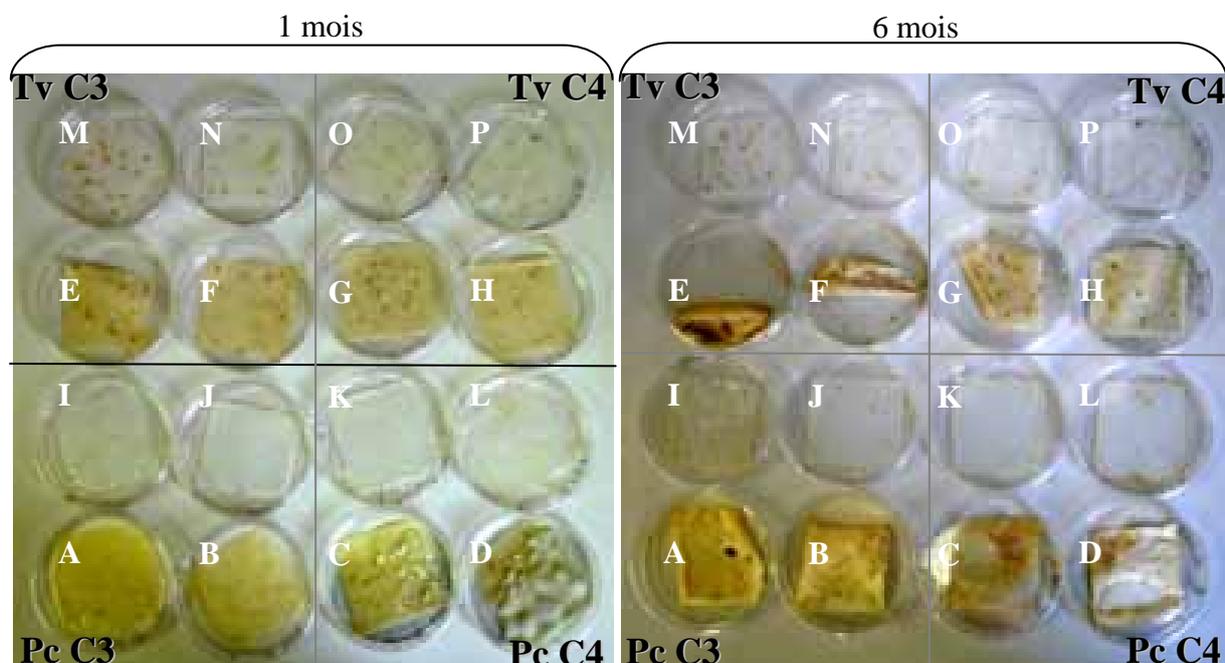


Figure 51 : Photographies de films de paillage farine/polyester et polyester avec *P. chrysosporium* et *T. viride* pré-cultivés dans les milieux C3 et C4.

Comme ces photographies le montrent, la biomasse fongique néosynthétisée est souvent peu présente, quelques prélèvements se sont avérés impossibles. Les valeurs isotopiques de la biomasse fongique sont présentées dans le tableau 23.

Tableau 23 : Les valeurs isotopiques de la biomasse fongique

Identification	Substrat	t = 0 mois biomasse ensemencée	t = 3 mois	t = 6 mois
A	Farine/polyester -26,1‰	Pc C3 -27,7‰	Quantité insuffisante	-15,4‰
B	Farine/polyester -26,1‰	Pc C3 -27,7‰	Quantité insuffisante	Quantité insuffisante
C	Farine/polyester -26,1‰	Pc C4 -12,4‰	Quantité insuffisante	Quantité insuffisante
D	Farine/polyester -26,1‰	Pc C4 -12,4‰	-16‰	Quantité insuffisante
E	Farine/polyester -26,1‰	Tv C3 -27,5‰	Quantité insuffisante	-11,4‰
F	Farine/polyester -26,1‰	Tv C3 -27,5‰	Quantité insuffisante	-11,0‰

G	Farine/polyester -26,1‰	Tv C4 -14,3‰	Quantité insuffisante	Quantité insuffisante
H	Farine/polyester -26,1‰	Tv C4 -14,3‰	Quantité insuffisante	Quantité insuffisante
I	Polyester -32,3‰	Pc C3 -27,7‰	Quantité insuffisante	-26,5‰
J	Polyester -32,3‰	Pc C3 -27,7‰	Quantité insuffisante	Quantité insuffisante
K	Polyester -32,3‰	Pc C4 -12,4‰	Quantité insuffisante	-19,5‰
L	Polyester -32,3‰	Pc C4 -12,4‰	Quantité insuffisante	-19,0‰
M	Polyester -32,3‰	Tv C3 -27,5‰	Quantité insuffisante	Quantité insuffisante
N	Polyester -32,3‰	Tv C3 -27,5‰	Quantité insuffisante	Quantité insuffisante
O	Polyester -32,3‰	Tv C4 -14,3‰	Quantité insuffisante	-12,7‰
P	Polyester -32,3‰	Tv C4 -14,3‰	Quantité insuffisante	-12,5‰

Ce tableau montre la principale difficulté de ce nouveau test: obtenir de la biomasse. Si les micro-organismes présentent des difficultés pour s'adapter au substrat, il sera difficile de réaliser le test en substrat unique. L'analyse nécessite une dizaine de milligrammes de matières sèches (donc approximativement 100 mg de mycélium).

Quelques cas s'avèrent exploitables et intéressants :

- **A** : *P. chrysosporium* C3 ensemencé sur le film farine/polyester. Alors que cette association paraissait inutile en apparence (valeurs isotopiques proches), la valeur à - 15,4‰ suscite une interrogation. L'hypothèse immédiate est la présence, dans la farine de céréales, d'un composé issu d'une plante C4 qui a été utilisé comme nutriment par les micro-organismes. Il est difficile de conclure sur un seul test (manque de biomasse sur son réplicat).

- **D** : *P. chrysosporium* C4 ensemencé sur le film farine/polyester. Le résultat à -16‰ suggère deux hypothèses. La première est une contamination du nouveau mycélium par l'inoculat

initial lors du prélèvement. La seconde est une bioassimilation du film qui est en cours. Le manque de biomasse fongique à 6 mois d'incubation ne nous permet de choisir entre ces deux hypothèses.

- **E et F** : *T. viride* C3 ensemencé sur le film farine/polyester. Les résultats isotopiques indiquent des valeurs à -11,4 et -11‰. La situation est similaire à celle présentée en A, à savoir que le mycélium est issu d'une substance marquée C4 présente dans le film farine/polyester. Trois tests avec les deux espèces de champignons présentent des résultats significatifs. Le polyester ayant une valeur isotopique à -32‰, il n'est pas utilisé comme nutriments par les micro-organismes. Il reste alors la farine de céréales et les éventuels additifs ou liants qui ont pu servir lors de la formulation du film. La molécule bioassimilée à l'origine des réactions anaboliques doit posséder des qualités nutritionnelles (oses, protéines lipides). Cette remarque nous oriente vers l'hypothèse que la farine de céréales serait à l'origine du mycélium néosynthétisé donc qu'elle contient des molécules C4.

- **L** : *P. chrysosporium* C3 sur le film en polyester. La valeur isotopique à -26,5‰ laisse envisager 3 hypothèses :

1. Le champignon utilise le polyester comme source nutritive en adoptant un métabolisme discriminant.

2. Le champignon n'utilise que certaines molécules structurant le film dont la valeur isotopique serait proche de -26, -27‰. La formulation et la composition du film étant sous confidentialité, il est difficile d'affiner cette hypothèse.

3. Le champignon vit de ses réserves, il est également capable d'utiliser son propre mycélium comme source nutritive. Cette hypothèse paraît la moins probable car le mycélium est présent sur le périmètre de l'échantillon (figure 52), ce qui correspond aux accès facilités à d'éventuels nutriments.

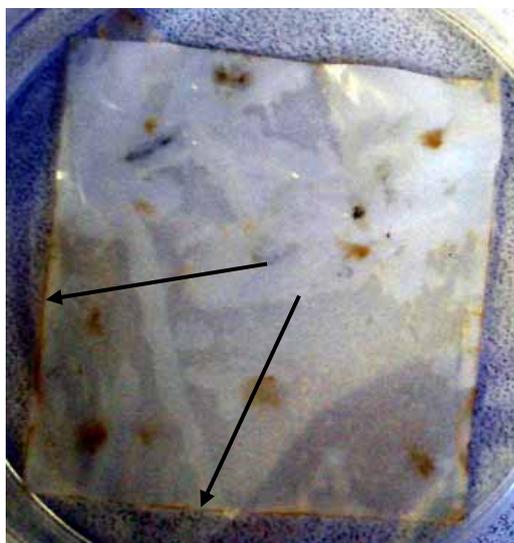


Figure 52 : Photographie montrant le développement du mycélium aux extrémités du film.

- **K et L** : *P. chrysosporium* C4 sur le film en polyester. Les résultats à -19,5‰ et -19‰ montrent que les valeurs isotopiques se situent entre celle de la biomasseensemencée et celle du substrat. Deux hypothèses peuvent être énoncées.

1. Le mycélium est issu des réserves du champignon pour une part et du polyester pour une autre part.

2. Le mycélium est issu des réserves marquées C4 et des traces de polyester ont pollué l'échantillon lors du prélèvement.

Le mycélium étant présent sur le périmètre du film, la première hypothèse serait à privilégier. Si le champignon utilise uniquement ses propres réserves pour proliférer, pourquoi se développerait-il sur le périmètre du film et non à la surface, lieu de l'ensemencement ? De plus, les valeurs isotopiques de la biomasse fongique étant proches dans les deux boîtes de Pétri, la probabilité d'incorporer de façon accidentelle une quantité similaire de polyester est faible. Il est probable que lors de la découpe du film, l'accessibilité à certaines structures du film et surtout la fragmentation mécanique de certains polymères en molécules assimilables aient pu avoir lieu.

- **O et P** : *T. viride* C4 sur le film en polyester. Les valeurs isotopiques sont de - 12,7 et - 12,5‰. La faible quantité de mycélium a été synthétisée à partir des réserves.

Lorsque la présence de biomasse fongique néosynthétisée le permet, la comparaison des valeurs isotopiques se révèle assez proche pour des réplicats (E et F, K et L, O et P) de matière biologique. Ce test est donc répétable. A l'issue de ces résultats et des six mois d'incubation, les films de paillage ne sont pas facilement assimilables par une seule espèce fongique en source unique de nutriments. Rappelons que le test n'est pas représentatif du milieu naturel. Toutefois, ces résultats donnent une approche des difficultés rencontrées par les micro-organismes pour s'adapter à un matériau d'origine anthropique. De même, les micro-organismes ont besoin de macroéléments (N, P, S notamment) et microéléments (vitamines, facteurs de croissance par exemple) qu'ils n'ont pas trouvés ou n'ont pas su assimiler dans les films de paillage mais dont la présence sous une forme assimilable est probable dans le milieu naturel. Pour une première version de ce test de bioassimilation, nous avons choisi une base la plus simple possible (substrat et micro-organismes) pour faciliter l'interprétation. Il peut évoluer vers une version avec un apport d'oligoéléments pour pallier les carences.

3. Comparaison des comportements fongiques sur les films de paillage❖ Entre *P. chrysosporium* et *T. viride*

Afin de faciliter la comparaison entre les deux souches fongiques, les valeurs isotopiques de la nouvelle biomasse ont été reportées dans le tableau 24.

Tableau 24 : Comparaison des valeurs isotopiques des deux espèces fongiques

	Pc C3	Tv C3
Film farine/polyester	- 15,4‰	-11,2‰

	Pc C4	Tv C4
Film polyester	-19,3‰	-12,3‰

Concernant les tests de bioassimilation du film farine/polyester par les champignons marqués C3, la nouvelle biomasse de *T. viride* est marquée C4, donc probablement issue de molécules C4 qui entrent dans la composition de la farine. La valeur isotopique de *P. chrysosporium* est moins marquée C4. L'une des différences entre ces deux espèces est leur capacité catalytique : *P. chrysosporium* possède une double compétence, à la fois radicalaire et enzymatique, pour cliver les polymères alors que *T. viride* est doté principalement d'un système enzymatique. Ainsi, les nutriments utilisés par *T. viride* sont issus d'un clivage enzymatique d'un substrat facilement hydrolysable (polysaccharides, protéines, lipides). *P. chrysosporium*, grâce à ses capacités radicalaires, peut cliver de façon non spécifique. Par conséquent, les nutriments peuvent être un mélange de molécules facilement assimilables présentes dans la farine et de molécules plus récalcitrantes comme le polyester avec, logiquement, une part plus importante de molécules facilement hydrolysables.

Cette interprétation est cohérente avec les résultats exprimés par les tests de bioassimilation du polyester. *T. viride* éprouve des difficultés, voire n'en a pas les capacités, à cliver le polyester car il ne possède pas les estérases spécifiques de ce polyester. Le mycélium synthétisé en faible quantité est issu des molécules de réserves. *P. chrysosporium*, par l'intermédiaire de radicaux libres, réussit, de façon aléatoire, à couper le polyester et à transformer les monomères sous une forme nutritive. Par conséquent, sa valeur isotopique s'éloigne de la signature isotopique ensemencée initialement. Elle n'atteint pas, à ce stade d'incubation (6 mois), la valeur isotopique du substrat, celui-ci n'étant pas d'une grande valeur nutritive.

❖ Entre les précultures C3 et C4

Par manque d'information concernant *T. viride*, cette comparaison ne peut s'effectuer uniquement sur l'espèce *P. chrysosporium* (tableau 25).

Tableau 25 : Comparaison des valeurs isotopiques entre les deux types de préculture C3 et C4

	Pc C3	Pc C4		Pc C3	Pc C4
Film		-15,4‰	Film		
farine/polyester	-16‰		polyester	-26,5‰	-19,3‰

Les résultats sont plus difficiles à interpréter. Les valeurs isotopiques des biomasses néosynthétisées issues des deux types de précultures C3 et C4 sur le film farine/polyester sont proches. Le champignon aurait ainsi assimilé une molécule de signature isotopique similaire dans chacun des cas. De façon logique et indépendante de leur passé nutritif (C3 ou C4), les champignons en présence d'un substrat facilement assimilable (protéines, polysaccharides, lipides par exemples) l'utilisent comme nutriment. Cette observation ne se répétant pas avec *Trichoderma viride*, faute de biomasse suffisante, notre interprétation doit être traitée avec beaucoup de prudence.

Nous pouvons constater que le champignon précultivé dans un milieu C4 s'est plus vite adapté au matériau par rapport à la biomasse précultivée dans un milieu C3. De même, sur le film polyester, le champignon précultivé dans un milieu C4 semble avoir assimilé quelques éléments du film de paillage alors que la biomasse précultivée dans un milieu C3 a tendance à s'éloigner de la signature isotopique du substrat.

Pourquoi une souche fongique précultivée dans un milieu C4 serait-elle plus performante que la même souche précultivée dans un milieu C3 ?

Une molécule de glucose possède la même structure chimique, indépendamment de la plante responsable de sa synthèse. C'est la répartition des isotopes du carbone qui diffère. Nous pouvons émettre trois hypothèses :

1. Les deux flacons de glucose sont de sources industrielles, donc peuvent contenir des impuretés. Ces dernières ont pu orienter le métabolisme vers la synthèse de certaines molécules ou au contraire la bloquer. Le développement fongique dans la solution glucosée engendre une coloration différente selon la nature du milieu. Le métabolisme est donc différent. Il faudrait analyser de façon plus précise les éléments présents dans les deux flacons de glucose.

2. La répartition des isotopes du carbone a une influence sur les systèmes de dégradation fongiques (synthèse des enzymes, activation des radicaux libres)
3. Cette observation est une coïncidence. D'ailleurs, dans le cas de l'ensemencement de *T. viride* sur le film farine/polyester, c'est la souche pré-cultivée dans le milieu C3 qui prolifère.

Afin de choisir entre ces différentes hypothèses, une analyse de la composition des glucoses sera réalisée ultérieurement.

Cette nouvelle approche dans l'évaluation de la bioassimilation ayant intéressé des partenaires participant à ce projet, nous avons testé un second polymère plastique.

D. La culture de la biomasse fongique sur Néosac

Le néosac est un film plastique contenant du polyéthylène additivé (avec un oxydant qui s'active sous certaines conditions de température et de lumière). Deux conditions opératoires sont adoptées, l'une en conditions naturelles de luminosité sur la paille, la seconde à l'obscurité (boîte de Pétri enveloppée dans du papier aluminium). Deux types de néosac ont été fournis, ils sont nommés néosac 1 et néosac 2. La composition chimique précise est inconnue, de même que la différence entre les deux types de néosac. L'interprétation ne sera donc basée que sur les résultats isotopiques.

1. La signature isotopique des films

Si la formulation du film est réalisée avec des polymères issus de la pétrochimie, leur signature isotopique sera proche de -30‰. Les résultats des analyses isotopiques sont indiqués dans le tableau 26.

Tableau 26 : $\delta^{13}\text{C}$ des néosacs

Substrats	$\delta^{13}\text{C}$ attendu (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ mesurés (‰)
Néosacs 1	inconnu	- 29,79‰
Néosacs 2	inconnu	- 29,83‰

Les néosac possèdent des valeurs isotopiques assez proches de celle des produits issus de la pétrochimie. Ils sontensemencés avec *Phanerochaete chrysosporium* (double compétence catalytique) pré-cultivé dans les milieux C3 et C4.

2. Observations macroscopiques de la biomasse fongique néosynthétisée

L'évolution de la colonisation de *Phanerochaete chrysosporium* sur les deux types de néosac est observée (figure 53).

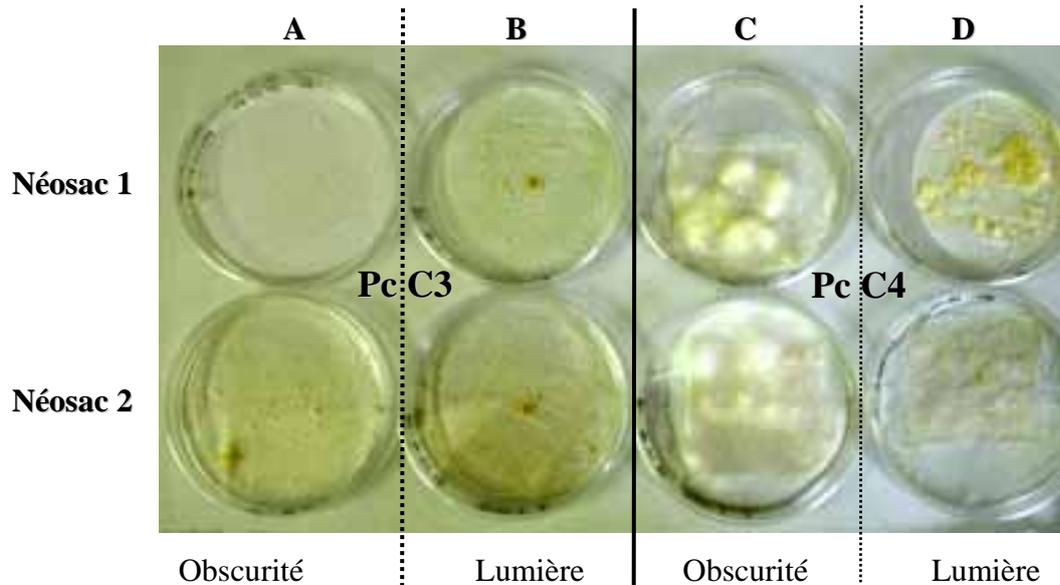


Figure 53 : Photographie de la colonisation des néosac par *P. chrysosporium* (1 mois d'incubation).

Macroscopiquement, nous observons que la colonisation démarre plus facilement avec *P. chrysosporium* pré-incubé dans un milieu C4, et de façon prépondérante en conditions d'obscurité. La raison pour laquelle le mycélium est plus abondant en conditions d'obscurité par rapport aux conditions lumineuses est la conservation d'une atmosphère humide lorsque la boîte de Pétri est enveloppée dans du papier aluminium. La cause de la performance de la souche pré-cultivée en milieu C4 par rapport au milieu C3 sur les néosac pourrait être similaire à celle observée sur le film de paillage en polyester mais elle reste encore inexplicée. La figure 54 montre l'évolution de la colonisation à 4 mois d'incubation.

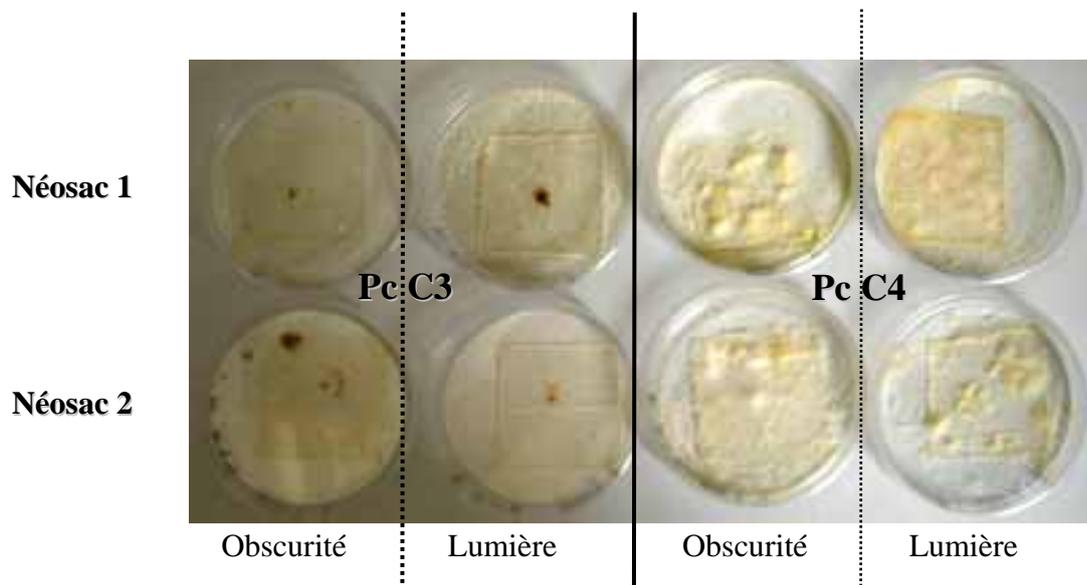


Figure 54 : Photographie de la colonisation des néosac par *P. chrysosporium* (4 mois d'incubation).

La biomasse fongique n'est pas abondante sur les néosac, ce n'est pas une source de nutriments facilement assimilables en substrat unique. Du mycélium est présent par la colonisation de *P. chrysosporium* marqué C4 sur les deux types de films et dans les deux conditions opératoires.

3. Signature isotopique de la biomasse fongique néosynthétisée

Les résultats de l'analyse isotopique du mycélium prélevé sur les néosac sont présentés dans le tableau 27 :

Tableau 27 : $\delta^{13}\text{C}$ de la biomasse fongique prélevé sur les néosacs

	t = 0 mois		t = 1,5 mois	t = 4,5 mois
Néosac 1 - 29,79‰	Pc C4 -12,6‰	Obscurité	- 10,3‰	- 10,8‰
		Lumière		- 11,6‰
Néosac 2 - 29,83‰	Pc C4 -12,6‰	Obscurité	- 10,8‰	- 10,0‰
		Lumière		- 10,8‰

Les résultats de l'analyse isotopique du mycélium ayant proliféré sur les néosac sont de l'ordre de -10, -11‰, le mycélium n'a pas été synthétisé à partir du film. Le champignon a probablement utilisé ses réserves dans un premier temps puis son propre mycélium à l'épuisement de ses réserves. Les néosac ne sont pas facilement bioassimilables par *Phanerochaete chrysosporium* en source unique de nutriments. La teneur isotopique du mycélium au cours du temps est du même ordre de grandeur. De même, les conditions opératoires "lumière" et "obscurité" ne présentent pas de différences isotopiques majeures.

En revanche, il semble que *P. chrysosporium* adopte un métabolisme discriminant d'environ 2‰, la biomasse obtenue étant enrichie par rapport à la biomasse ensemencée. La même situation (utilisation des réserves comme nutriment) avait été rencontrée avec *T. viride* marqué C4 (-14,3‰) ensemencé sur le film en polyester (boîtes de Pétri O et P). La biomasse analysée était de -12,6‰. Dans ce cas, un enrichissement de la biomasse synthétisée est également observé. Plusieurs hypothèses peuvent être émises :

1. Le fractionnement isotopique a lieu lors de la synthèse des molécules de réserves, soit au niveau du catabolisme des nutriments, soit de l'anabolisme des molécules de réserves.
2. Le fractionnement isotopique s'effectue lors de la synthèse du mycélium, soit lors du catabolisme des molécules de réserves, soit lors de la synthèse du mycélium.

Dans le tableau 28 sont reportés les résultats isotopiques des substrats et de la biomasse qui en est issue. Quatre situations, avec un flux isotopique avéré, ont été choisies en précisant si le mycélium est issu du substrat (bioassimilation prouvée) ou des réserves :

- mycélium de *P. chrysosporium* et *T. viride* qui ont proliféré sur une face latérale du feutre végétal (bioassimilation prouvée)
- mycélium de *T. viride* sur le film en polyester avec absence de bioassimilation du film de paillage, donc le mycélium est issu des réserves du champignon.
- mycélium de *P. chrysosporium* sur les néosac avec absence de bioassimilation et synthèse du mycélium à partir des réserves.

Tableau 28 : Comparaison des enrichissements isotopiques entre les différentes origines du mycélium

Micro-organisme	Pc	Tv	Tv	Pc
	-12,4‰	-14,0‰	-14,3‰	-12,6‰
Substrat	Feutre	Feutre	réserves	réserves
	-28,3‰	-28,3‰	???	???
mycélium	-23,9‰	-25,4‰	-12,6‰	-10,7‰
enrichissement	4,4‰	2,9‰	1,7‰	1,9‰

L'enrichissement est plus marqué avec un substrat externe (feutre) qu'avec les molécules de réserves mais se révèle différent dans chacun des cas. Dans le cas du feutre, l'enrichissement se situerait au niveau de la synthèse du mycélium. En revanche, dans le cas des molécules de réserves, il est impossible de distinguer s'il provient du catabolisme ou de l'anabolisme. Afin de tenter de répondre à cette question, il faut dans un premier temps connaître la valeur isotopique des molécules de réserves afin de déterminer si

l'enrichissement s'est produit entre le substrat et la synthèse de molécules de réserves ou entre celles-ci et la synthèse du mycélium.

4. Conclusion concernant la bioassimilation des films plastiques

Les polymères plastiques en substrat unique ne peuvent pas être considérés comme facilement bioassimilables en présence d'une seule souche fongique. Lorsque le matériau possède une partie d'origine végétale possédant probablement des molécules hydrolysables, la souche fongique utilise ces molécules comme nutriments. Malgré cet apport nutritionnel, en six mois, *T. viride* ne semble pas s'être adapté au polyester (absence de synthèse d'estérases ou absence de transformation des oligomères/monomères en molécules assimilables). En revanche, *P. chrysosporium*, grâce à sa double compétence catalytique (radicalaire et enzymatique), clive à la fois la farine et le polyester avec une préférence nutritionnelle pour la farine. En revanche, il est totalement inefficace sur le néosac.

Les micro-organismes telluriques en monoculture ont des difficultés à s'adapter à des matériaux qui contiennent des polymères issus de la pétrochimie. Un consortium de micro-organismes serait préférable, chacun apportant ses capacités catalytiques pouvant générer des nutriments pour les autres. De plus, d'éventuels métabolites sécrétés par les uns peuvent servir de substrats pour les autres. En revanche, ils peuvent également s'attaquer entre eux par l'intermédiaire de molécules toxiques. Le test de bioassimilation devient alors plus complexe et les substrats d'assimilation peuvent s'avérer difficiles à identifier car les métabolites sécrétés ou la biomasse microbienne morte peuvent alors servir de substrat.

E. La bioassimilation au sein des tests de biodégradabilité

Ce nouveau test de bioassimilation apporte une preuve qualitative d'une bioassimilation initiale des produits testés mais aucune notion de temps n'a été incorporée au test. Or la durée de biodégradation est un paramètre important pour de nombreuses applications. Elle fournit des indications sur les phénomènes d'accumulation et donc de toxicité potentielle dans l'environnement. En attendant une version améliorée de ce test, il doit être couplé à des tests respirométriques qui permettent de quantifier le taux de minéralisation en fonction du temps.

Des tests respirométriques selon la norme ISO 14852 ont été réalisés sur des films plastiques similaires à ceux étudiés. La biodégradabilité est évaluée selon la quantité de CO₂

dégagée par les micro-organismes. Un film farine/polyester possède une biodégradabilité de 14,8% à 25°C et de 44,8% à 37°C après 90 jours d'incubation. Le néosac, à la même durée d'incubation, révèle une biodégradabilité de 1,2% à 25°C et 0% à 37°C.

Ces résultats sont en concordance à ceux de l'analyse isotopique des films de paillage. Les tests respirométriques fournissent une quantification de la minéralisation, une voie de bioassimilation. Cette donnée permet d'estimer le temps d'accumulation du substrat testé dans les conditions naturelles. L'analyse isotopique apporte des informations quant à l'incorporation de substrat dans la biomasse microbienne et l'assimilation préférentielle d'un polymère lorsque le substrat étudié est un composite. Dans l'objectif de réaliser un bilan carbone d'un substrat donné, il faudrait ajouter la quantification de carbone dans la biomasse microbienne aux tests respirométriques et/ou insérer un aspect quantitatif au test de bioassimilation. La corrélation entre la quantité de substrat dégradé et la qualité (nature des polymères bioassimilés, identification du devenir des polymères, ...) permet de valider l'insertion d'un composite donné dans le cycle de la matière.

F. La culture de la biomasse fongique dans un milieu contenant une molécule à spectre biocide

Les molécules à spectre biocide sont des substances considérées comme non biodégradables car leur fonction se révèle incompatible avec la nature du test. En effet, un test de biodégradabilité est défini par un système comprenant un substrat à dégrader par des micro-organismes dans un milieu de dégradation. En fonction du spectre d'action du biocide, une certaine quantité de micro-organismes meurent, le substrat ne révèle pas 60% de biodégradabilité donc il est considéré comme non biodégradable. Le test de bioassimilation apporte un nouvel angle en apportant la preuve qu'une substance potentiellement toxique pour certains micro-organismes peut s'avérer être un nutriment pour d'autres.

1. La signature isotopique de la substance biocide

La substance biocide qui nous a été fournie a été obtenue à partir de la valorisation des co-produits de l'industrie sucrière (betteraves). La formulation ne nous a pas été communiquée, elle est soumise à confidentialité. Le tableau 29 présente les résultats de l'analyse isotopique du substrat.

Tableau 29 : $\delta^{13}\text{C}$ de la substance biocide

Substrat	$\delta^{13}\text{C}$ attendu (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ mesurés (‰)		$\delta^{13}\text{C}$ moyen (‰)
		essai 1	essai 2	
biocide	-26 à -28	-32,99	-33,06	33,02 ± 0,04

La signature isotopique de la substance est proche de celle issue de la pétrochimie. La teneur isotopique est de -33‰. Une solution contenant la substance à activité biocide comme seule source de carbone estensemencée avec les deux souches fongiques *P. chrysosporium* et *T. viride* pré-cultivées dans les deux types de milieux C3 et C4.

2. Signature isotopique de la biomasse fongique néosynthétisée

Les deux souches fongiques ont proliféré dans la solution contenant la substance à activité biocide. La croissance est macroscopiquement moins importante que dans les solutions glucosées mais néanmoins non négligeable. Le tableau 30 présente les résultats de l'analyse isotopique de la biomasse prélevée dans la solution.

Tableau 30 : $\delta^{13}\text{C}$ de la biomasse fongique prélevée dans la solution contenant la substance à activité biocide

Substrat	t = 0 mois	t = 1,5 mois	t = 4,5 mois
Biocide -33‰	Pc C3 -26,4‰	-29,7‰	-31,2‰
Biocide -33‰	Pc C4 -11,6‰	-22,1‰	-28,5‰
Biocide -33‰	Tv C3 -26,1‰	-29,5‰	
Biocide -33‰	Tv C4 -11,8‰	-16,5‰	-20,7‰

La bioassimilation de la substance à activité biocide semble positive. Les résultats transposés sous forme graphique (figure 55) avec les deux zones C3 et C4 permettent de voir l'évolution de la signature isotopique de la biomasse fongique.

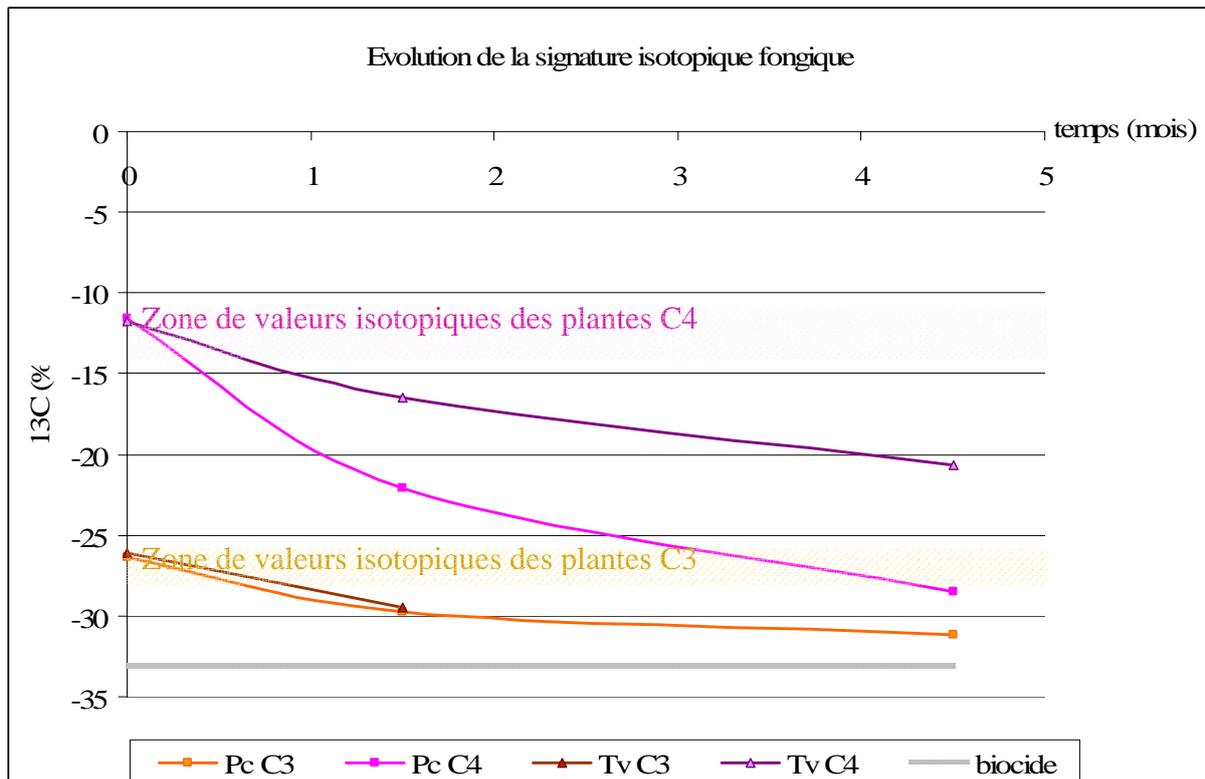


Figure 55 : Evolution de la signature de la biomasse fongique dans une solution contenant une substance à activité biocide.

Ce graphique montre que les quatre courbes, à savoir les deux souches fongiques dans les deux milieux de préculture, tendent vers la valeur isotopique de la substance à activité biocide. La courbe concernant *T. viride* C3 ne se poursuit pas faute de biomasse suffisante pour l'analyse. *P. chrysosporium* s'adapte mieux à ce substrat par rapport à *T. viride*.

Seule source carbonée du milieu, la substance à activité biocide peut être considérée comme bioassimilable par la flore fongique testée à la concentration utilisée (10g/L). Libérée de façon accidentelle ou non, cette molécule à une concentration de 1% est un substrat assimilable par la flore tellurique. Il faut également souligner que son spectre d'action n'atteint pas certains champignons telluriques tels que *P. chrysosporium* et *T. viride*.

G. Feutre/biocide

En fonction de son application, le feutre végétal ne doit pas être facilement assimilable par une flore microbienne. Disposant d'un biocide, une solution à 1g/L a été aspergée sur la face supérieure (la face d'ensemencement) d'un feutre L.

1. a signature isotopique du substrat feutre/biocide

Les résultats de l'analyse isotopique du feutre sont présentés dans le tableau 31.

Tableau 31 : $\delta^{13}\text{C}$ du feutre végétal/biocide

substrats	$\delta^{13}\text{C}$ attendu (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ mesurés (‰)		$\delta^{13}\text{C}$ moyen (‰)
		essai 1	essai 2	
feutre lin/biocide	-26 à -28	-28,05	-28,46	-28,26 ± 0,20

La valeur isotopique du feutre/biocide est similaire à celle du feutre seul (-28,30‰). De la même façon que pour le feutre, celui-ci estensemencé avec les deux souches fongiques précultivées dans un milieu C4. Les micro-organismes sontensemencés sur la face supérieure et la biomasse est prélevée sur une face latérale.

2. Observations macroscopiques

Les figures 56 et 57 montrent l'évolution macroscopique de la croissance des deux souches fongiques sur le feutre en lin L et sur un feutre L qui a été aspergé d'une solution d'une substance à activité biocide.

Similairement à sa prolifération sur le feutre végétal, *P. chrysosporium* adopte deux structures de croissance, l'un sous forme sporulée (spores vertes), la seconde sous forme mycélienne (blanche). Contrairement au feutre L, la forme sporulée est présente durant les six mois d'incubation. *T. viride*, sous forme de mycélium et possède une croissance plus abondante sur le feutre lin/biocide que sur le feutre seul. Les carpophores de *T. viride* n'apparaissent qu'à partir du 6^{ème} mois d'incubation sur le feutre contenant du biocide alors qu'ils apparaissent vers le troisième mois d'incubation sur le feutre. Un carpophore est une union de mycéliums lorsque les conditions deviennent défavorables. Ainsi, les champignons multiplient leur chance de survie en dispersant leur spores qui germineront dans un lieu plus favorable. La substance à activité biocide a fourni un substrat nutritif complémentaire.



Figure 56 : Evolution macroscopique de la prolifération de *P. chrysosporium* sur L et L/b



Figure 57 : Evolution macroscopique de la prolifération de *T.viride* sur L et L/b

3. Signature isotopique de la biomasse fongique néosynthétisée

Différentes formes de croissance fongique (spores, mycéliums et carpophores) ont été prélevées afin de réaliser l'analyse isotopique. Les résultats sont présentés dans le tableau 32 et représentés sous forme graphique sur la figure 58 :

Tableau 32 : $\delta^{13}\text{C}$ de la biomasse fongique au cours du temps (‰)

		Nov	Dec	Jan	Fev	Mars	Avr	Mai	Juin
E (Pc)	spores	-12,41	INCUBATION	-27,35	-27,55	-27,23	-28,48	-28,19	-28,19
F (Pc)	mycélium	-12,41		-23,69	-24,58	-24,42			
	carpophore	-12,41					-24,88	-24,48	-24,80
G (Tv)	mycélium	-14,05		-25,39	-24,66	-24,69	-24,67	-24,78	-26,66
H (Tv)	mycélium	-14,05		-24,46	-24,29	-24,74	-25,22	-25,20	

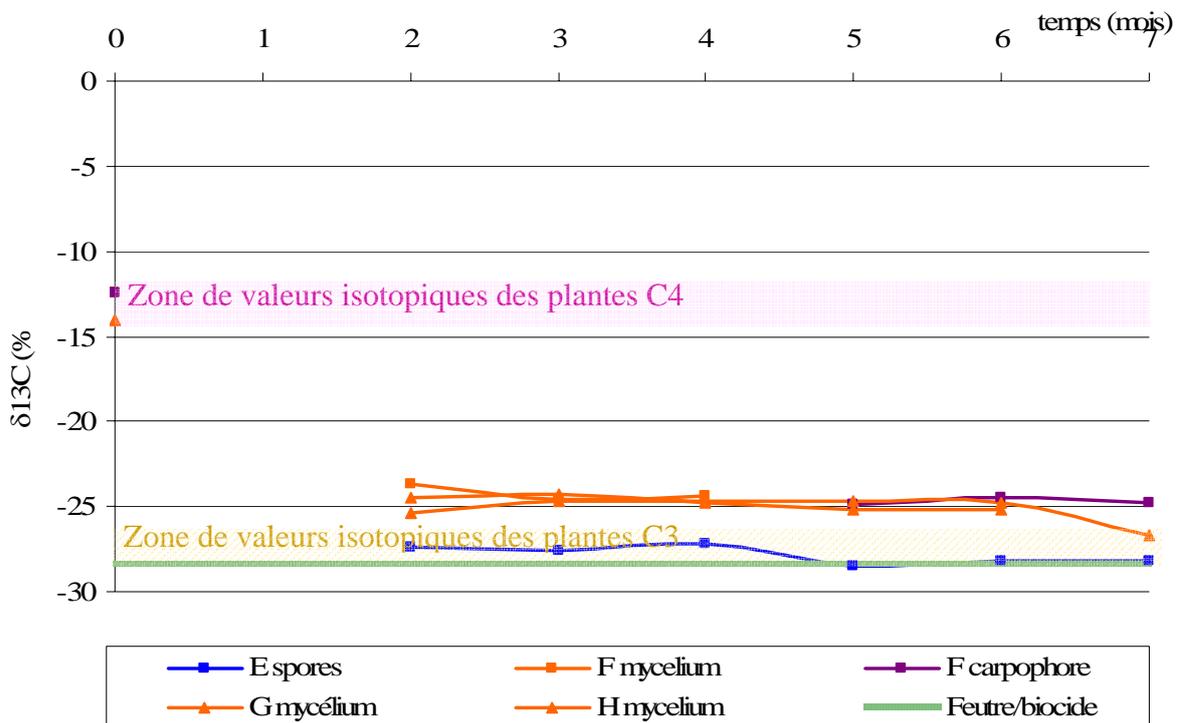


Figure 58 : Evolution des signatures isotopiques fongiques sur le feutre/biocide

Dès le second mois d'incubation (1^{er} prélèvement), la nouvelle biomasse fongique est marquée C3, elle a donc utilisé le feutre/biocide pour proliférer. La quantité de biocide sur le feutre étant trop faible, il est difficile de conclure sur l'assimilation préférentielle d'un des deux nutriments. La biomasse fongique ne présente pas un marquage "biocide" (-33‰) au

cours de la croissance. Les mycéliums présentent une valeur isotopique autour de -25‰. L'enrichissement isotopique des filaments mycéliens (métabolisme discriminant) est à nouveau observé. De même, la forme sporulée de *P. chrysosporium* plus proche des valeurs du substrat est confirmée. La forme sporulée étant conservée au cours du temps, les courbes de la valeur isotopique des spores et du substrat se confondent à partir du cinquième mois d'incubation.

H. Conclusion sur la visualisation de la bioassimilation par analyse isotopique

Cette version du test de bioassimilation est facile à mettre en œuvre mais nécessite deux savoir-faire principaux (microbiologiques et isotopiques). Elle requiert un certain nombre de dispositifs spécifiques (autoclave, paillasse stérile, hotte à flux laminaire, incubateur, lyophilisateur, four, banc de purification du CO₂, spectromètre de masse). De plus, le facteur temps est important (temps d'incubation pour le prémarquage, temps de colonisation des substrats et temps d'assimilation). En milieu liquide, une bioassimilation peut être visualisée en 4 à 6 mois. En milieu solide, 6 à 9 mois sont nécessaires.

Ce test permet de montrer que la biomasse microbienne synthétisée est réellement issue du substrat à dégrader. En présence de plusieurs molécules ou polymères, il peut indiquer quel est le substrat préférentiel, à condition que ces molécules présentent des valeurs isotopiques assez éloignées.

La difficulté de ce test est l'obtention de biomasse microbienne. Si le substrat ne possède pas les éléments essentiels à la vie microbienne, le micro-organisme présentera des difficultés d'adaptation. Les tests de bioassimilation peuvent être réalisés selon une procédure évolutive :

- 1^{er} niveau : test de bioassimilation sur substrat unique (la version présentée dans ce manuscrit)
- 2^{ème} niveau : test de bioassimilation en présence du substrat à tester et d'un milieu minéral contenant des macroéléments (N, S, P, Na, K) et des microéléments (Mg, Mn, Fe, Co, Cu, ...).
- 3^{ème} niveau : test de bioassimilation en présence du substrat à dégrader et de composés organiques (acides aminés, facteur de croissance, vitamines). Pour visualiser la bioassimilation du substrat à tester, les composés organiques doivent présenter la même valeur isotopique que la biomasseensemencée.

II. Examens microscopiques

La microscopie permet de visualiser l'interaction entre les matériaux et la flore fongique. Elle permet également de voir la qualité de la croissance fongique (abondance, longueur et diamètre des filaments mycéliens) ainsi que leur localisation au niveau des différentes structures constitutives des agromatériaux.

A. Sur les agromatériaux à base de fibres végétales

1. Introduction

Les feutres végétaux sont synthétisés à partir de matières végétales. Deux types de plantes ont été utilisés pour la formulation de ces feutres : le lin textile, une plante ligneuse riche en fibres (industrie du textile) et la betterave sucrière, une plante racine pourvue de nombreuses vésicules de réserves (rôle d'une racine) et plus particulièrement dotée d'une forte concentration en saccharose. Les feutres sont réalisés à partir de co-produits végétaux, ce qui signifie que les structures d'intérêt économique primaire (fibres longues pour le lin et saccharose pour la betterave) ont été utilisées. Pour le lin, il reste donc le cortex (parenchyme, collenchyme, sclerenchyme) et les cellules des vaisseaux secondaires (xylème, phloème) (figure 59). Au stade du teillage, le lin est arrivé à maturité, ces différentes cellules ne possèdent plus d'activité métabolique, elles ont perdu leur contenu cytoplasmique et leur rôle se limite à celui d'un maintien.

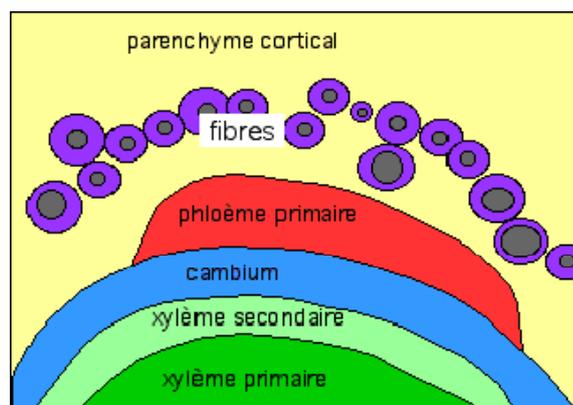


Figure 59 : Descriptif d'une coupe transversale d'une tige de lin

La betterave étant une racine, elle ne possède pas de tissus de soutien (collenchyme, sclérenchyme), après extraction du saccharose par diffusion, il reste toutes les cellules du parenchyme et des tissus conducteurs (xylème, phloème). Une étude de digestibilité des

pulpes surpressées a été réalisée (Comité national des coproduits, 2001), elle indique une teneur de 52% de parois végétales, 3 à 5% d'oses résiduels, 1% de matières grasses et 9% des matières minérales (valeurs en % de matière sèche). Les 35% restants sont représentés par les autres molécules présentes dans une cellule eucaryote à savoir les protéines, les acides nucléiques ou des molécules appartenant aux métabolites secondaires.

Ainsi, nous avons un bref aperçu de l'environnement au sein duquel la flore fongique doit se développer :

- Les cellules du xylème composées de **trachéides**, d'**éléments du vaisseau** (éléments annelés ou spiralés dont la partie lignifiée est réduite à des anneaux ou à une spirale ; trachéides à ponctuation scalariforme ou aréolées ; vaisseaux rayés, réticulés ou ponctués), de **fibres** lignifiées dont les parois secondaires sont souvent très épaisses, en général tristratifiées.
- Les cellules du phloème constituées de **tubes criblés**, de **parenchyme phloémien** (accumulation de réserves) et de **fibres phloémiennes**.
- Les cellules collenchymateuses dont les parois polysaccharidiques sont formées de nombreux feuillets concentriques de fibrilles cellulosiques, alternativement parallèles et perpendiculaires à l'axe cellulaire.
- Les cellules sclérenchymateuses. Lorsque la cellule a cessé de croître, elle ajoute à sa paroi primaire une paroi secondaire constituée de fibrilles de cellulose très serrées. L'ensemble se sclérifie c'est-à-dire qu'il s'imprègne, d'abord au niveau de la lamelle moyenne puis totalement, de lignines.
- Les cellules parenchymateuses dont les parois sont minces et traversées par de nombreux plasmodesmes.

Au cours de l'incubation des feutres avec les champignons telluriques, toutes ces structures vont se dégrader progressivement en fonction du caractère assimilable des composants de ces cellules et des capacités catalytiques de la souche.

2. La colonisation

Le comportement du champignon reflète son stade de développement et la disponibilité des nutriments. Un mycélium abondant localement et en surface indique la présence de nutriments facilement assimilables. La figure 60 a et b montrent la croissance mycélienne de *Phanerochaete chrysosporium* au cours du premier mois d'incubation, indépendamment de la nature des fibres (L ou LB).

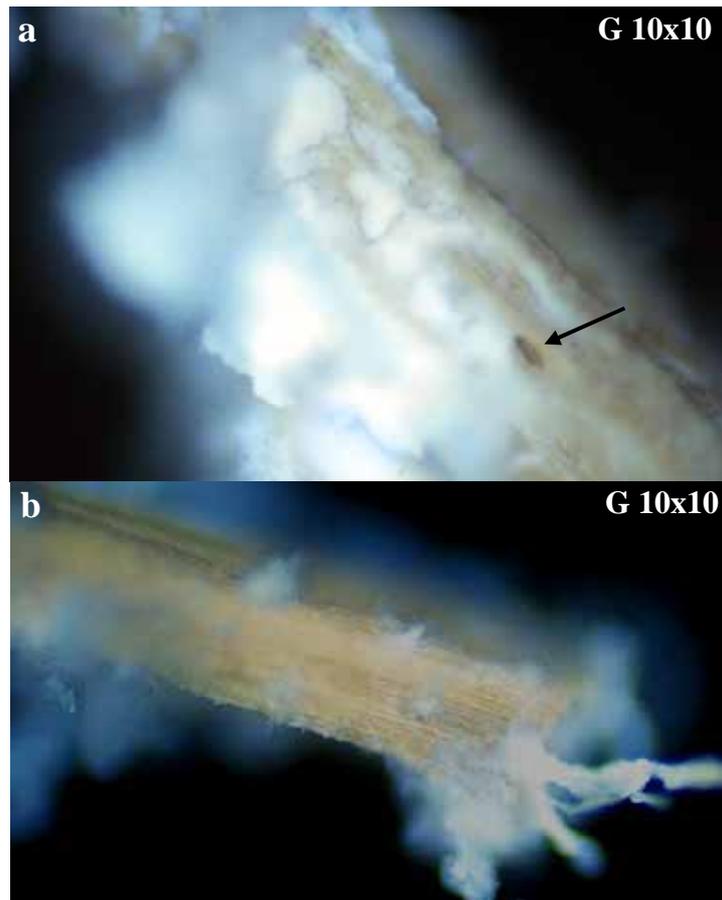


Figure 60 : La colonisation de fibres végétales par *P. chrysosporium* (a : L ; b : LB)

Ces micrographies ont été réalisées à partir d'un microscope optique à l'aide de la technique d'épifluorescence et d'un filtre bleu. La fibre végétale apparaît en brun et le champignon en blanc bleuté. Sur la micrographie a, un pore est nettement visible. Ce fragment dans le champ du microscope peut être un élément du vaisseau xylémien ou une cellule criblée. En effet, la communication entre deux fragments successifs d'éléments du vaisseau s'effectue par une perforation. Les tubes criblés ont des parois longitudinales et transversales possédant des pores appelés cribles, permettant la communication intercellulaire.

A ce stade d'incubation, il est envahi par le mycélium sans aucune dégradation décelable à ce grossissement. Sur la micrographie b, des microfibrilles longitudinales parallèles et accolées les unes aux autres se distinguent. Ce sont probablement des fibres, au sens cytologique du terme. Elles n'ont pas subi d'altérations microscopiques.

Une structure mycélienne abondante en surface révèle la présence de nutriments facilement disponibles. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce comportement :

- Ajout de 5mL de milieu nutritif pour faciliter le démarrage de la croissance
- Présence de molécules facilement assimilables intrinsèques aux matériaux (oligosaccharides par exemple) ou apparues lors de leur confection (clivage mécanique, hydrolyse, diffusion).

La colonisation mycélienne est surtout présente aux extrémités du fragment dans le champ microscopique. Le mycélium aurait tendance à croître vers l'intérieur des cellules plutôt qu'en surface. En effet, les cellules végétales sont constituées d'une membrane phospholipidique comme toute cellule eucaryote, d'une paroi multicouche et d'un cytoplasme dégénéré (figure 61).

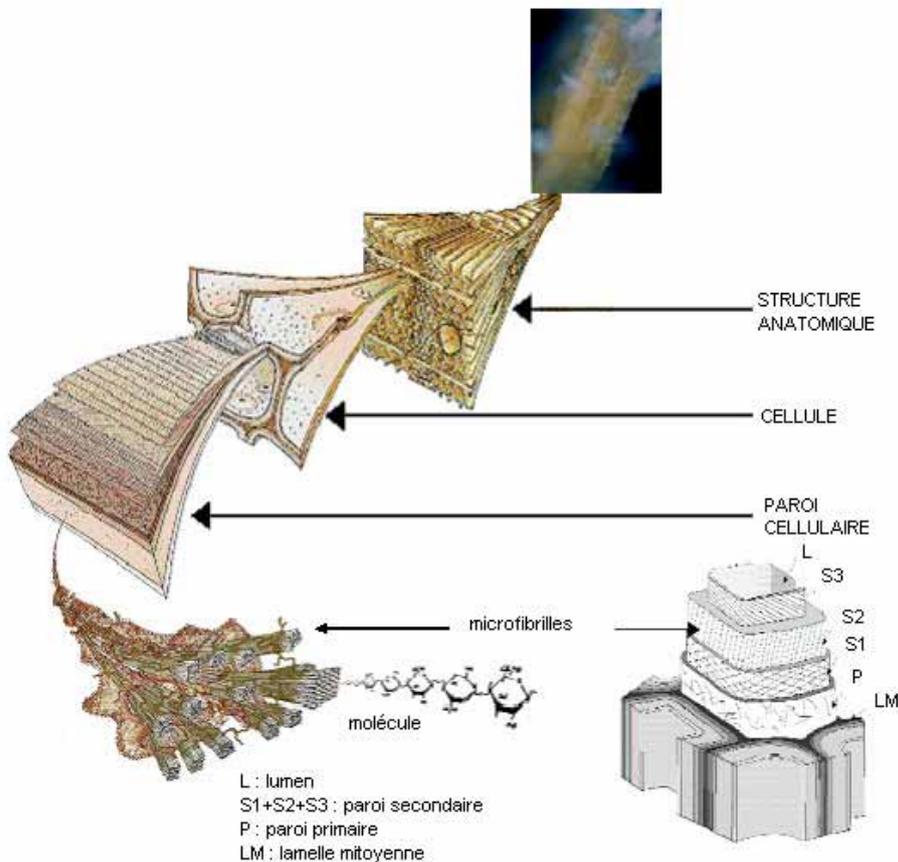


Figure 61 : Schéma d'une fibre végétale

3. La dissolution du ciment pectique

Les cellules végétales sont accolées les unes aux autres soudées par un ciment pectique (lamelle mitoyenne sur la figure 61). Les pectines sont des polymères osidiques, principalement des rhamnogalacturonanes (polymères d'acides galacturoniques et de rhamnose), ramifiés par des galactanes (polymères de galactose) et des arabanes (polymères

d'arabinose). Ce sont les polymères pariétaux les plus facilement hydrolysables par les enzymes fongiques. En effet, rapidement (entre 1 et 2 mois d'incubation), la dissolution du ciment pectique provoque une séparation des tissus végétaux (figure 62).

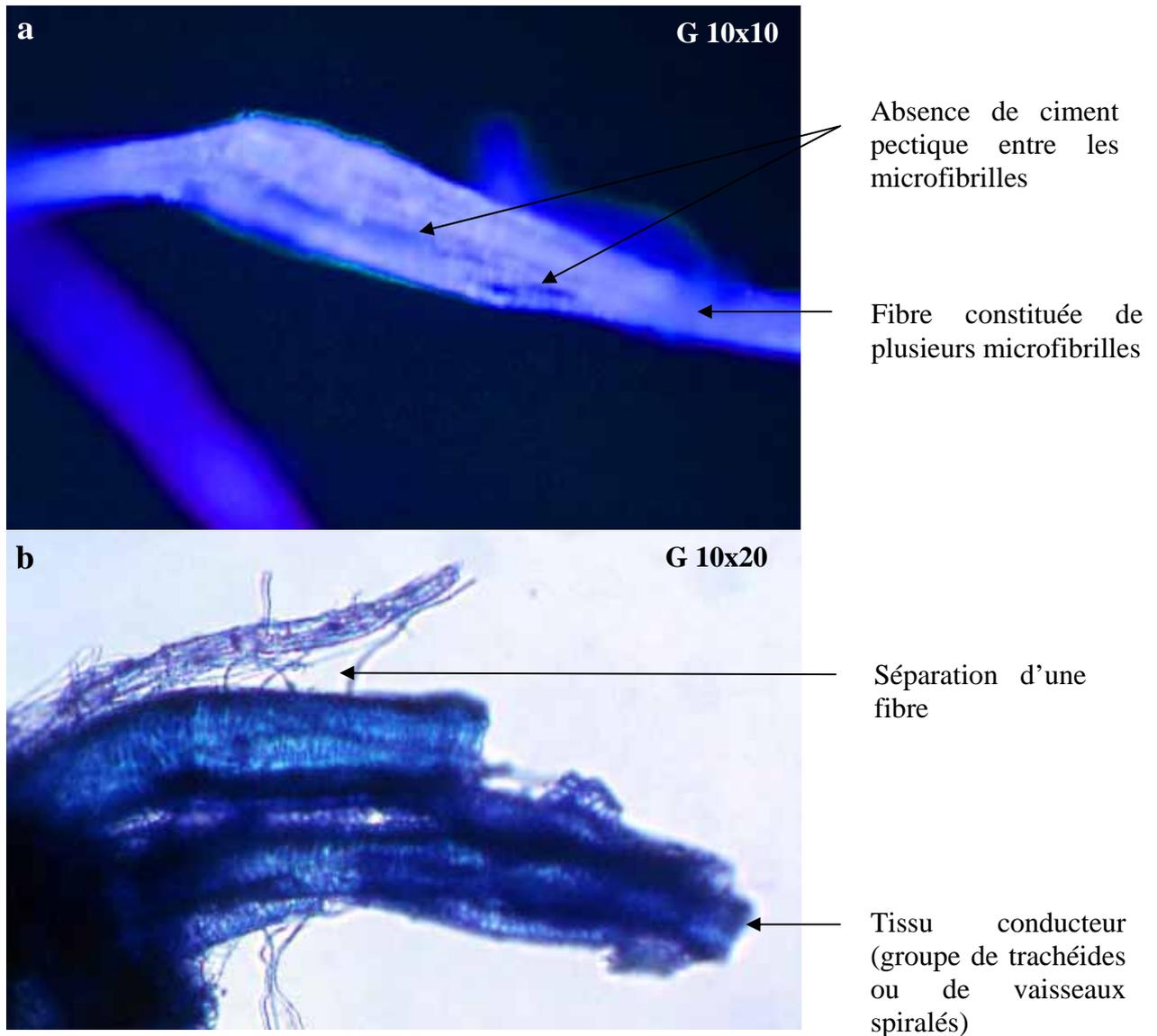


Figure 62 : La séparation des tissus végétaux (a : *P. chrysosporium* ; b : *T. viride*)

4. La dégradation des tissus végétaux

La lamelle moyenne éliminée, les micro-organismes sont faces à la paroi primaire fine (les tissus végétaux sont arrivés à maturité, ils ont un rôle de maintien) du côté externe et à la paroi secondaire épaisse du côté lumen. Des polymères d'intérêt nutritif (celluloses et hémicelluloses) sont présents mais enchevêtrés dans une matrice de lignines (sclérisation pour rigidifier la tige) (figure 63). La plupart des micro-organismes sont incapables de dégrader les lignines, polymères complexes de nature phénolique. Seul le groupe des champignons dits de pourriture blanche y parvient. Ils appartiennent aux décomposeurs du bois.

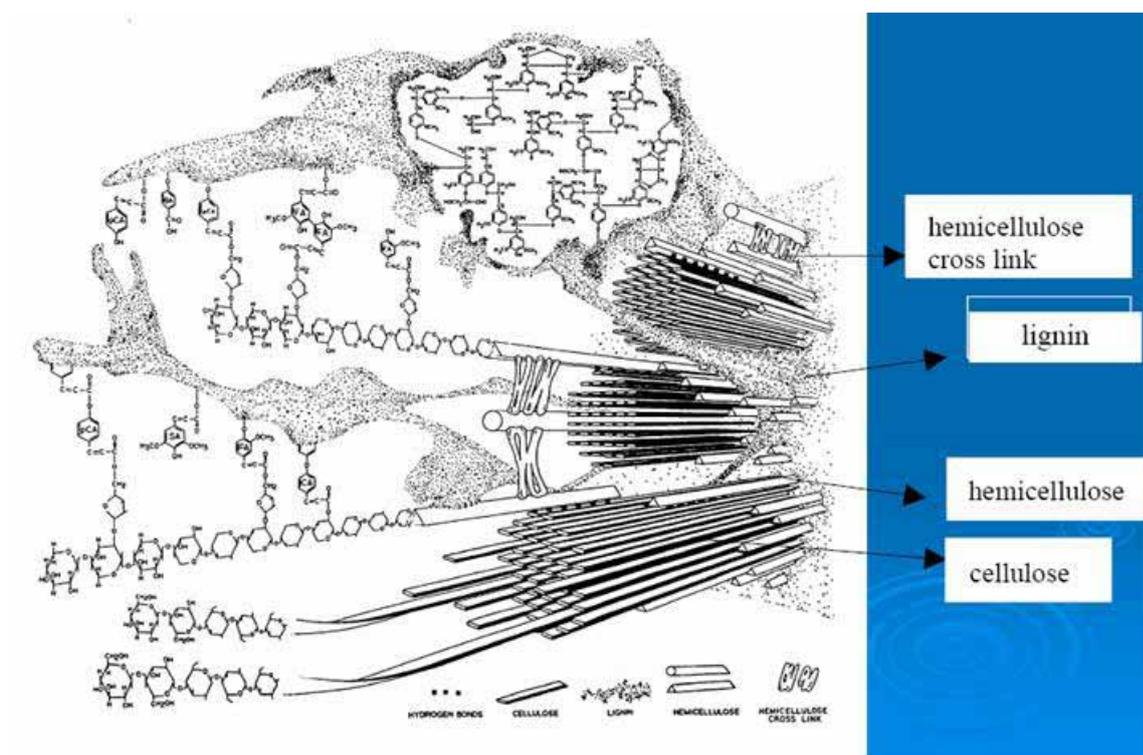


Figure 63 : Les polymères pariétaux végétaux

Parmi les trois principaux polymères pariétaux, la lignine est la plus récalcitrante à la dégradation. La difficulté vient de plusieurs niveaux : la nature hydrophobe des noyaux aromatiques qui la rend insoluble, l'énorme masse moléculaire qui empêche l'accès aux enzymes et la complexité de la structure tant au niveau des monomères que des liaisons intramoléculaires. Les lignines sont composées de monolignols (alcool coniférylique, alcool synapilique et alcool *p*-coumarylique). Les enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine sont des oxydases dont les principales sont la lignine peroxydase (LiP), la manganèse peroxydase (MnP) et la laccase, induites par la présence de composés phénoliques.

- Lignine peroxydase : elle est plus connue sous le nom de ligninase. Le processus catalytique n'est pas bien élucidé. Elle est activée en présence de H_2O_2 et forme des radicaux libres qui vont attaquer les monomères, dimères ou trimères de monolignols ainsi que des composés aromatiques polycycliques. Un métabolite secondaire fongique, l'alcool veratrylique, serait également impliqué dans l'activation de l'enzyme. Le champignon produit lui-même le peroxyde d'hydrogène de façon extracellulaire en utilisant un complexe catalytique d'oxydoréduction (aryl-alcool oxydase, aryl-alcool deshydrogénase) sur un alcool benzylique ou la glyoxal oxydase sur des hydroxycarbonyles ou des α -dicarbonyles.
- Manganese peroxydase : comme son nom l'indique, elle utilise le manganese II comme donneur d'électrons qui se retrouve sous la forme Mn^{3+} . Ce dernier est chélaté

par des acides organiques synthétisé par le champignon. Le complexe acide organique/Mn³⁺ diffuse librement dans la matrice ligneuse pour l'oxyder et détruire son agencement.

- Laccase : son rôle n'est pas bien compris. Elle présente une forte affinité pour les composés phénoliques méthylés ou méthoxylés.

Le réseau macromoléculaire ligneux fragmenté, les champignons atteignent les hémicelluloses entourant les microfibrilles de cellulose. Les hémicelluloses de la paroi secondaire sont constitués principalement de xylanes (polymères de xylose) linéaires ou faiblement ramifiés. Les branchements latéraux sont composés d'arabinose et/ou de glycuronates méthylés. Un autre groupe d'hémicellulose peut se présenter, les **glucomannanes**, polymères de glucose et de mannose.

Les hémicelluloses sont dégradées en monomères osidiques et acide acétique par des enzymes spécifiques, appelées hémicellulases (Howard *et al.*, 2003) : xylanases, xylosidases, xylane esterases, arabinofuranosidases, glucuronosidases, glucosidases. (Leonowicz *et al.*, 1999). L'hydrolyse enzymatique des hémicelluloses est sans difficulté majeure pour les champignons décomposeurs du bois.

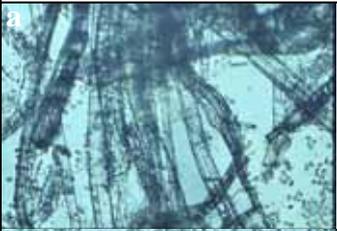
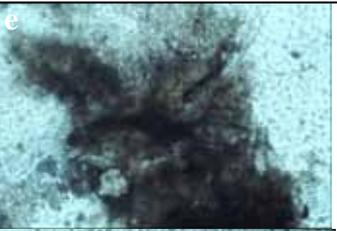
La cellulose, le dernier polymère est un nutriment de choix pour les micro-organismes car elle est constituée de glucose. Contrairement aux autres polymères osidiques, les chaînes de glucoses sont associées les unes aux autres par des liaisons hydrogène en groupes de microfibrilles formant un réseau visible au microscope. Ces liaisons faibles, mais répétées un grand nombre de fois, assurent une grande cohésion, conduisant dans certaines régions à un **arrangement cristallin**. Ce dernier est responsable de la biréfringence de la cellulose en lumière polarisée et de sa propriété de diffracter les rayons X et les électrons.

La structure fibrillaire très condensée justifie la résistance aux attaques chimiques et enzymatiques. Le système cellulase (glucanases, glucosidases) le plus étudié est celui des champignons mésophiles (*Trichoderma reesei*, *Phanerochaete chrysosporium*) (Kirk and Cullen, 1998). Les filaments des champignons grandissent dans la lumière des cellules, se fixent sur la couche S3 de la paroi grâce à une structure gélatineuse, formée de polysaccharides (Xu and Goodell, 2001). La couche S2 est complètement dégradée et la couche S3 est intacte (Grenn III and Highley, 1997). La dégradation des polymères ne se produit pas à proximité des hyphes, et surtout pas sur la couche S3, support de la prolifération

mycélienne. Il y a diffusion des agents catalytiques. Or, il a été démontré depuis plus de 35 ans, que les enzymes sont des macromolécules incapables de diffuser dans les polymères pariétaux (Cowling and Brown, 1969). Un système radicalaire a été identifié chez les champignons de la pourriture brune, les décomposeurs cellulolytiques (Hammel *et al.*, 2002, Enoki *et al.*, 1997, Green III and Highley, 1997, Kremer, 1993, Enoki *et al.* 1992, Highley, 1977). Certains champignons de pourriture blanche attaquent simultanément les trois polymères pariétaux alors que d'autres attaquent les lignines et hémicelluloses dans un premier temps puis la cellulose (Faraji, 2005).

Après 4 mois d'incubation, les observations microscopiques ont révélé les stades de dégradation présentés dans le tableau 33 en fonction de la souche et de la nature des feutres végétaux.

Tableau 33 : Le stade de dégradation des fibres végétales

Feutre L		Feutre LB	
Pc	Tv	Pc	Tv
			
			

Les fibres linièresensemencées par *Phanerochaete chrysosporium* sont bien séparées (micrographie a) alors que cellesensemencées par *Trichoderma viride* se trouvent encore sous le forme de microfibrilles (micrographie c) ou relativement proches (micrographie d). En revanche, pour le feutre LBensemencé par *T. viride*, les fibres sont sectionnées de façon transversale et non longitudinale (micrographie g). Ceci signifie que *T. viride* pourrait être une souche qui dégrade les trois polymères pariétaux simultanément. Sur la micrographie h, deux fragments de fibres se distinguent. L'une d'elle est fragmentée et l'autre est intacte. Ce qui confirme que *T. viride* agit totalement localement et non couche par couche. Les micrographies e et f sont difficilement interprétables au niveau de la dégradation végétale car le champ du microscope est envahi de structures ovoïdes. Sur la micrographie f, des fibres assez longues se discernent par transparence. Ces mêmes structures sphériques sont présentes

sur le feutre L. Les termes de structures ovoïdes ou sphériques ont été utilisés car elles peuvent représenter deux types de constructions fongiques :

- ce sont des spores disséminées qui vont germer en présence de substrat. Aucun début de mycélium n'est visible même à proximité de la matière végétale.
- *P. chrysosporium* est dimorphique. Il s'est transformé sous forme levure. Le dimorphisme est une particularité de certains champignons. Ils peuvent opérer en fonction de leur environnement une transition morphogénétique de la forme mycélienne à la forme levure et inversement. Certains facteurs déclenchent la transition morphogénétique comme la carence nutritionnelle, un changement de pH, une augmentation de la température ou une augmentation de la pression en CO₂. Chacun de ces facteurs peut être à l'origine de la transformation de *P. chrysosporium* à la forme levure. Elle prédit des conditions plutôt défavorables pour la croissance du champignon. Or, ces conditions ne doivent pas lui être si défavorable car il est en présence d'un substrat qu'il est capable de dégrader. C'est son rôle dans la nature au sein des processus d'humification. Aurait-il adapté sa physiologie et donc sa morphologie pour s'adapter à une effervescence de molécules ? La présence de substrats induit la synthèse d'enzymes cellulolignolytiques. Celles-ci vont cliver les différents polymères en oligomères ou monomères assimilables. La quantité est telle qu'il faut les assimiler rapidement. La forme levure assimile et se reproduit beaucoup plus vite que la croissance d'un hyphe. En effet, l'hyphe est constitué de compartiments qui communiquent entre eux. Les nutriments sont transportés à travers les différents segments vers la région apicale (figure 64).

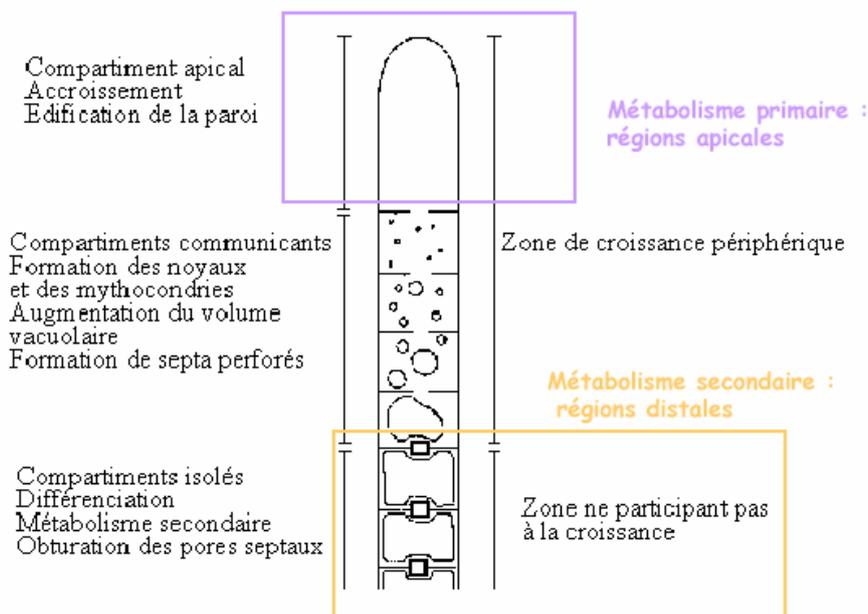


Figure 64 : La croissance apicale d'un hyphe

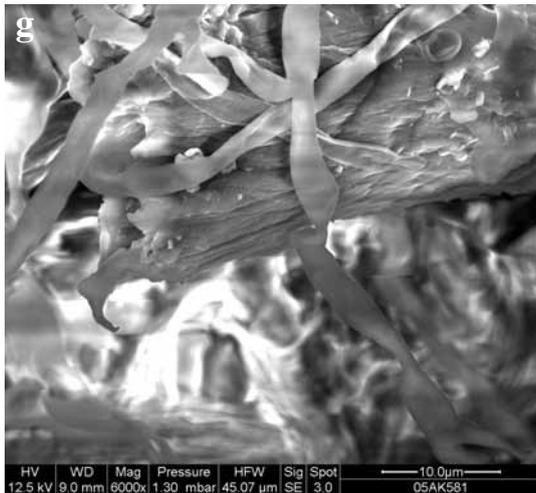
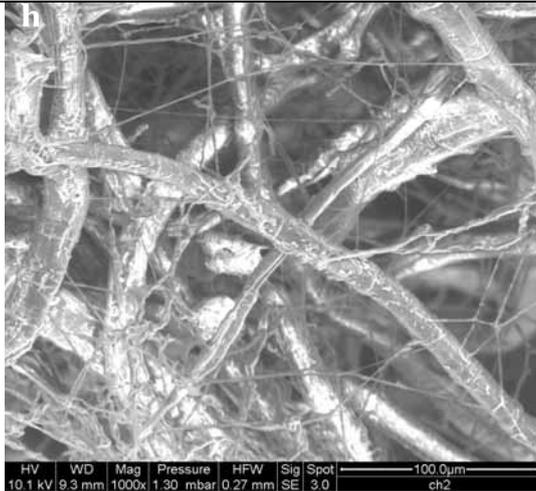
Une observation en microscopie électronique en chambre environnementale a été réalisée vers 5 mois d'incubation (tableau 34).

Tableau 34 : Observations de la dégradation de la matière végétale par ESEM

	Feutre L	Feutre LB
Non ensemencés		
<p>Les fibres au sein du matériau possèdent une disposition non ordonnée. Elles présentent la même apparence dans les deux types de matériaux. Elles n'ont pas une surface lisse.</p>		
Pc		

La présence de micro-organismes sur les deux types de feutres est conséquente. Cette prolifération révèle un substrat assimilable par la souche. *P. chrysosporium* se présente sous forme mycélienne sur le feutre L et sous forme de levures sur le feutre LB. Les fragments végétaux présents dans le champ du microscope s'ouvrent sur la longueur (les deux fragments du centre et celui en bas à gauche sur la micrographie d). *P. chrysosporium* sous forme mycélienne dégraderait les structures végétales de façon longitudinale. Sur la micrographie e, est décelé un élément du vaisseau ponctué. Il est envahi par les levures.

Tv



Sur le feutre L, la présence de mycélium est moins dense qu'avec *P. chrysosporium*. En revanche, sur le feutre LB, le mycélium est conséquent. Les nutriments sont plus disponibles au sein du feutre LB, probablement en raison de la présence de betterave, moins lignifiée que le lin. *T. viride* éprouve plus de difficultés à la dégradation des fibres végétales par rapport à *P. chrysosporium*, malgré son appartenance au groupe des champignons lignivores. Sur la micrographie g, le réseau mycélien est nettement au premier plan à la fois sur les fibres mais également aérien. Les champignons possèdent une paroi polymérique constituée de chitine (polymère de N-acétylglucosamine), chitosane (polymère de glucosamine), de glucane (polymère de glucose) et de glycoprotéines. Celle-ci confère une rigidité aux filaments mycéliens qui peuvent se maintenir de façon aérienne. Aucune dégradation microscopique n'est visible à ce grossissement. Sur la micrographie h, une fibre est envahie par des filaments mycéliens. A l'extrémité de la fibre (sur le côté gauche), l'hyphe pénètre dans la lumière de la fibre. Le champignon agit à la fois sur l'extérieur et l'intérieur de la fibre. La micrographie i représente un envahissement mycélien de fragments végétaux. Ils seront dégradés et bioassimilés progressivement. La micrographie j montre un élément du vaisseau ponctué. Il est encore reconnaissable donc il n'a pas été dégradé (élément riche en lignine).

Deux micrographies méritent un intérêt particulier car elles représentent des structures mycéliennes particulières. La première montre l'extrémité de l'hyphe, un *apex* (figure 65).

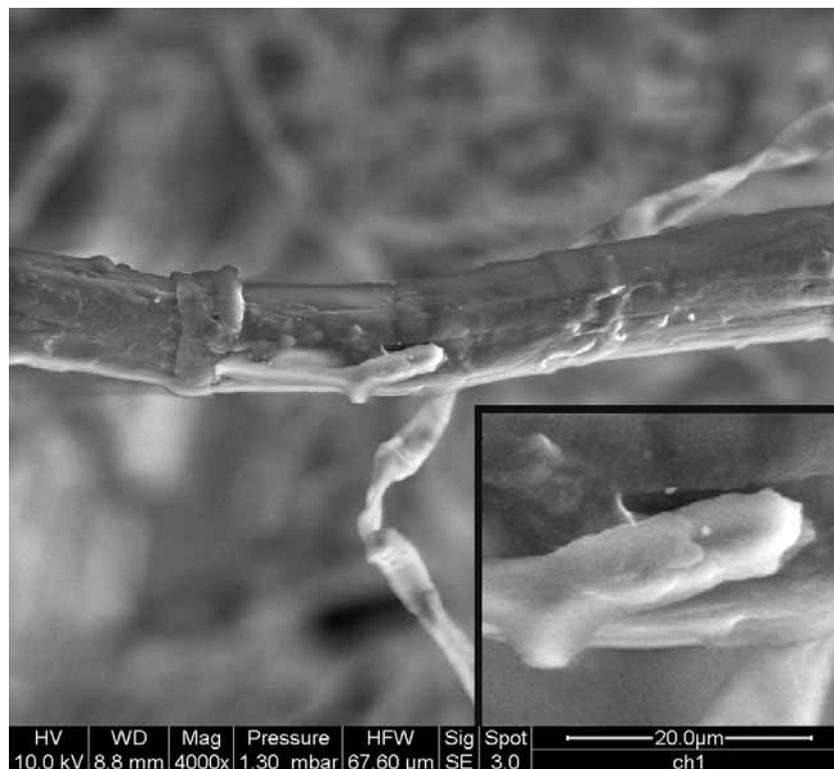


Figure 65 : Pénétration d'un hyphe par l'*apex*

L'extrémité du filament tente une pénétration vers l'intérieur de la fibre, soit par une ponctuation mais aucun autre pore de communication n'est visible, soit par une dissolution locale de la paroi végétale. Il s'agit d'un hyphes de *T. viride* sur le matériau en lin.

La seconde micrographie concerne également *T. viride* sur le feutre en lin. Elle montre un *appressorium* (figure 66).

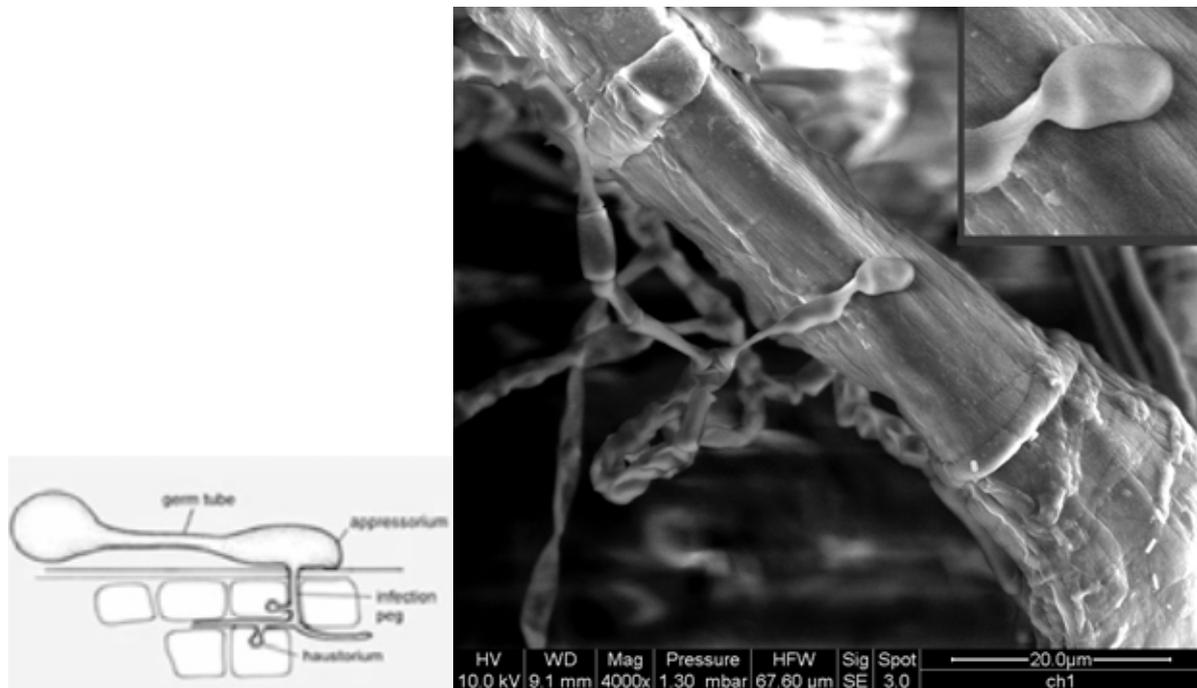
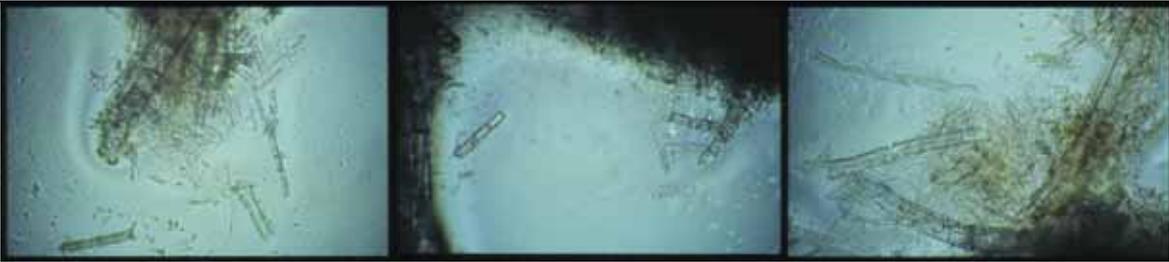
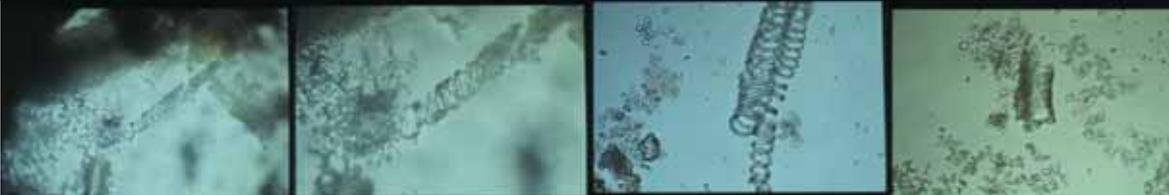
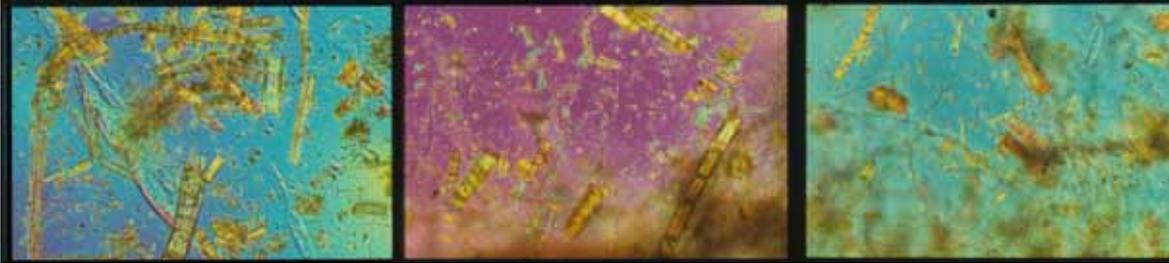


Figure 66 : *Appressorium* (schématisé sur la gauche, de *T. viride* sur le feutre L à droite)

Un *appressorium* est un renflement de l'*apex* qui exerce une pression sur la fibre végétale d'une part pour une meilleure adhérence à la fibre et d'autre part pour pénétrer à l'intérieur de la fibre. Ce comportement est adopté par les phytopathogènes sur une fibre vivante car le centre de la fibre contient des résidus de cytoplasme facilement disponibles et assimilables.

Après quelques mois d'incubation pour laisser les micro-organismes effectuer leur dégradation, une nouvelle série de micrographies a été réalisée au microscope photonique (tableau 35). En effet, le processus d'humification dans le milieu naturel prend du temps et nécessite la contribution de différents règnes, familles et espèces (bactéries, mycètes, algues, protozoaires, nématodes, collemboles, arthropodes, etc.). En monoculture, la décomposition de la matière végétale est plus lente.

Tableau 35 : Le stade de dégradation de la matière végétale après 8 mois d'incubation

<p>Pc sur L</p>	
<p>Il reste encore des fragments végétaux assez longs. La dégradation se poursuit</p>	
<p>Pc sur LB</p>	 <p>Un élément spiralé (trachéide, éléments spiralé du xylème) a été attaqué. La matière qui unissait les spirales a été dissoute. Cette cellule est en cours de dés spiralisation. La dégradation est longitudinale. Sur la micrographie de droite, un fragment de trachéide se distingue. Contrairement aux micrographies précédentes, la trachéide est segmentée, ce qui exprime une dégradation radiale locale. Les deux formes de dégradation sont présentes chez <i>P. chrysosporium</i>. La souche est toujours sous sa forme levure.</p>
<p>Tv sur L</p>	 <p>Ces micrographies montrent des fibres longues mais isolées ainsi des fragments segmentés de façon radiale. De nombreux débris végétaux sont également présents. Sur la micrographie de droite, le mycélium se devine.</p>
<p>Tv sur LB</p>	 <p>Les fibres sont encore longues, les fragments sont absents, les débris végétaux rares. La dégradation végétale est au stade le moins avancé par rapport à la nature des feutres et à la souche fongique. Cette observation est cohérente quant à la capacité catalytique de la souche fongique mais présente une interrogation au niveau de la nature végétale. La présence de betterave, donc des cellules de racines moins lignifiées, aurait dû apporter des nutriments plus facilement assimilables et activer la dégradation de l'ensemble du feutre.</p>

Les micrographies suivantes présentent un intérêt :

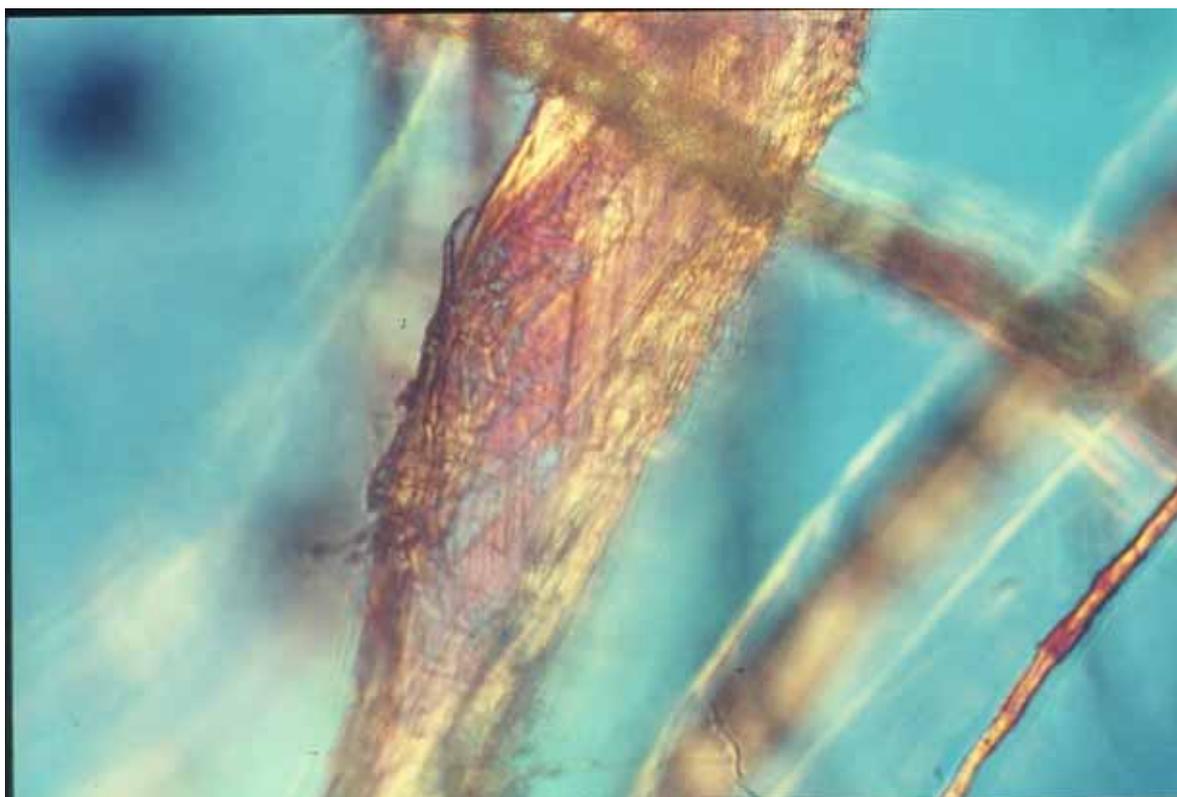
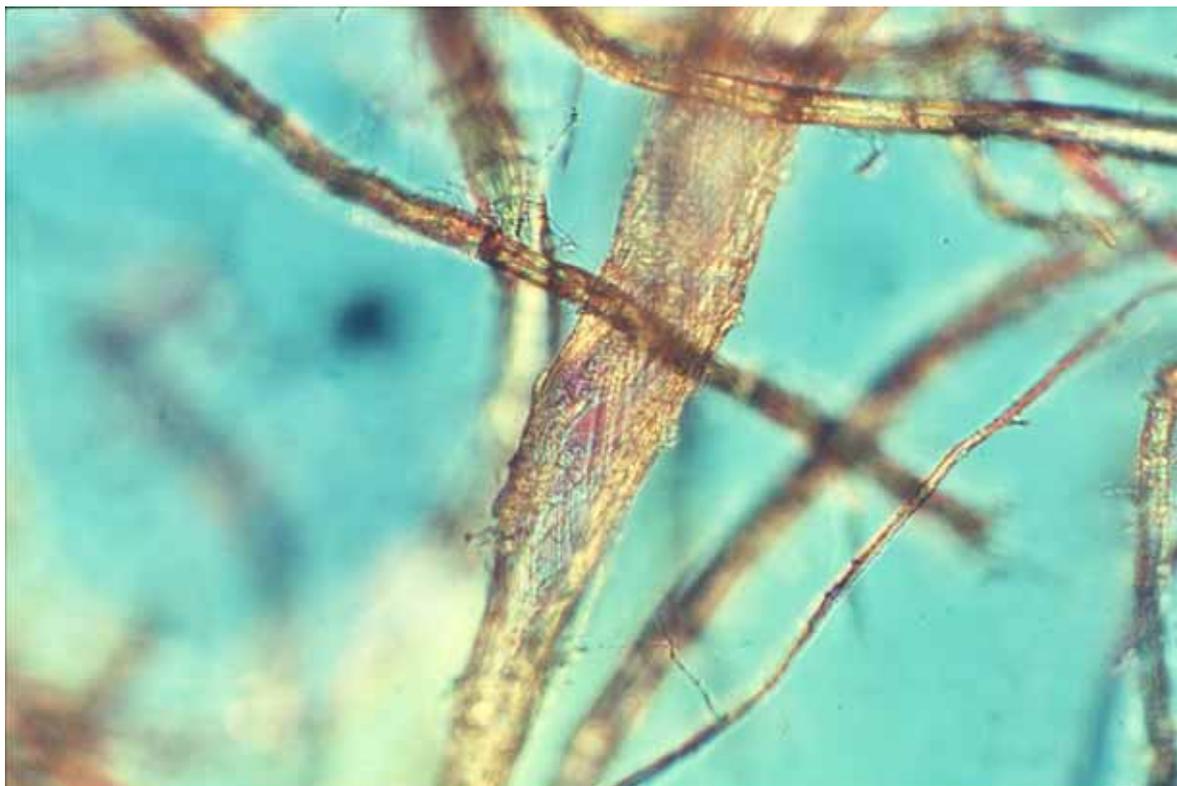


Figure 67 : L'architecture tissée de la paroi végétale secondaire

Elles montrent la structure tissée de la paroi végétale. En effet, les microfibrilles de cellulose au sein de la paroi secondaire sont orientées différemment. Cette orientation

identifie les différentes sous-couches S1, S2 et S3. Les sous-couches S1 et S3 sont inclinées de 50 à 90° par rapport à l'axe de la cellule, la sous-couche S2, généralement la plus épaisse, de 5 à 40° (Donaldson et Xu, 2005, Merakeb, 2006). La superposition de ces différentes sous-couches conduit à une architecture tissulaire (figure 67).

5. Discussion

Est-ce que les fibres végétales ont été dégradées ?

Après 8 mois d'incubation, les fibres végétales ne sont pas totalement dégradées. Le processus d'humification, dans le milieu naturel, est un phénomène lent auquel il faut ajouter la contribution d'un grand nombre de paramètres environnementaux, à la fois au sens climatique du terme mais également le milieu. En effet, la dégradation de la matière organique est réalisée par un ensemble d'intervenants au sein d'un écosystème, avec toutes les interactions qu'il contient. Nous n'avons pas souhaité reproduire ce processus, ni remettre en question la dégradation de la matière végétale par les champignons de la pourriture blanche, **nous avons choisi d'observer le comportement d'une flore adaptée pour ce type de substrat en monoculture pour apporter une vision complémentaire à l'analyse isotopique lors de la réalisation et de la mise au point d'un test de bioassimilation.** Cette analyse microscopique a permis de voir comment une souche agissait sur un matériau potentiellement biodégradable mais possédant des polymères complexes récalcitrants à la biodégradation (lignine, cellulose).

L'origine structurale des fibres a-t-elle une importance ?

Les deux souches choisies parmi les champignons lignolytiques n'ont pas montré de différences majeures concernant une biodégradation préférentielle d'un feutre par rapport à l'autre. La betterave sucrière étant une plante-racine, elle ne nécessite pas une structure fortement rigidifiée pour se maintenir.

Les deux souches ont-elles adopté un comportement similaire ?

Les deux souches appartiennent au groupe des champignons de la pourriture blanche donc sont dotés de capacités lignolytiques similaires. Pourtant, *Phanerochaete chrysosporium* se montre plus efficace que *Trichoderma viride*. *P. chrysosporium* est un basidiomycète alors que *T. viride* est un ascomycète. Une différence génétique réside dans le mode de dissémination des spores. Le basidiomycète produit ses basidiospores à l'extrémité d'une baside (figure 68) alors que l'ascomycète confine ses ascospores dans un asque (figure 69).



Figure 68 : une baside

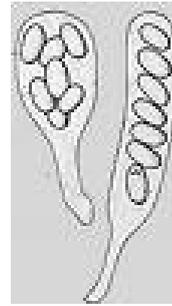


Figure 69 : un asque

La libération des basidiospores semble plus facile que celle des ascospores car extracellulaire en raison de leur disposition à l'extérieur de la baside. Une seconde différence existe au niveau du potentiel catalytique. *P. chrysosporium* utilise un double système de dégradation, les enzymes et les radicaux libres. Ces derniers sont connus pour agir de façon non spécifique, ils coupent les liaisons chimiques de façon aléatoire. D'une part, ces clivages fragmentent les polymères donc participent à la biodégradation de la matière organique, et d'autre part, facilitent l'accessibilité de certaines structures au site actif des enzymes spécifiques (diminution de la complexité du réseau macromoléculaire, création et multiplication d'extrémités de fragments de polymères).

Quelles informations complémentaires nous fournit l'analyse microscopique ?

Au niveau du test de bioassimilation, l'analyse microscopique utilisée sous cette forme apporte assez peu d'informations pertinentes sur le fond. Les observations montrent une dégradation des fibres par fragmentation sans aucune preuve de l'utilisation de ces fragments comme substrats nutritifs. Cet outil ne peut pas être utilisé, seul, pour démontrer la bioassimilation d'un matériau.

Au niveau de la composition du feutre, aucun liant ou additif non végétal n'a été ajouté puisque les micrographies ne montrent que des structures végétales. Les feutres étant 100% végétal, sa bioassimilation s'intègre dans le cycle de la matière organique, elle n'est donc pas à remettre en question.

Au niveau du comportement des champignons, ils agissent à la fois par l'extérieur (paroi primaire) et l'intérieur des fibres (couche S3 de la paroi secondaire). Dans la littérature, il est indiqué que leurs actions se passent au niveau du lumen (partie intérieure), les filaments grandissent dans la lumière des cellules en se fixant sur la couche S3 de la paroi (Xu and Goodell, 2001). La couche S2 est complètement dégradée et la couche S3 est intacte (Green

III and Highley, 1997). Pour voir les différentes sous-couches pariétales, la microscopie électronique à transmission est nécessaire. Au microscope photonique, nous avons pu discerner l'architecture tissulaire de la paroi secondaire grâce à l'orientation des microfibrilles de cellulose sans toutefois pouvoir distinguer si une sous-couche était davantage attaquée. Nous avons également observé que les micro-organismes fongiques pénètrent dans la fibre par une extrémité, par une ponctuation ou par pression sur la fibre.

Au niveau de chaque espèce, *P. chrysosporium* adopte une dégradation plutôt longitudinale, polymère par polymère alors que *T. viride* agit de façon radiale, il coupe les trois polymères pariétaux localement et simultanément. Les champignons de la pourriture blanche sont divisés en deux groupes (Faraji, 2005) : les "*simultaneous white-rot*", qui dégradent simultanément les polymères structuraux (cellulose, hémicelluloses et lignines) en proportion similaire et les "*preferential white-rot*" qui dégradent les lignines et les hémicelluloses avant d'attaquer la cellulose. *T. viride* appartiendrait au premier groupe tandis que *P. chrysosporium* ferait partie de la seconde catégorie. En se référant à leurs différences de système catalytique, cette observation semble contradictoire. En effet, *P. chrysosporium* doté d'un système de dégradation radicalaire devrait cliver les polymères de façon aléatoire, donc appartenir au second groupe. Le mécanisme de dégradation des polymères pariétaux n'est pas encore bien élucidé. En présence de lignines, une majorité des champignons de la pourriture blanche synthétisent une lignine peroxydase (LiP) ainsi qu'un métabolite secondaire, l'alcool veratrylique (3,4 dimethoxyphénol) (Lundquist and Kirk, 1978). En présence de H₂O₂, LiP transforme l'alcool veratrylique en cation radicalaire (Zapanta and Tien, 1997). Son rôle n'est pas clairement identifié. Il aurait un rôle de protection de l'enzyme face au peroxyde d'hydrogène (Dejong *et al.*, 1994, Valli *et al.*, 1990) et serait un médiateur d'oxydoréduction dans la dégradation des lignines (Khindaria *et al.*, 1996). Le mécanisme d'action des deux autres principales enzymes impliquées dans la dégradation des lignines est également étudié. Différentes hypothèses sont émises pour la manganese peroxydase (Otsuka *et al.*, 2003, Hofrichter, 2002, Kapich *et al.*, 1999, Zapanta and Tien, 1997) mais très peu d'informations sont données pour la laccase (Dwivedi, 2006). Des cellulases ont été identifiées chez les champignons de la pourriture brune et ceux de la pourriture blanche. Le système cellulolytique est étudié chez les micro-organismes de la première catégorie (Wang and Gao, 2003, Hammel *et al.*, 2002, Enoki *et al.*, 1997, Green III and Highley, 1997, Kremer, 1993, Enoki *et al.*, 1992, Highley, 1977).

Concernant le comportement de *P. chrysosporium*, nous avons vu que la dissémination de son système génétique se réalisait par des structures ovoïdes. Elles peuvent représenter des spores de germination mais devrait germer en présence de conditions favorables. La seconde possibilité est une transition morphologique d'une croissance mycélienne en croissance levuriforme. C'est un phénomène qui se rencontre chez les mycètes mais aucune information de cette nature n'est présente dans la littérature concernant *P. chrysosporium*.

6. Conclusion

L'analyse microscopique s'avère être un bon outil pour observer les interactions entre les micro-organismes et leurs substrats. Pour la pertinence du test de bioassimilation, elle nécessite quelques améliorations. L'utilisation du microscope photonique est acceptable avec coloration structurale en amont et un système d'analyse d'image en aval. Une coloration au bleu de toluidine permet de distinguer les pectines qui se colorent en rouge, les parois cellulaires non lignifiées en violet et les parois lignifiées ou les composés phénoliques en bleu-vert. Une immunolocalisation couplé à des fluorophores peut aussi être utilisée mais l'obtention des anticorps spécifiques ainsi que l'achat des fluorophores semble trop coûteux pour une observation de dégradation de structures végétales. Pour les équipes de recherche qui disposent d'un microscope à transmission, cette technique permet de voir la paroi végétale ainsi que les différentes sous-couches.

Concernant un aspect plus fondamental, il serait intéressant de poursuivre l'étude avec une incubation de ces feutres végétaux avec des champignons de la pourriture brune, ceux de la pourriture molle ainsi que des bactéries en monoculture pour observer le rôle de chacun et en association pour voir les différentes interactions. En parallèle des observations, une identification enzymatique permettrait de réaliser une cartographie du potentiel enzymatique de chaque souche testée, de le comparer aux données bibliographiques et de fournir des informations sur l'implication de cette souche ou de son groupe (WRF, BRF, SRF) dans la dégradation de la matière végétale. L'identification des composés synthétisés ou biotransformés pourrait apporter de nouvelles données pour l'identification des processus d'humification et des voies métaboliques empruntées.

B. Sur les films de paillage

Les observations microscopiques ont été réalisées sur les films de paillage farine/polyester et polyester seul. Elles ont été effectuées par la technique de balayage en chambre environnementale pour observer la surface des films et s'abstraire du coût de la

métallisation. Les observations en microscopie photonique ne sont pas exploitables, les films ne laissant pas traverser la lumière.

1. Observations sur les films non ensemencés

Les observations au microscope électronique à chambre environnementale révèlent les micrographies suivantes :

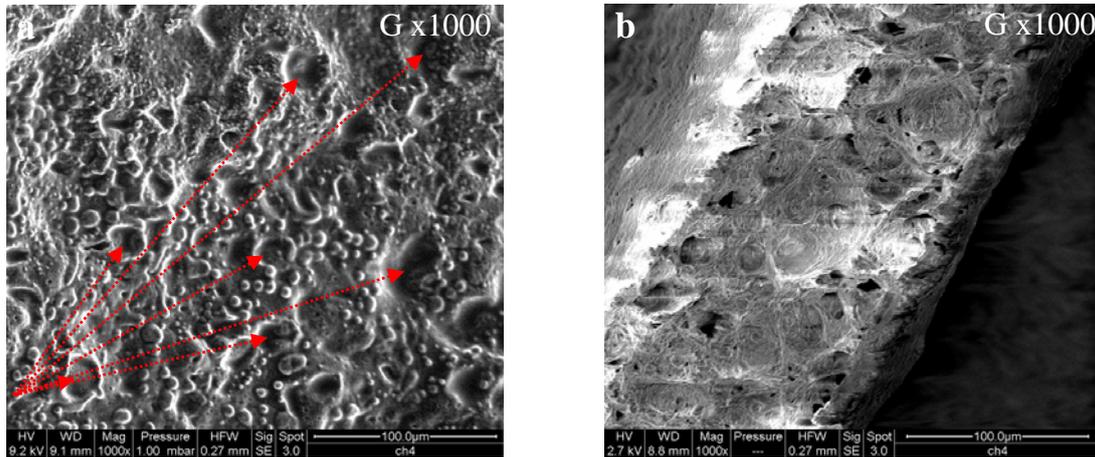


Figure 70 : Observations des films de paillage par ESEM (a : farine/polyester, b : polyester)

La structure microscopique du film farine/polyester est particulière. Les flèches rouges indiquent l'emplacement d'anciennes particules. Il est probable que ce soit la position des particules de substances thermosolubles qui ont été dissoutes par l'autoclavage des films. En effet, à la suite d'une coloration à l'iode, les observations à la loupe binoculaire montrent que les films qui n'ont pas subi de traitement à l'autoclave possèdent des particules colorées en bleu-violet. Les films autoclavés révèlent une coloration bleu-violette diffuse et uniforme à la surface du film. Les autres particules présentes sur la micrographie 70a n'ont pas été identifiées. La structure microscopique du film de polyester (figure 70 b) est plutôt alvéolaire.

2. Observations sur le film farine/polyester

La figure 71 est une micrographie ESEM du film de paillage farine/polyester ensemencé par *P. chrysosporium* après 4 mois d'incubation. Le film est observé sur la tranche afin d'observer la colonisation mycélienne.

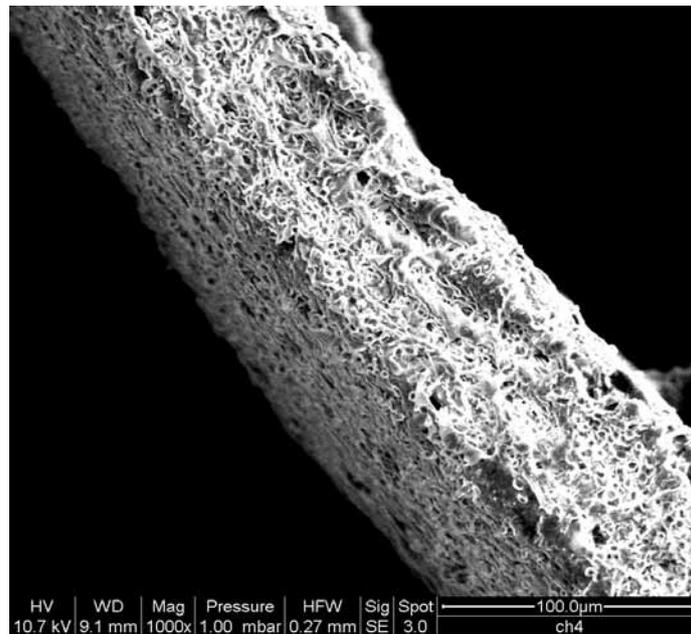


Figure 71 : Le film farine/polyester ensemencé par *P. chrysosporium*

Le film ensemencé montre une prolifération de type support, à la fois par l'apport de solution nutritive en début d'incubation et par l'extraction de substances thermosolubles lors de la stérilisation des films. Le film farine/polyester est colonisé sur les deux faces visibles sur la micrographie 73 et probablement sur les quatre faces. La prolifération mycélienne de surface et la non conductivité de notre échantillon ne permettent pas un plus fort grossissement. Pour savoir si le champignon a proliféré à l'intérieur du film, il faudrait réaliser des coupes dans l'épaisseur du film.

La figure 72 est une micrographie ESEM du film de paille farine/polyester ensemencé par *T. viride* après 4 mois d'incubation.

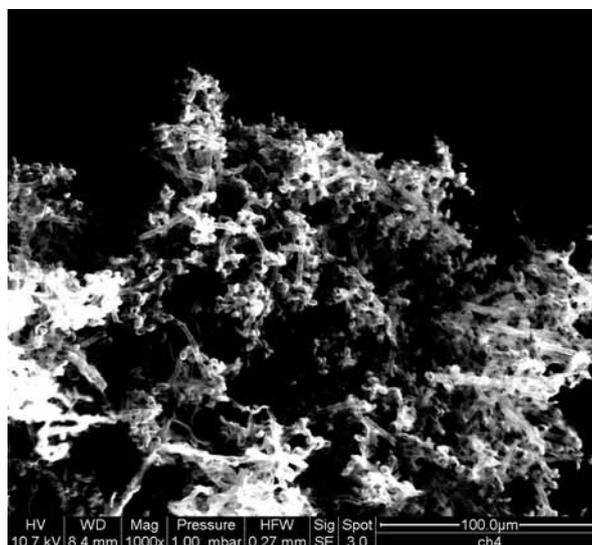


Figure 72 : Le film farine/polyester ensemencé par *T. viride*

La micrographie 72 montre des filaments mycéliens groupés sans colonisation de la surface. Le film n'est pas discernable. L'intensité du flux d'électrons ne peut pas être augmentée pour observer l'arrière plan car nous voyons qu'au premier plan les filaments mycéliens, matière non conductrice, sont saturés. La technique ESEM convient difficilement. Les échantillons doivent être métallisés pour améliorer les observations, mais génère un coût supplémentaire.

3. Observations sur le film polyester

La figure 73 est une micrographie ESEM du film de paillage polyester ensemencé par *P. chrysosporium* après 4 mois d'incubation

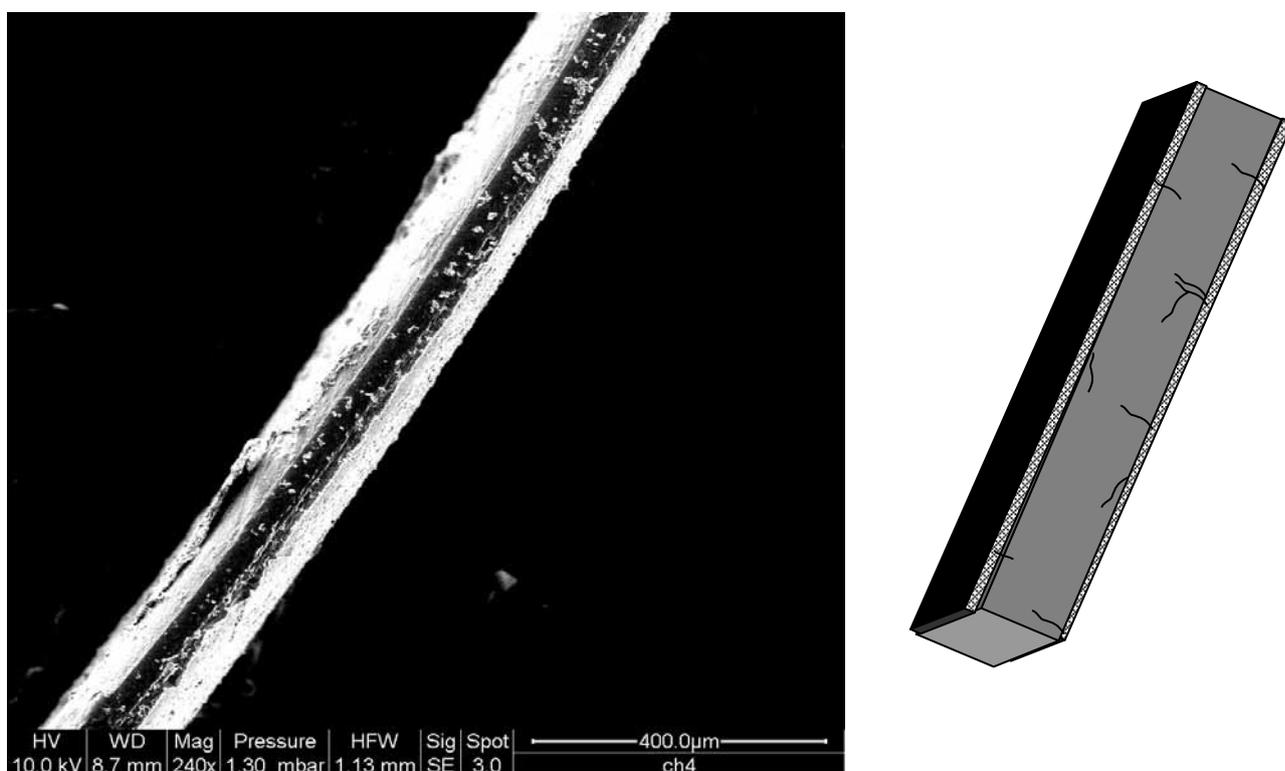


Figure 73 : Le film polyester ensemencé par *P. chrysosporium* (gauche : micrographie, droite : schéma)

La micrographie 75 montre le film de paillage sur la tranche. Différentes couches se distinguent par réponses différentes au flux d'électrons. Les deux couches de surface de chaque côté du film représentent la couche mycélienne (saturation). Des micro-organismes sont présents sur la tranche. Il est impossible de savoir s'ils ont simplement colonisé la surface ou s'ils pénètrent dans le cœur du film. Etant donné, le faible nombre de micro-organismes, la deuxième hypothèse est plus probable. De plus, en se référant au prélèvement pour l'analyse isotopique, la biomasse était macroscopiquement présente sur la tranche du film. Des coupes fines permettraient de savoir si le mycélium est présent dans le cœur du film.

La figure 74 est une micrographie ESEM du film de paillage polyester ensemencé par *T. viride* après 4 mois d'incubation

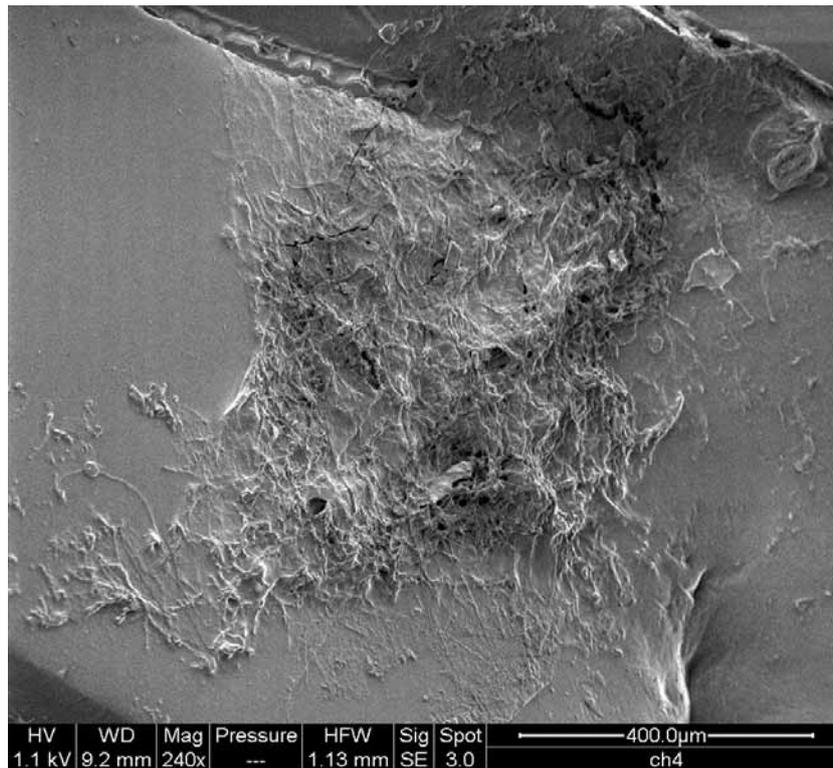


Figure 74 : Le film polyester ensemencé par *T.viride*

Le mycélium de *T. viride* reste localisé à l'inoculum d'ensemencement. Il n'a pas colonisé le film et ne s'est donc pas adapté à ce nouveau substrat de culture.

4. Conclusion

La colonisation de *P. chrysosporium* est plus abondante que celle de *T. viride*. Le basidiomycète s'est mieux adapté au film de paillage, probablement grâce à un meilleur système catalytique. Ces résultats sont en cohérence avec ceux de l'analyse isotopique qui montraient un changement isotopique entre la biomasse synthétisée et celle ensemencée. La faible prolifération de *T. viride* sur le film farine/polyester semble en inadéquation avec les résultats de l'analyse isotopique puisque un changement de valeur isotopique avait été observé dans la nouvelle biomasse. Cette inadéquation apparente est probablement due aux limites d'observation des échantillons biologiques en microscopie électronique.

Pour pallier ces inconvénients, deux solutions peuvent être envisagées. La première est une série de coupes ultra-fines au microtome après avoir inclus l'échantillon dans une résine ou de la paraffine. Cette technique nous permettrait de voir la présence du mycélium au cœur du matériau et éventuellement des traces de biodégradation. L'épaisseur des coupes varie

entre 2 et 25 micromètres avec un microtome (microscope photonique) et de 60 à 100 nanomètres avec un ultramicrotome (microscope électronique). La seconde est une observation en microscopie électronique en métallisant les échantillons afin de mieux observer la surface en ayant pris soin au préalable de laver les films pour éliminer la présence de micro-organismes altérant la qualité surfacique des films.

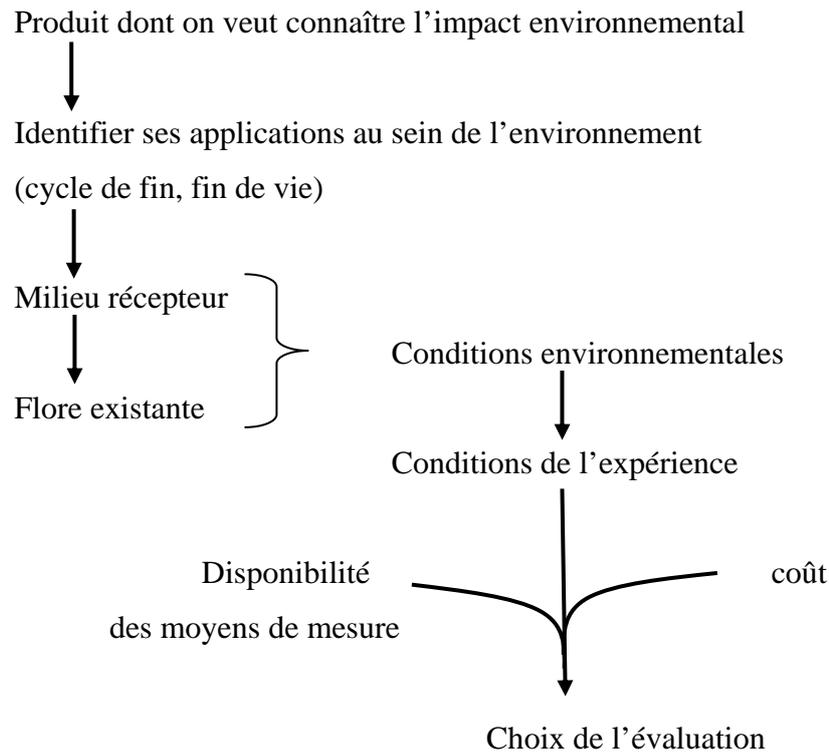
C. Conclusion

La microscopie est un outil très intéressant car elle permet de voir. Un test de biodégradabilité s'effectue avec des organismes vivants dont l'activité dépend d'une multitude de facteurs. Avec la matière vivante, aucune expérience n'est similaire, il est alors important d'observer les différentes interactions des acteurs présents. Mais elle présente aussi ses limites. En effet, lorsque le substrat possède une structure aérée qui laisse traverser la lumière, comme les fibres végétales, l'analyse microscopique nous fournit de nombreuses informations sur la localisation des micro-organismes, la forme adoptée, leur croissance, la structure des fibres végétales, leur assemblage, la nature des fibres préférentiellement dégradées, etc. En revanche, les films de paillage sont opaques à la lumière et limitent l'observation à la surface.

Dans le cas des fibres végétales, la technique microscopique peut s'avérer acceptable pour estimer la biodégradabilité en cumulant disparition du substrat et croissance de la biomasse mais ne donne lieu qu'à des présomptions. En utilisant coloration et analyse d'image, la présomption devient une preuve mais uniquement valide pour les fibres végétales. Or nous souhaitons une "universalité" du test de bioassimilation et la visualisation des flux de matière dans la biomasse. L'analyse isotopique est la seule technique qui répond, aujourd'hui, à cet objectif.

Conclusion et perspectives

La mise en œuvre d'un test de bioassimilation, comme tous les tests de biodégradabilité, se veut représentative de la réalité et nécessite au préalable l'établissement de cette démarche :



Notre objectif qui consistait à trouver un moyen permettant d'affirmer l'incorporation d'un substrat donné dans un micro-organisme est atteint. La transposition de l'utilisation des isotopes au sein du domaine de la biodégradabilité est un succès. Le marquage des souches fongiques en milieu liquide avec des oses simples est réussi. Les résultats de cette phase, comparés à ceux obtenus dans la littérature, ont soulevé une perspective d'étude de la discrimination isotopique en fonction de la nature du substrat, de son origine (C3, C4 et les valeurs intermédiaires) et de l'espèce fongiques (classe, rôle écologique).

Le test de bioassimilation est validé par les résultats des feutres végétaux qui se révèlent, comme attendu, bioassimilables par les deux souches fongiques testées, représentatives de la flore tellurique des sols cultivés. Des différences isotopiques sont observées en fonction des structures anatomiques adoptées par le champignon. La forme sporulée se révèle très proche de la valeur isotopique du substrat alors que la forme

mycélienne et les carpophores présentent un enrichissement en ^{13}C par rapport au substrat. Les techniques microscopiques ont particulièrement pu être exploitées sur ce substrat car, d'une part, l'échantillon peut être traversé par la lumière, et d'autre part, la croissance des champignons et la dégradation des fibres végétales nous ont offert des observations interprétables. Pour finir, ces interprétations ont été facilitées par, à la fois la connaissance des polymères constitutifs des feutres (fibres végétales) et leur identification structurale (trachéides, fibrilles, ...) et biochimique (lignines, pectines, cellulose, etc.) décrites dans tous les livres de physiologie végétale.

La bioassimilation des films de paillage est plus délicate, d'une part à obtenir et d'autre part à interpréter. La biomasse néosynthétisée n'a pas été très abondante probablement en raison de la présence de polymères d'origine pétrochimique et des transformations potentielles de la partie végétale lors de la production du film. Toutefois, le film farine de céréales/polyester permet la croissance des deux souches fongiques qui montrent un changement de valeurs isotopiques. De plus, sur le film polyester seul, *Phanerochaete chrysosporium* montre une assimilation du film, incomplète mais présente. Pour ce type de film, le test doit être amélioré en apportant des facteurs de croissance aux micro-organismes, notamment une source azotée et des vitamines, probablement absentes dans la formulation du film mais présentes dans les conditions réelles. Concernant le néosac, la prolifération macroscopique s'est révélée insuffisante et les résultats isotopiques ne montrent pas de bioassimilation, ni de tendance vers une bioassimilation. Pour ce type de substrat qui a été formulé en intégrant l'action des paramètres abiotiques (UV, chaleur), le test de bioassimilation doit également relier les actions abiotiques aux activités biologiques.

Ce test de bioassimilation appliqué à la substance à activité biocide est intéressant car d'une part il montre sa validité en milieu liquide et d'autre part, il apporte une alternative aux molécules inadaptées aux tests de biodégradabilité classiques. Les résultats isotopiques montrent une bioassimilation de la substance testée, plus aisément par *P. chrysosporium* que *T. viride*. Les conditions du test sont assez sévères (unique source de carbone, monoculture), la substance ne devrait pas s'accumuler dans le milieu naturel. Toutefois, à l'issue de ce test, nous ne pouvons qu'affirmer que la substance à activité biocide ne peut être considérée comme bioassimilable uniquement par *P. chrysosporium*. En revanche, son activité biocide se révèle inefficace sur les deux souches telluriques testées, à la fois en solution et aspergée sur un substrat solide.

Le test de bioassimilation mis en place présente une double innovation, dans le marquage et dans le suivi de la bioassimilation. En effet, la discrimination naturelle des isotopes lors de la photosynthèse engendre notamment deux types de plantes, les plantes dites C3 et les plantes dites C4. Les feuilles, les tiges, les racines ainsi que les différents polymères et molécules constitutifs possèdent approximativement la même valeur isotopique que la plante entière. Nous avons utilisé cette caractéristique pour marquer la biomasse microbienne et nous avons obtenu des micro-organismes marqués C3 ou C4. La bioassimilation d'un agroproduit a été estimée par modification de la valeur isotopique initiale vers celle du substrat bioassimilé. Cette stratégie permet de répondre à notre volonté "d'universalité" du test car tous les substrats peuvent être testés, ceux issus de la valorisation des agro-ressources comme ceux de la pétrochimie, avec la flore désirée dans les conditions souhaitées. Nous avons observé l'assimilation des isotopes carbonés mais la technique pourrait se révéler aussi efficace avec d'autres atomes (N, S, O).

Toutefois, ce test présente ses limites. La monoculture, en faisant abstraction des paramètres abiotiques, est trop éloigné des conditions naturelles. De plus, il ne montre qu'une assimilation qualitative alors que les aspects quantitatif et temporel (% de substrat bioassimilé en x mois) sont très importants pour estimer la durée de biodégradation d'un produit.

De ce bilan et de ces différentes remarques découlent de nombreuses perspectives, à la fois au niveau des améliorations techniques du test, du développement des deux techniques d'évaluation mais également sur des aspects plus fondamentaux.

Sur un aspect technique, le test de bioassimilation présenté dans ce manuscrit est réalisé avec le substrat à tester en unique source de nutriments. Certains substrats sont assez riches et possèdent une valeur nutritive suffisante pour la prolifération des micro-organismes, d'autres peuvent révéler certaines carences (azote, oligoéléments, ...). Une hiérarchie pourrait être envisagée, sur le même principe que la classification des tests de biodégradabilité selon la directive OCDE (biodégradabilité facile, inhérente, en simulation des conditions naturelles). Le premier degré correspondrait au test avec le substrat à tester en source unique de nutriments ; pour le second, des facteurs de croissance minéraux ou des paramètres abiotiques (UV, chaleur) seraient ajoutés (milieu minimal et conditions définies) ; dans le troisième degré, le milieu de culture serait complété de facteurs de croissance organiques (milieu non défini : hydrolysats de levures par exemple). Ainsi, les substrats testés seraient classés selon leur valeur nutritive (élevée, moyenne, faible voire nulle).

Au niveau de la méthodologie, les tests de biodégradabilité ont toujours pour objectif de simuler les conditions naturelles. Le test de bioassimilation doit évoluer vers un système plus complexe avec une matrice sol ou compost et la prise en compte des paramètres abiotiques (soleil, pluie, vent, température, cycles diurnes/nocturnes, cycles saisonniers, ...). Cette étape doit être progressive. Dans un premier temps, une adaptation de ce test sur un support minéral (vermiculite, pouzzolane) peut être envisagée afin de s'approcher des conditions de sol ou de compost. Elle peut être accompagnée d'une réalisation en cycles diurne/nocturne en enceinte climatique avec les variations de luminosité, températures et humidité inhérentes.

Dans l'objectif d'une normalisation, ce test de bioassimilation doit présenter un caractère quantitatif. Dans un premier temps, un couplage analyse isotopique/respirométrie est facilement réalisable en analysant la valeur isotopique du CO₂ dégagé.

Concernant les techniques microscopiques, elles peuvent être développées dans le cadre des tests de biodégradabilité. Le suivi de la biodégradation des différents polymères végétaux est envisageable avec une coloration spécifique des polymères pariétaux et une analyse d'images pour quantifier la biodégradation. En effet, l'analyse d'images est de plus en plus utilisée dans des domaines de pointe tels que la Santé, l'Aéronautique ou les Biotechnologies.

L'analyse isotopique multi-noyaux peut se révéler une technique intéressante dans le suivi des polymères complexes (polymères constitutifs des plastiques, lignines, ...). En effet, l'association des signatures isotopiques des différents atomes d'une molécule (C, N, P, O, S) permet de révéler une empreinte isotopique spécifique à cette molécule. Le suivi de son empreinte permet de connaître son devenir et ses différentes transformations.

Sur un aspect fondamental, les études métaboliques en fonction de l'origine C3 ou C4 d'un substrat doivent être approfondies afin de comprendre les raisons de la discrimination et le mécanisme utilisé par les champignons. Des comparaisons, en fonction de leur groupe (Zygomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes) ou de leur rôle écologique, peuvent apporter des éléments de réponse. L'étude pourrait être élargie aux procaryotes pour savoir s'ils adoptent le même comportement et apporter ainsi apporter des modulations aux résultats obtenus par les suivis métaboliques actuels (par exemple, RMN *in vivo*).

Références bibliographiques

Abd El-Rehim H.A., Hegazy E.-S.A., Ali A.M. and Rabie A.M. (2004). Synergistic effect of combining UV-sunlight-soil burial treatment on the biodegradation rate of LDPE/starch blends. *Journal of photochemistry and photobiology A : chemistry*, **163** : 547-556.

Abraham W.-R. and Hesse C. (2003). Isotope fractionations in the biosynthesis of cell components by different fungi : a basis for environmental carbon flux studies. *FEMS microbiology, ecology*, **46** : 121-128.

Ademe (2001). Tensioactifs et oléagineux. Disponible sur www.ademe.fr/htdocs/publications/publipdf/etude.pdf

Ahtiainen J., Aalto M. and Pessala P. (2003). Biodegradation of chemicals in a standardized test and in environmental conditions. *Chemosphere*, **51** : 529-537.

Akin D.E. and Rigsby L.L. (1987). Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. *Applied and environmental microbiology*, **53** (9) : 1987-1995.

Akin D.E., Rigsby L.L., Sethuraman A., Morrison III W.H., Gamble G.R. and Eriksson K.-E.L. (1995). Alteration in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Applied and environmental microbiology*, **61** (4) : 1591-1598.

Akin D.E., Morrison III W.H., Rigsby L.L., Gamble G.R., Sethuraman A. and Eriksson K.-E.L. (1996). Biological delignification of plant components by the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Animal feed science technology*, **63** : 305-321.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson J. D. (1995). Biologie moléculaire de la cellule. 3^{ème} édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

Alexy R., Kümpel T. and Kümmerer K. (2004). Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test. *Chemosphere*, **57** : 505-512.

Araujo M.A., Cunha A.M. and Mota M. (2004). Enzymatic degradation of starch-based thermoplastic compounds used in prostheses: identification of the degradation products in solution. *Biomaterials*, **25** (13): 2687-2693.

Baddi G.A., Albuquerque J.A., Gonzalvez J., Cegarra J. and Hafidi M. (2004). Chemical and spectroscopic analyses of organic matter transformations during composting of olive mill wastes. *International biodeterioration and biodegradation*, **54** : 39-44.

Barsberg S. and Nielsen K.A. (2003). Oxidative quenching of spruce thermomechanical pulp fiber autofluorescence monitored in real time by confocal laser scanning microscopy – implications for lignin autofluorescence. *Biomacromolecules*, **4** (1) : 64-69.

Batt C.A., Carvalho S., Easson Jr, D.D., Akedo M; and Sinskey A.J. (1985). Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, **28**: 549-553.

Battersby N.S. (1997). The iso headspace CO₂ biodegradation test. *Chemosphere*, **34** (8) : 1813-1822.

Béguin P. and Aubert JP (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS microbiology reviews*, **13** : 25-58.

Belal E.S. (2003). Investigations on biodegradation of polyesters by isolated mesophilic microbes, thèse de doctorat. Technical University Braunschweig, Germany. Available on <http://opus.tu-bs.de/opus/volltexte/2003/501/>.

Bellia G., Tosin M., Floridi G. and Degli-innocenti (1999). Activated vermiculite, a solid bed for testing biodegradability under composting conditions. *Polymer degradation and stability*, **66** : 65-79.

Benedict C. V., Cameron J. A., and Samuel J. (1983). Polycaprolactone degradation by mixed and pure cultures of bacteria and a yeast. *Journal of applied polymer science*, **28**, 335-342.

Bewa H. (2005). Biodégradabilité et matériaux polymères biodégradables. Note de synthèse I. Disponible sur www.ademe.fr

Bikiaris D.N., Papegeorgiou G.Z. and Achilias D.S. (2006). Synthesis and comparative biodegradability studies of three poly(alkylen succinate)s. *Polymer degradation and stability*, **91** : 31-43.

Briassoulis D. (2005). The effects of tensile stress and the agrochemicals Vapam on the ageing of low density polyethylene (LDPE) agricultural films. Part I. Mechanical behaviour. *Polymer degradation and stability*, **86**: 489-503.

Call H.P. and Mücke I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym® process). *Journal of biotechnology*, **53** : 163-202.

Calmon A., Duserre-Bresson L., Bellon-Maurel V., Feuilleley P. and Silvestre F. (2000). An automated test for measuring polymer biodegradation. *Chemosphere*, **41** : 645-651.

Chaillou S., Postma P.W. and Pouwels P.H. (1998). Functionnal expression in *Lactobacillus plantarum* of xylP encoding the isoprimeverose transporter of *Lactobacillus pentosus*. *Journal of bacteriology*, **180** (5) : 4011-4014.

Chamarro E., Marco A. and Esplugas S. (2001). Use of Fenton reagent to improve organic chemical biodegradability. *Water research*, **35** (4) : 1047-1051.

Chandra R. and Rustgi R. (1998). Biodegradable polymers. *Progress in polymer science*, **23** : 1273-1335.

Chertov O., Gorbushina A. and Deventer B. (2004). A model for microcolonial fungi growth on rock surfaces. *Ecological Modelling*, **177**: 415-426.

Choi A.H.C. and O'Day D.H. (1984). Calcofluor staining of cellulose during microcyst differentiation in wild-type and mutant strains of *polysphondylium pallidum*. *Journal of Bacteriology*, **157** (1) : 291-296.

Cowling E.B. and Brown W. (1969). Structural features of cellulosic materials in relation to enzymatic hydrolysis. *Advances in chemistry series*, **95** : 152-187.

Craig H. (1957). Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analyses of carbon dioxide. *Geochimica and cosmochimica Acta*, **12**: 133-149.

Crispim C.A. and Gaylarde C.C. (2005). Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage : a review. *Microbial ecology*, **49** : 1-9.

Davet P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. Editions INRA, Paris.

Davis E.O. and Henderson P.J.F. (1987). The cloning and DNA sequence of the gene xyle for xylose proton symport in *Escherichia coli* K12. *Journal of biological chemistry*, **262** (29) : 13928-13932.

Degli-Innocenti F. (1998). A degradation test method for polymers in a defined solid matrix (the vermiculite tes method). International biodeterioration research group. Chester, UK.

Dejong E., Field J.A., and Debont J.A.M. (1994). Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS microbiology reviews* **13**:153-188.

Demarescaux P. (1998). Situations et perspectives de développement des productions alimentaires à usage non agricole.

Dignac M.-F., Bahri H., Rumpel C., Rasse D.P., Bardoux G., Balesdent J., Girardin C., Chenu C. and Mariotti A. (2005). Carbon-13 natural abundance as a tool to study the dynamics of lignin monomers in soil : an appraisal at the Closeaux experimental field (France). *Geoderma*, **128** (1-2): 3-17.

Domenek S., Feuilloley P., Grataud J., Morel M.-H. and Guilbert S. (2004). Biodegradability of wheat gluten based bioplastics. *Chemosphere*, **54** : 551-559.

Dommergues Y. et Mangenot F. (1972). Ecologie microbienne du sol. Eds Masson & Cie.

Dongowski G. (2001). Enzymatic degradation studies of pectin and cellulose from red beets. *Nahrung*, **45** (5) : 324-331.

Dubois M. (2003). Eléments de base de géochimie des isotopes stables, http://www.univ-lille1.fr/geosciences/cours/geochimie_isotopique.html

Duchaufour P. (2001). Introduction à la science du sol. Sol, végétation, environnement. 6^{ème} édition. Edition Dunod, Paris.

Edwards H.G.M., Farwell D.W. and Webster D. (1997). FT raman microscopy of untreated natural plant fibres. *Spectrochimica acta, part A*, **53** : 2383-2392.

Eggins H.O.W., Oxley T.A. (2001). Biodeterioration and biodegradation. *International biodeterioration and biodegradation*, **48** : 12-15.

Eisentraeger A., Schmidt M., Murrenhoff H., Dott W. and Hahn S. (2002). Biodegradability testing of synthetic ester lubricants-effects of additives and usage. *Chemosphere*, **48** : 89-96.

Enoki A., Itakura S. and Tanaka H. (1992). Extracellular substance from the brown-rot basidiomycetes *Gloeophyllum trabeum* that produce and reduces hydrogen peroxide. *Material and organismen*, **27** : 247-261.

Enoki A., Itakura S. and Tanaka H. (1997). The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric ion to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi. *Journal of biotechnology*, **53** : 265-272.

Faraji F. (2005). Etude de la durabilité d'un composite multicouche en mélange de placages de durabilités variables. Thèse, spécialité Sciences forestières et du bois, Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts, Montpellier, France.

Feldmann S.D., Sahm H. and Sprenger G.A. (1992). Pentose metabolism in *Zymomonas mobilis* wild-type and recombinant strains. *Applied microbiology and biotechnology*, **38** : 354-361.

Fernandez I., Mathieu N. and Cadish G. (2003). Carbon isotopic fractionation during decomposition of plant materials of different quality. *Global biogeochemical cycle*, **17** (3) : 1-11.

Feugeas F., Magnin J.-P., Cornet A. and Rameau J.-J. (1997). Corrosion influencée par les micro-organismes : influence du biofilm sur la corrosion des aciers, techniques et résultats récents. *Journal de physique III* : 631-663.

Flemming H.-C. (1998). Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. *Polymer degradation and stability*, **59** : 309-315.

Fromm J., Rockel B. Lautner S., Windeisen E. and Wanner G. (2003). Lignin distribution in wood cell wall determined by TEM and backscattered SEM techniques. *Journal of structural biology*, **143** (1) : 77-84.

Galimov E.M. (2006). Isotope organic geochemistry. *Organic geochemistry*, **37** : 1200–1262.

Gan Z., Kuwabara K., Yamamoto M., Abe H. and Doi Y. (2004). Solid-state structures and thermal properties of aliphatic-aromatic poly(butylenes adipate-co-butylene terephthalate) copolyesters. *Polymer degradation and stability*, **83** : 289-300.

Gattin R., Copinet A; Bertrand C. and Couturier Y. (2002). Biodegradatuin study of a starch and poly(lactic acid) co-extruded material in liquid, composting and inert mineral media. *International biodeterioration and biodegradation*, **50** : 25-31.

Ghashghaie J., Tcherkez G., Cornic G. and Deleens E. (2001). Utilisation de la spectrométrie de masse isotopique en physiologie végétale – Ecole thématique biologie végétale : 1-9.

Gilardi G., Abis L. and Cass E.G. (1995). Carbon-13 CP/MAS solid-state NMR and FT-IR spectroscopy of wood cell wall biodegradation. *Enzyme and microbial technology*, **17** : 268-275.

Gleixner G., Danier H.J., Werner R.A. and Schmidt H.L. (1993). Correlation between the carbon-13 content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. *Plant physiology*, **102** : 1287-1290.

Gotvajn A.Z. and Zagorc-Koncan J. (1999). Laboratory simulation of biodegradation of chemicals in surface waters : closed bottle and respirometric test. *Chemosphere*, **38** (6) : 551-559.

Gourdon R. (2002). Aide a la définition des déchets dits biodégradables, fermentescibles, méthanisables, compostables. Etude RE.CO.R.D. Disponible sur www.record-net.org.

Grima S. (2002). Biodégradation de matériaux polymères à usage agricole : Etude et mise au point d'une nouvelle méthode de test, analyse des produits de dégradation et impact environnemental. Thèse INP Toulouse, 2002.

Green III F. and Highley T.L. (1997). Mechanism of brown-rot decay : paradigm or paradox. *International biodeterioration and biodegradation*, **39** (2) : 113-124.

Gu J.-D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International biodeterioration and biodegradation*, **52**: 69-91.

Gu J.-D., Ford T.E., Berke N.S. and Mitchell R. (1998). Biodeterioration of concrete by the fungus *Fusarium*. *International biodeterioration and biodegradation*, **41**: 101-109.

Guignard J.-L. (2000). Biochimie végétale. 2^{ème} édition. Edition Dunod, Paris.

Gutarowska B. and Piotrowska M. (2007). Methods of mycological analysis in buildings. *Buildings and environment*, **42** (4): 1843-1850.

Hakkarainen M., Karlsson S. and Albertsson A.-C. (2000). Rapid (bio)degradation of polylactide by mixed culture of compost microorganisms – low molecular weight products and matrix changes. *Polymer*, **41** : 2331-2338.

Hayes J.M. (2001). Fractionation of the isotopes of carbon and hydrogen in biosynthetic processes. *National meeting of the geological society of America*, Boston, MA, 2-4.

Hammel K.E., Kapich A.N., Jensen Jr K.A. and Ryan C. (2002). Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and microbial technology*, **30** : 445-453.

Harvey P.J., Schoemaker H.E. and Palmer J.M. (1986). Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *Journal of biological chemistry*, **261** : 16948-16952.

Henn M.R. and Chapela I.H. (2000). Differential C isotope discrimination by fungi during decomposition of C3- and C4-derived sucrose. *Applied and environmental microbiology*, **66** (10) : 4180-4186.

Heuberger E.H.M., Smits E. and Poolman B. (2001). Xylosides transport by XylP, a member of the Galactoside-Pentoside-Hexuronide family. *The journal of biological chemistry*, **276** (37) : 34465-34472.

Highley (1977). Requirements for cellulose degradation by a brown-rot fungus. *Materials and organismen*, **12** : 25-36.

Himmelsbach D.S., Khahili S. and Akin D.E. (1999). Near-infrared-Fourier-transform-raman microspectroscopic imaging of flax stems. *Vibrational spectroscopy*, **19** : 361-367.

His I., Andeme-Onzighi C., Morvan C. and Driouich A. (2001). Microscopic studies on mature flax fibers embedded in LR white : immunogold localization of cell wall matrix polysaccharides. *Journal of histochemistry and cytochemistry*, **49** (12) : 1525-1536.

Hofrichter M. (2002). Review : lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and microbial technology*, **30** : 454-466.

Howard G. T. (2002). Biodegradation of polyurethane: a review. *International biodeterioration and biodegradation*, **49** : 245-252.

Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L. and Howard S. (2003). Lignocellulose biotechnology : issues of bioconversion and enzyme production. *African journal of biotechnology*, **2** (12) : 602-619.

Hongwei Y., Zhanpeng J., Shaoqi S. and Tang W.Z. (2002). INT-dehydrogenase activity test for assessing anaerobic biodegradability of organic compounds. *Ecotoxicology and environmental safety*, **53** : 416-421.

IFR, plateforme "Métabolisme" et spectrométrie de masse isotopique, <http://www.ifr87.cnrs-gif.platefor/metabol/metabol.html>

Itavaara M. and Vikman M. (1995). A simple screening test for studying the biodegradability of insoluble polymers. *Chemosphere*, **31** (11/12) : 4359-4373.

Jackson S. and Nicolson S.W. (2002). Xylose as a nectar sugar : from biochemistry to ecology. *Comparative biochemistry and physiology Part B*, **131** : 613-620.

Jakubowicz I., Yarahmadi N., Petersen H. (2006). Evaluation of the rate of abiotic degradation of biodegradable polyethylene in various environments. *Polymer degradation and stability*, **91** (6): 1556-1562.

Jarerat A. and Tokiwa Y. (2001). Degradation of poly(tetramethylene succinate) by thermophilic actinomycetes. *Biotechnology Letters*, **23** : 647 – 651.

Jendrossek D. (1998). Microbial degradation of polyesters: a review on extracellular poly(hydroxyalkanoic acid) depolymerases. *Polymer degradation and stability*, **59** : 317-325.

Kacurakova M., Wellner N., Ebringerova A., Hromadkova Z., Wilson R.H. and Belton P.S. (1999). Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. *Food hydrocolloids*, **13** : 35-41.

Kaczmar Y., enseignant en C.P.G.E. au Lycée Montaigne de Bordeaux. Fractionnement isotopique, radiochronologie, paléothermomètre, exposé, <http://svt.ac-bordeaux.fr/isotop.htm>

Kalbitz K., Schwesig D., Schmerwitz J., Kaiser K., Haumaier L., Glaser B., Ellerbrock R. and Leinweber (2003). Change in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation. *Soil biology and biochemistry*, **35** : 1129-1142.

Kapich A.N., Jensen K.A. and Hammel K.E. (1999). Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. *FEBS Letters*, **461** : 115-119.

Kawai F., Watanabe M., Shibata M., Yokoyama S., Sudate Y., Hayashi S. (2004). Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi. *Polymer degradation and stability*, **86**: 105-114.

Ki H.C. and Park O.O. (2001). Synthesis, characterization and biodegradability of the biodegradable aliphatic-aromatic random copolyesters. *Polymer*, **42** : 1849-1861.

Khindaria A., Yamazaki I., and Aust S.D. (1996). Stabilization of the veratryl alcohol cation radical by lignin peroxidase. *Biochemistry*, **35** : 6418-6424.

Ki H.C. and Park O.O. (2001). Synthesis, characterization and biodegradability of the biodegradable aliphatic-aromatic random copolyesters. *Polymer*, **42** : 1849-1861.

Kim H.-S., Kim H.-J., Lee J.-W. and Choi I.-G. (2005). Biodegradability of bio-flour filled biodegradable poly(butylenes succinate) bio-composites in natural and compost soil. *Polymer degradation and stability*, **91** (5): 1117-1127.

Kim M. N., Lee A. R., Yoon J. S. and Chin I. J. (2000). Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green® and Mater-Bi® by fungi isolated from soils. *European polymer journal*, **36** (8) : 1677-1685.

Kirk K. and Cullen D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi. *In* : Young R.A., Akhtar M (Eds) Environmental friendly technologies for pulp and paper industry. Wiley, New York, 273-307.

Kleeberg I., Hetz C., Kroppenstedt R. M., Müller R.-J. and Deckwer W.-D. (1998). Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyester by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates. *Applied and environmental microbiology*, **64** (5) : 1731- 1735.

Koduri R.S. and Tien M. (1994). Kinetic analysis of lignin peroxydase : explanation for the mediation phenomenon by veratryl alcohol. *Biochemistry*, **33** : 4225-4230.

Kremer S.M., Hyde S.M. and Wood P.M. (1993). Cellobiose deshydrogenase from white- and brown-rot fungi as source of hydroxyl radicals. *Proceedings 9th International biodegradation and biodeterioration symposium*, Leeds, UK, 55-60.

Kurek B. Martinez-Inigo M.J., Artaud I., Hames B.R., Lequart C. and Monties B. (1997). Structural features of lignin determining its biodegradation by oxidative enzymes and related systems. *Polymer degradation and stability*, **59** : 359-364.

Laberche J-C. (1999). Biologie végétale. Eds Dunod. Chapitre 5 : L'organisation tissulaire de la plante, p83-105.

Langeron M. et Vanbreuseghem R. (1952). Précis de mycologie, mycologie générale, mycologie humaine et animale, techniques. 2^{ème} édition. Eds Masson & Cie.

Larson R.J., Hansmann M.A. and Bookland E.A. (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradation tests : mass transfer and kinetic considerations. *Chemosphere*, **33** (6) : 1195-1210.

Lefaux S., Manceau A., Benguigui L., Campistron I., Laguerre A., Laulier M., Leignel V. and Tremblin G. (2004). Continuous automated measurement of carbon dioxide produced by microorganisms in aerobic conditions : application to proteic film biodegradation. *C.R. Chimie* : 97-101.

Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtas-Wasilewska M., Cho N.-S. and Hofrichter M. (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal genetics and biology*, **27** : 175-185.

Lequart C., Ruel K., Lapierre C., Pollet B. and Kurek B. (2000). Abiotic and enzymatic degradation of wheat straw cell wall : a biochemical and ultrastructural investigation. *Journal of biotechnology*, **80** (3) : 249-259.

Linder M., Winięcka-Krusnell J. and Linder E. (2002). Use of recombinant cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellulase as a selective immunocytochemical marker of cellulose in protozoa. *Applied and environmental microbiology*, **68** (5) : 2503-2508.

Lörcks J. (1998). Properties and applications of compostable starch-based plastic material. *Polymer degradation and stability*, **59** (1-3): 245-249.

Lugauskas A., Levinskaite L. and Peciulyte D. (2003). Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. *International biodeterioration and biodegradation*, **52** (4) : 233-242.

Lulai E.C. and Morgan W.C. (1992). Histochemical probing of potato periderm with neutral red : a sensitive cytofluorochrome for the hydrophobic domain of suberine. *Biotechnics and histochemistry*, **67** (4) : 185-195.

Lundquist K. And Kirk T.K. (1978). De novo synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete. *Phytochemistry*, **17** : 1676.

Lunt J. (1998). Large-scale production, properties and commercial application of polylactic acid polymers. *Polymer degradation and stability*, **59** : 145-152.

Machado A.E.H., Nicodem D.E., Ruggiero R., Perez D.D.S. and Castellan A. (2001). The use of fluorescent probes in the characterization of lignin : the distribution, by energy, of fluorophores in *Eucalyptus grandis* lignin. *Journal of photochemistry and photobiology A.*, **138** : 253-259.

Mariotti A. (1991). Le carbone 13 en abondance naturelle, traceur de la dynamique de la matière organique des sols et de l'évolution des paléoenvironnements continentaux. *Cahiers Orstom, série pedologie*, **26** (4) : 299-313.

Marquès-Calvo M.S., Cerda-Cuellar M., Kint D.P.R., Bou J.J. and Munoz-Guerra S. (2006). Enzymatic and microbial biodegradability of poly(ethylene terphthalate) copolymers containing nitrated units. *Polymer degradation and stability*, **91** (4): 663-671.

Marten E., Müller R.-J. and Deckwer W.-D.(). Studies of the enzymatic hydrolysis of polyesters. II: Aliphatic-aromatic copolyesters. *Polymer degradation and stability*, **88**: 371-381.

Massardier-Nageotte V., Pestre C., Cruard-Pradet T. and Bayard R. (2006). Aerobic and anaerobic biodegradability of polymer films and physico-chemical characterization. *Polymer degradation and stability*, **91** (3) : 620-627.

Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and microbial technology*, **40**: 1451–1463.

Mekareb S. (2006). Modélisation des structures en bois en environnement variable. Thèse de doctorat, Université de Limoges, spécialité Génie Civil.

Mezzanotte V., Bertani R., Degli Innocenti F., Tosin M. (2005). Influence of inocula on the results of biodegradation tests. *Polymer degradation and stability*, **87**: 51-56.

Micic M., Radotic K., Jeremic M., Djikanovic D. and Kammer S.B. (2004). Study of the lignin model compound supramolecular structure by combination of near-field scanning optical microscopy and atomic force microscopy. *Colloids and surfaces. B biointerfaces*, **34** (1) : 33-40

Miles R.A. and Doucette W.J. (2001). Assessing the aerobic biodegradability of 14 hydrocarbons in two soils using a simple microcosm/respiration method. *Chemosphere*, **45** : 1085-1090.

Mondolot L., Roussel J.-L. and Andary C. (2001). New applications for an old lignified element staining reagent. *Histochemical journal*, **33** (7) : 379-385.

Morancho J.M., Ramis X., Fernandez X., Cadenato A., Salla J.M., Vallès A, Contat L. and Ribes A. (2006). Calorimetric and thermogravimetric studies of UV-irradiated polypropylene/starch-based materials aged in soil. *Polymer degradation and stability*, **91** (1) : 44-51.

Mortaigne B (2005). Vieillissement des composites. Mécanismes et méthodologie d'étude. Techniques de l'ingénieur.

Muller R. J., Witt U., Rantze E. and Deckwer W. D. (1998). Architecture of biodegradable copolyesters containing aromatic constituents. *Polymer degradation and stability*, **59** : 203-208.

Muller R. J., Kleeberg I. and Deckwer W. D. (2001). Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *Journal of biotechnology*, **86** : 87-95.

Muller R.J. (2003). Biodegradability of polymers : regulations and methods for testing. In : Steinbüchel A Editor. *Biopolymers*, vol. **10**. Weinheim : Wiley – CH.

Murphy C. A., Cameron J. A., Huang S. J. and Vinopal R. T. (1996). *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Applied and environmental microbiology*, **62** (2) : 456-460.

Nakamura H., Nakamura T., Noguchi and Imagawa K. (2006). Photodegradation of PEEK sheets under tensile stress. *Polymer degradation and stability*, **9** : 740-746.

Norr C., Meinecke S. and Brackemann H. (2001). Modification of the Zahn-Wellens test : détermination of the biodegradability of poorly soluble, adsorbing and volatile substances by measurement of oxygen consumption and carbon dioxide production. *Chemosphere*, **44** : 553-559.

Nuhoglu Y., Oguz E., Uslu H., Ozbek A., Ipekoglu B., Ocak I. and Hasenekoglu I. (2006). The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey. *Journal of the total environment*, **364**: 272-283.

O'Leavy M.H. (1981). Review : carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, **20** (4) : 553-567.

Otsuka Y., Sonoki T., Ikeda S., Kajita S., Nakamura M. and Katayama Y. (2003). Detection and characterization of a novel extracellular fungal enzyme that catalyses the specific and hydrolytic cleavage of lignin guaiacylglycerol β -aryl ether linkages. *FEBS*, **270** : 2353-2362.

Pagga U. (1997). Testing biodegradability with standardized methods. *Chemosphere*, **35** (12) : 2953-2972.

Pagga U., Schäfer A., Muller R.-J. and Pantke M. (2001). Determination of the aerobic biodegradability of polymeric material in aquatic batch tests. *Chemosphere*, **42**: 319-331.

Pelmont J (1993). Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques. Editions Presses universitaires de Grenoble. 899 pages.

Pelmont J. (2005). Biodégradations et métabolismes. Les bactéries pour les technologies de l'environnement. Edition EDP Sciences. 797 pages.

Peltola J.S.P, Juhanaja J. and Salkinoja-Salonen M.S. (2000). Biodegradability and waste behaviour of industrial wood-based construction materials. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, **24** : 210-218.

Perez J, Munoz-Dorado J., De la Rubia T. and Martinez J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin : an overview. *International microbiology*, **5** : 53-63.

Pollard T. D. and Aernshaw W. C. (2004). *Biologie cellulaire*. Editions Elsevier SAS, Paris. 853 pages.

Prananmuda H., Tokiwa Y. and Tanaka H. (1995). Microbial degradation of an aliphatic polyester with a high melting point, poly(Tetramethylene succinate). *Applied and environmental microbiology*, **61** (5) : 1828-1832.

Prathumpai W., Gabelgaard J.B., Wanchanthuek P., Van de Vondervoort P.J.I., De Groot M.J.L., McIntyre M. and Nielsen J. (2003). Metabolic control analysis of xylose catabolism in *Aspergillus*. *Biotechnology progress*, **19** : 1136-1141.

Preeti D., Rohindra R. and Khurma J.R. (2003). Biodegradability study of poly(ϵ -caprolactone)/poly(vinyl butyral) blends. *South pacific journal of natural science*, **21** : 47-49.

Roberts D.J., Nica D., Zu G., Davis J.L. (2002). Quantifying microbially induced deterioration of concrete: initial studies. *International biodeterioration and biodegradation*; **49** : 227-234.

Radotic K., Tasic M., Jeremic M., Budimlija Z., Simic-Krstic J., Polzovic A. and Bozovic Z. (2001). Fractal analysis of STM images of photochemical polymer of coniferyl alcohol. *General physiology and biophysics*, **20** (1) : 33-42.

Ratto J.A., Stenhouse P.J., Auerbach M., Mitchell J. and Farrell R. (1999). Processing, performance and biodegradability of a thermoplastic aliphatic polyester/starch system. *Polymer*, **40** : 6777-6788.

Regnault J.-P (1990). *Microbiologie Générale*. Décarie Editeur Inc.

Reuschenbach P., Pagga U. and Strotmann U. (2003). A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. *Water research*, **37** : 1571-1582.

Rhoads T.L., Mikell A.T. and Eley M.H. (1995). Investigation of the lignin-degrading activity of *Serratia marcescens* : biochemical screening and ultrastructural evidence. *Canadian journal of microbiology*, **41** (7) : 592-600.

Richterich K. Berger H., Steber J. and KGaA (1998). The "two-phase closed bottle test" – a suitable method for the determination of “ready biodegradability” of poorly soluble compounds. *Chemosphere*, **37** (2) : 319-326.

Rizzarelli P., Puglisi C. and Montaudo G. (2004). Soil burial and enzymatic degradation in solution of aliphatic co-polyester. *Polymer degradation and stability*, **85** (2) : 855-863.

Roland J-C et Roland F. (1999). *Biologie végétale. Organisation de plantes à fleurs*. Eds Dunod.

Rubio C., Ott C., Amiel C., Dupont-Moral I., Travert J., Mariey L. (2006). Sulfato/thiosulfato reducing bacteria characterization by FT-IR spectroscopy: A new approach to biocorrosion control. *Journal of microbiological methods*; **64**: 287– 296.

Rutot D. et Dubois P. (service des Matériaux Polymères et Composites, Centre de Recherche Materia Nova, Université de Mons-Hainaut) (2004). Les (bio)polymères biodégradables : l'enjeu de demain ? *Chimie nouvelle*, n°86.

Scherer T. M., Fuller R.C., Lenz R. W. and Goodwin S. (1999). Hydrolase activity of an extracellular depolymerase from *Aspergillus fumigatus* with bacterial and synthetic polyester. *Polymer degradation and stability*, **64** : 267-275.

Soltani M. (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'Université Paris VI, Spécialité Chimie Analytique.

Srinivasan P.T. and Viraraghavan T. (2000). An analysis of the ‘modified Sturm test’ data. *Chemosphere*, **40** : 99-102.

Sudin R. and Swamy N. (2006). Bamboo and wood fibres cement composites for sustainable infrastructure regeneration? *Journal of materials science*; **41** (21): 6917-6924.

Szaraz L., Beczner J. and Kayser G. (2003). Investigation of the biodegradability of water-insoluble materials in a solid test based on the adaptation of a biological oxygen demand measuring system. *Polymer degradation and stability*, **81** (3) : 477-482.

Takeda Y., Takase K., Yamato I and Abe K. (1998). Sequencing and characterization of *xyl* operon of a gram-positive bacterium, *tetragenococcus halophila*. *Applied and environmental microbiology*, **64** (7) : 2513-2519.

Taylor J.G., Haigler C.H., Kilburn D.G. and Blanton R.L. (1996). Detection of cellulose with improved specificity using laser-based instruments. *Biotechnics and histochemistry*, **71** (5) : 215-223.

Tchmutin I., Ryvkina N., Saha N. and Saha P. (2004). Study on biodegradability of protein filled polymer composites using dielectric measurements. *Polymer degradation and stability*, **86** (3) : 411-417.

Titgemeyer F. and Hillen W. (2002). Global control of sugar metabolism : a gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82** : 59-71.

Tosin M, Degli-Innocenti F. and Bastioli C. (1998). Detection of toxic by-product released by a polyurethane-containing film using a composting test method based on mineral bed. *Journal of environmental polymer degradation*, **6** (2): 79-90.

Trulleyova S. and Rulik M. (2004). Determination of biodegradable dissolved organic carbon in waters : comparison of batch methods. *Science of the total environment*, **332** : 253-260.

Tserki V., Matzinos P., Pavlidou E., Vachliotis D. and Panayiotou C. (2006). Biodegradable aliphatic polyesters. Part I: properties and biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate). *Polymer degradation and stability*, **90**: 367-376.

Tsuji H., Echizen Y. and Nishimura Y. (2006). Photodegradation of biodegradable polyesters: a comprehensive study on poly(L-lactide) and poly(ϵ -caprolactone). *Polymer degradation and stability*, **91**: 1128-1137.

Tuor U., Winterhalter K. and Fiechter A. (1995). Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of biotechnology*, **41** : 1-17.

Vallade J. (2001). Structure et développement de la plante : morphogenèse et biologie de reproduction des Angiospermes. Eds Dunod.

Valli K., Wariishi H. and Gold M.H. (1990). Oxidation of monomethoxylated aromatic compound by lignin peroxidase : role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. *Biochemistry*, **29** : 8535-8539.

Van de Velde K. and Kiekens P. (2002). Biopolymers : overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer testing*, **21** : 433-442.

Yang H.-S., Yoon J.-S. and Kim M.-K. (2005). Dependence of biodegradability of plastics in compost on the shape of specimens. *Polymer degradation and stability*, **87** : 131-135.

Van der Zee M., Stoutjesdijk J.H., Feil H. and Feijen J. (1998). Relevance of aquatic biodegradation test for predicting degradation of polymeric materials during biological solid waste treatment. *Chemosphere*, **36** (3) : 461-473.

Varel V.H., Jung H.G. and Krumholz L.R. (1991). Degradation of cellulose and forage fiber fractions by ruminal cellulolytic bacteria alone and in coculture with phenolic monomer-degrading bacteria. *Journal of animal science*, **69** : 4993-5000.

Vinceslas-Akpa M. and Loquet M. (1997). Organic matter transformations in lignocellulosic waste products composted or vermicomposted (*Eseinia fetida andrei*) : chemical analysis and ¹³C CPMAS NMR spectroscopy. *Soil biology and biochemistry*, **29** (3/4) : 751-758.

Volhardt K.P.C. (1990). Traité de chimie organique. Eds Universitaire. Paris. p1092.

Wang N.S., cellulose degradation, available on www.glue.umd.edu.

Wang W. and Gao P.J. (2003). Function and mechanism of a low-molecular-weight peptide produced by *Gloeophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose. *Journal of biotechnology*, **101** : 119-130.

Warscheid T. and Braams J. (2000). Biodeterioration of stone: a review. *International biodeterioration and biodegradation*, **46** : 343-368.

Weil J.-H. (1994). Biochimie générale – 7^{ème} édition. Editions Masson. Paris.

Weiland M., Daro D. and David C. (1995). Biodegradation of thermally oxidized polyethylene. *Polymer degradation and stability*, **48** : 275-289.

White W.M. (1997). Chapitre 9 : stable isotope geochemistry in Geochemistry. Eds John Hopkins University Press.

Witt U., Einig T., Yamamoto M., Kleeberg I., Deckwer W.-D. and Müller R.-J. (2001). Biodegradation of aliphatic- aromatic copolyesters : evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere*, **44** (2) : 289 – 299.

Xiao B., Sun X.F. and Sun R.C. (2001). Chemical, structural and thermal characterization of alkali-soluble lignins and hemicellulose, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polymer degradation and stability*, **74** : 307-319.

Xu G. and Goodell B. (2001). Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi : chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. *Journal of biotechnology*, **87** : 43-57.

Zaccheo P., Cabassi G., Ricca G. and Crippa L. (2002). Decomposition of organic residues in soil : experimental technique and spectroscopic approach. *Organic geochemistry*, **33** : 327-345.

Zanardini E., Abbruscato P., Ghedini N., Realini M. and Sorlini C.(2000). Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone. *International biodeterioration and biodegradation*, **45** : 35-42.

Zapanta L.C. and Tien M. (1997). The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. *Journal of biotechnology*, **53** : 93-102.

Zhao J.-H., Wang X.-Q., Zeng J., Yang G., Shi F.-H. and Yan Q. (2005). Biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate) by *Aspergillus versicolor*. *Polymer degradation and stability*, **90**: 173-179.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma simplifié du cycle de la matière organique	5
Figure 2 : Les différents types trophiques	14
Figure 3 : Les différents transports membranaires	15
Figure 4 : Les principales voies du catabolisme	16
Figure 5 : La chaîne respiratoire aérobie.....	17
Figure 6 : Les couples redox potentiels en respiration anaérobie	17
Figure 7 : Les principales voies fermentaires.....	18
Figure 8 : Schématisation des différents acteurs et paramètres au sein d'un test de biodégradabilité.....	21
Figures 9 et 10 : La vallée de la stabilité.....	30
Figure 11 : Le cycle de l'azote	34
Figure 12 : $\delta^{15}\text{N}$ des principaux composés azotés du cycle biogéochimique	34
Figure 13 : Le fractionnement de l'oxygène au cours du cycle de l'eau	35
Figure 14 : $\delta^{13}\text{C}$ des composés carbonés.....	36
Figure 15 : L'incorporation du CO_2 atmosphérique chez les plantes en C3. a. Anatomie ; b. Le cycle de Calvin.....	37
Figure 16. L'incorporation du CO_2 atmosphérique chez les plantes en C4.....	38
Figure 17 : L'incorporation du CO_2 atmosphérique chez les plantes en CAM.....	39
Figure 18 : Schéma descriptif du spectromètre de masse des rapports isotopiques avec analyseur élémentaire.....	50
Figure 19 : La préparation des échantillons pour la combustion de la matière organique.....	52
Figure 20 : Le scellage des tubes à essais à la flamme	52
Figure 21 : La combustion de la matière organique.....	53
Figure 22 : Biodégradabilité des résines époxydées selon la directive OCDE 301F.....	58
Figure 23 : Biodégradabilité du Fus X selon la directive OCDE 301F.....	59
Figure 24 : La répartition des souches telluriques au sein des deux classifications des mycètes	66
Figure 25: Illustration de la distribution isotopique chez certains végétaux.....	74
Figure 26 : Illustration du principe du test de bioassimilation.....	80
Figure 27 : Les milieux de culture C3 et C4 vierges etensemencés par <i>P. chrysosporium</i> et <i>T. viride</i>	81
Figure 28 : Schéma de l'ensemencement des feutres végétaux	82
Figure 29 : Schéma de la première série d'expériences	83
Figure 30 : Schéma de la mise en œuvre du test de bioassimilation.....	83
Figure 31 : Evolution macroscopique du feutre L sur 12 moisensemencé par <i>Phanerochaete chrysosporium</i> et <i>Trichoderma viride</i>	86
Figure 32 : Schéma indiquant la création d'un carpophore	87
Figure 33 : Les carpophores de <i>T. viride</i> en culture sur un agromatériau en lin.....	87
Figure 34 : Evolution macroscopique du feutre L sur 12 moisensemencé par <i>P. chrysosporium</i> et <i>T. viride</i>	88
Figure 35 : Déstructuration du feutre LB	88
Figure 36 : Spores de <i>Trichoderma viride</i>	89
Figure 37 : Comparaison du feutre LB entre le témoin et 6 mois d'incubation.....	89
Figure 38 : Le feutre Lensemencé par <i>P. chrysosporium</i> et <i>T. viride</i> à deux semaines d'incubation.....	90
Figure 39 : Le feutre Lensemencé par <i>P. chrysosporium</i> et <i>T. viride</i> à deux mois d'incubation.....	91
Figure 40 : Le feutre Lensemencé par <i>P. chrysosporium</i> et <i>T. viride</i> à quatre mois d'incubation.....	91
Figure 41 : Evolution macroscopique du film farine/polyester, sur 12 mois,ensemencé par <i>Phanerochaete chrysosporium</i> et <i>Trichoderma viride</i>	92

Figure 42 : Rupture du film farine/polyester.....	93
Figure 43 : Apparition de spores de résistance de <i>P. chrysosporium</i> sur le film farine/polyester	93
Figure 44 : Halos d'éclaircissement sur le film farine/polyester par <i>T. viride</i>	94
Figure 45 : Evolution macroscopique du film polyester sur 12 mois ensemencé par <i>Phanerochaete chrysosporium</i> et <i>Trichoderma viride</i>	94
Figure 46 : Schématisation d'un repiquage microbien (exemple avec le milieu C3).....	99
Figure 47 : Milieu C3 témoin (a), ensemencé avec <i>P. chrysosporium</i> (b) et <i>T. viride</i> (c).....	100
Figure 48 : Milieu C4 témoin (a), ensemencé avec <i>P. chrysosporium</i> (b) et <i>T. viride</i> (c).....	100
Figure 49 : Evolution des signatures isotopiques <i>P. chrysosporium</i> sur le feutre.....	103
Figure 50 : Evolution des signatures isotopiques <i>T. viride</i> sur le feutre.....	104
Figure 51 : Photographies de films de paillage farine/polyester et polyester avec <i>P.</i> <i>chrysosporium</i> et <i>T. viride</i> précultivés dans les milieux C3 et C4.....	107
Figure 52 : Photographie montrant le développement du mycélium aux extrémités du film.....	109
Figure 53 : Photographie de la colonisation des néosac par <i>P. chrysosporium</i> (1 mois d'incubation).	114
Figure 54 : Photographie de la colonisation des néosac par <i>P. chrysosporium</i> (4 mois d'incubation).	115
Figure 55 : Evolution de la signature de la biomasse fongique dans une solution contenant une substance à activité biocide.	120
Figure 56 : Evolution macroscopique de la prolifération de <i>P. chrysosporium</i> sur L et L/b.....	122
Figure 57 : Evolution macroscopique de la prolifération de <i>T. viride</i> sur L et L/b.....	123
Figure 58 : Evolution des signatures isotopiques fongiques sur le feutre/biocide.....	124
Figure 59 : Descriptif d'une coupe transversale d'une tige de lin.....	126
Figure 60 : La colonisation de fibres végétales par <i>P. chrysosporium</i> (a : L ; b : LB).....	128
Figure 61 : Schéma d'une fibre végétale.....	129
Figure 62 : La séparation des tissus végétaux (a : <i>P. chrysosporium</i> ; b : <i>T. viride</i>).....	130
Figure 63 : Les polymères pariétaux végétaux.....	131
Figure 64 : La croissance apicale d'un hyphes.....	134
Figure 65 : Pénétration d'un hyphes par l'apex.....	137
Figure 66 : <i>Appressorium</i> (schématisé sur la gauche, de <i>T. viride</i> sur le feutre L à droite)... ..	138
Figure 67 : L'architecture tissée de la paroi végétale secondaire.....	140
Figure 68 : une baside Figure 69 : un asque.....	142
Figure 70 : Observations des films de paillage par ESEM (a : farine/polyester, b : polyester)	145
Figure 71 : Le film farine/polyester ensemencé par <i>P. chrysosporium</i>	146
Figure 72 : Le film farine/polyester ensemencé par <i>T. viride</i>	146
Figure 73 : Le film polyester ensemencé par <i>P. chrysosporium</i>	147
Figure 74 : Le film polyester ensemencé par <i>T. viride</i>	148
Figure 75 : La répartition agricole en France.....	185
Figure 76 : Les matières premières végétales utilisées dans la synthèse de tensioactifs.....	188
Figure 77: Schéma de purification du CO ₂	202
Figure 78 : Le banc de purification du CO ₂	203
Figure 79 : Schéma simplifié du fonctionnement de l'opéron xylose chez les bactéries gram -	210
Figure 80 : Schéma simplifié du fonctionnement de l'opéron xylose chez les bactéries gram +	211
Figure 81 : Schéma simplifié montrant la répression de l'opéron xyl par le glucose.....	212
Figure 82: 1 ^{ère} partie oxydative de la voie des pentoses-phosphates.....	213
Figure 83: 2 ^{ème} partie non oxydative de la voie des pentoses phosphates.....	214
Figure 84: Activation des acides gras.....	216
Figure 85: un cycle de β -oxydation.....	216

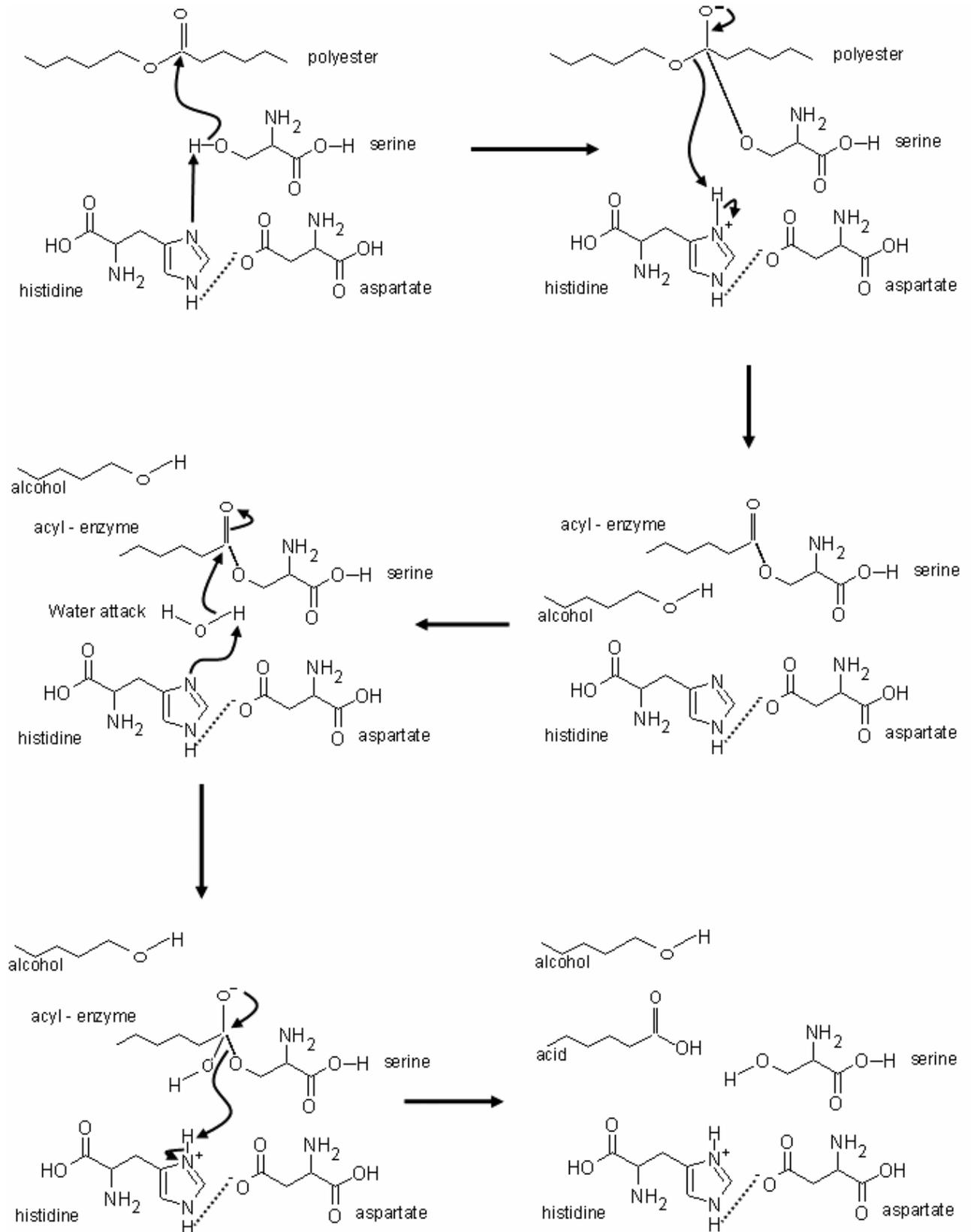
Liste des tableaux

Tableau 1 : Des hydrolases spécifiques.....	10
Tableau 2 : Principaux éléments constitutifs d'une cellule procaryote.....	19
Tableau 3 : Principaux éléments constitutifs d'un mycète.....	19
Tableau 4 : Les tests de biodégradabilité réalisés en laboratoire	23
Tableau 5 : Les tests de biodégradabilité en conditions de simulation	25
Tableau 6 : Les tests de biodégradabilité en conditions réelles	25
Tableau 7 : Les techniques d'évaluation de la biodégradabilité	27
Tableau 8 : Abondance naturelle des principaux atomes de la matière organique (fraction molaire)	31
Tableau 9 : Les rapports isotopiques des standards internationaux	31
Tableau 10 : Identification des milieux récepteurs pour chaque substrat d'étude	62
Tableau 11 : Choix du milieu de biodégradation	63
Tableau 12 : Les activités catalytiques pour différents micro-organismes	64
Tableau 13 : Différentes techniques permettant l'évaluation de la bioassimilation	67
Tableau 14: Des exemples de plantes C3, C4 et CAM	75
Tableau 15 : Les valeurs isotopiques supposées de nos différents substrats d'étude	76
Tableau 16 : Exemples de substrats pour le pré-marquage isotopique	79
Tableau 17 : Ensemencement à réaliser en fonction de la nature isotopique du substrat	79
Tableau 18 : $\delta^{13}\text{C}$ des glucoses	101
Tableau 19 : $\delta^{13}\text{C}$ de la flore fongique pré-adaptée	101
Tableau 20 : $\delta^{13}\text{C}$ du feutre végétal.....	102
Tableau 21 : $\delta^{13}\text{C}$ de la biomasse fongique au cours du temps (‰)	103
Tableau 22 : $\delta^{13}\text{C}$ des films de paillage.....	106
Tableau 23 : Les valeurs isotopiques de la biomasse fongique.....	107
Tableau 24 : Comparaison des valeurs isotopiques des deux espèces fongiques	111
Tableau 25 : Comparaison des valeurs isotopiques entre les deux types de préculture C3 et C4	112
Tableau 26 : $\delta^{13}\text{C}$ des néosacs.....	113
Tableau 27 : $\delta^{13}\text{C}$ de la biomasse fongique prélevé sur les néosacs	115
Tableau 28 : Comparaison des enrichissements isotopiques entre les différentes origines du mycélium.....	116
Tableau 29 : $\delta^{13}\text{C}$ de la substance biocide.....	119
Tableau 30 : $\delta^{13}\text{C}$ de la biomasse fongique prélevée dans la solution contenant la substance à activité biocide	119
Tableau 31 : $\delta^{13}\text{C}$ du feutre végétal/biocide.....	121
Tableau 32 : $\delta^{13}\text{C}$ de la biomasse fongique au cours du temps (‰)	124
Tableau 33 : Le stade de dégradation des fibres végétales	133
Tableau 34 : Observations de la dégradation de la matière végétale par ESEM	135
Tableau 35 : Le stade de dégradation de la matière végétale après 8 mois d'incubation	139
Tableau 36 : Statistiques agricoles des productions végétales en France pour l'année 2005	182
Tableau 37 : Situation et perspectives du développement des productions agricoles à usage non alimentaires	192

ANNEXES

Annexe 1: Fonctionnement de la triade catalytique d'une dépolymérase lors de l'hydrolyse d'un polyester.....	178
Annexe 2: Récapitulatif des différentes normes de tests de biodégradabilité en fonction de la nature du produit à tester et des conditions de dégradation	179
Annexe 3 : Les substrats issus d'une valorisation des agro-ressources	182
Annexe 4: La flore microbienne.....	193
Annexe 5 : Les techniques d'observation en microscopie photonique	200
Annexe 6: La purification du CO ₂	202
Annexe 7: Tableaux de valeurs du test de biodégradabilité (OCDE 301F) sur les résines époxydées	204
Annexe 8: Tableaux de valeurs du test de biodégradabilité (OCDE 301F) sur Fus X	207
Annexe 9: Etude de la bioassimilation théorique de Fus X	209
Annexe 10: Etude de l'écotoxicité de Fus X vis-à-vis des daphnies	217

Annexe 1: Fonctionnement de la triade catalytique d'une dépolymérase lors de l'hydrolyse d'un polyester.



Annexe 2: Récapitulatif des différentes normes de tests de biodégradabilité en fonction de la nature du produit à tester et des conditions de dégradation

Normes	Produits à tester	Milieu de dégradation	Flore
Tests de respirométrie en milieu aqueux			
OCDE 301 A OCDE 301 E ISO 7827 (1994) EN ISO 7827 (1995)	molécules	solution minérale	boues activées lixiviat de sol lixiviat de compost effluents secondaires eaux de surface
OCDE 301 B ISO 9439 (1999) EN ISO 9439 (2000)	molécules	solution minérale	boues activées lixiviat de sol lixiviat de compost effluents secondaires eaux de surface
ISO 14593 (1999)	molécules	solution minérale	boues activées lixiviat de sol lixiviat de compost effluents secondaires eaux de surface
OCDE 301 C	molécules	solution minérale	boues activées lixiviat de sol lixiviat de compost effluents secondaires eaux de surface
OCDE 301 D ISO 10707 (1994) EN ISO 10707 (1997)	molécules	solution minérale	boues activées lixiviat de sol lixiviat de compost effluents secondaires eaux de surface
ISO 10708 (1997)	molécules	solution minérale	boues activées lixiviat de sol lixiviat de compost effluents secondaires eaux de surface
OCDE 301 F ISO 9408 (1999) EN ISO 9408 (1999)	molécules	solution minérale	boues activées lixiviat de sol lixiviat de compost effluents secondaires eaux de surface
OCDE 302 A ISO 9887 (1992) EN ISO 9887 (1994)	molécules	solution minérale	boues activées lixiviat de sol lixiviat de compost effluents secondaires eaux de surface
OCDE 302 B ISO 9888 (1999)	molécules	solution minérale	boues activées lixiviat de sol

Normes	Produits à tester	Milieu de dégradation	Flore
EN ISO 9888 (1999)			lixiviat de compost effluents secondaires eaux de surface
OCDE 303 (2001) ISO 11733 (1995) EN ISO 11733 (1998)	molécules	solution minérale	boues activées
OCDE 306 (1992) ISO 16221 (2001)	molécules solubles	eau saline	intrinsèque
OCDE 309 (2001)	molécules	eaux de surface	intrinsèque
OCDE 310 (2002)	molécules	solution minérale	boues activées lixiviat de sol lixiviat de compost effluents secondaires eaux de surface
OCDE 311 (2002)	molécules	solution minérale	boues activées
ISO 10634 (1995) EN ISO 10634 (1995)	molécules faiblement solubles	solution minérale	
ASTM D 5210-92 (2000)	polymères	solution minérale	boues activées
ISO 14852 ASTM D 5209-92 (1994)	polymères	solution minérale	lixiviat compost
Tests de biodégradabilité en milieu complexe			
OCDE 304 (1981) OPPTS 835.3300 EPA 96-088 X 31-220 (1997) ISO 11266 DIN 53739	polymères matériaux	sol	intrinsèque
OCDE 307 (2000)	polymères matériaux	sol	intrinsèque
OCDE 308 (2000)	polymères matériaux	sédiments	intrinsèque
ISO 14 855 ASTM D 5338-92 (1994)	polymères matériaux	compost	intrinsèque
EN 13432 ASTM D 5509-96	matériaux plastiques	compost	intrinsèque

Colonisation de surface			
ASTM G21-96	polymères matériaux	-	champignons
ASTM G29-96	films plastiques	-	algues
EN ISO 846 - 1997	matériaux plastiques	-	micro-organismes
ISO 846 - 1997	matériaux plastiques		champignons, bactéries

Annexe 3 : Les substrats issus d'une valorisation des agro-ressources

La France dispose d'une biomasse agricole importante, valorisable en produits de substitution aux dérivés pétrochimiques, qui lui permettrait de tendre vers une indépendance dans les secteurs de l'énergie et de la chimie. Par ailleurs, la culture agricole permet une réduction des gaz à effet de serre par stockage du carbone. En cas d'émission atmosphérique, la quantité maximale de CO₂ rejetée est équivalente à celle utilisée pour la croissance végétale (photosynthèse), le bilan carbone est donc nul. Le troisième impact est la création d'emplois et de valeur ajoutée dans les domaines de l'agriculture, de l'industrie et de la recherche et développements.

A. Les agro-ressources disponibles en France

Les 55 millions d'hectares français sont répartis en 32 millions pour le domaine agricole (tableau 36), 15,5 pour les bois et forêts et 7,5 pour le territoire non agricole (sols bâtis, revêtus ou stabilisés artificiellement et espaces naturels – fleuves, lacs, glaciers, ...).

Tableau 36 : Statistiques agricoles des productions végétales en France pour l'année 2005 (Source Agreste)

	Superficie (hectares)	Production (tonnes)	Rendement (100 kg/ha)
CEREALES			
Blé tendre hiver	4 850 000	34 800 000	72
Blé tendre printemps	12 000	67 000	57
Blé dur hiver	416 000	2 000 000	48
Blé dur printemps	5 800	30 000	52
Seigle	31 450	149 000	47
Orge, escourgeon hiver	1 060 000	7 200 000	68
Orge, escourgeon printemps	545 000	3 200 000	58
Avoine hiver	62 500	300 000	47
Avoine printemps	48 800	210 000	43
Maïs grain	1 600 000	13 500 000	84
Maïs semence	48 000	168 000	35
Sorgho	51 000	264 000	52
Triticale	330 000	1 800 000	54

Autres céréales non mélangées	36 000	120 000	33
Mélanges	56 000	243 000	43
Riz	18 000	102 000	57
TOTAL	9 170 550	64 150 000	
OLEAGINEUX			
Colza hiver	1 200 000	4 500 000	37
Colza printemps	5 000	14 000	29
Tournesol	644 000	1 500 000	24
Soja	57 000	142 000	25
Lin oléagineux	12 000	24 500	21
Autres oléagineux	900	1 550	17
TOTAL	1 919 000	6 182 000	
PROTEAGINEUX			
Fèveroles et fèves	101 000	369 000	37
Pois protéagineux	316 000	1 300 000	42
Lupin doux	7 000	18 000	25
TOTAL	424 000	1 687 000	
SACCARIFERES ET AMYLACEES			
Betterave	380 000	31 000 000	818
Pomme de terre	158 000	6 650 000	421
TOTAL	538 000	37 650 000	
PLANTES FIBREUSES			
Chanvre (paille et graine)	9 000	63 000	70
Lin textile	78 000	556 000	71
Autres plantes textiles	137	589	43
TOTAL	87 000	620 000	
AUTRES CULTURES			
Tabac	8 000	23 000	28
Houblon	756	1 400	18
Chicorée	3 000	155 000	91
Autres cultures industrielles	2 000	-	
TOTAL	13 800	179 400	

PLANTES AROMATIQUES, MEDICINALES ET A PARFUMS			
		en Kg d'essence	
Lavande	4 700	55 000	12
Lavandin	15 000	890 000	60
Autres plantes aromatiques, médicinales et à parfum	7 000	-	
TOTAL	26 700	945 000	

Les cultures prépondérantes sont les céréales avec plus de 9 millions d'hectares, suivis par les oléagineux (environ 2 millions d'hectares cultivés). Le blé arrive en tête de la production végétale nationale suivi de près par la betterave et de loin par le maïs avec respectivement 35, 31 et 13 millions de tonnes brutes produites en 2005. Parmi les céréales, le blé, le maïs et l'orge sont les plus importants à la fois en superficie de culture et en production ; dans les oléagineux, ce sont le colza et le tournesol ; le pois et fèves/fèveroles pour les protéagineux et le lin textile devance le chanvre concernant les plantes fibreuses. Nous avons également quelques cultures singulières non négligeables puisque la chicorée rapporte 155 000 tonnes brutes pour seulement 3 000 hectares de superficie cultivée. Le meilleur rendement revient à la betterave avec 81 800 Kg/ha suivie de la pomme de terre à 42 100 Kg/ha alors que le blé, le maïs et l'orge ne sont qu'à 7 200, 8 400 et 6 800 Kg/ha.

La répartition nationale (figure 75) de ces cultures végétales génère une disparité des richesses agricoles régionales en fonction des reliefs (montagnes, coteaux), du climat, de la nature/structure du sol et certainement beaucoup d'autres facteurs (politiques, économiques, historiques, ...).

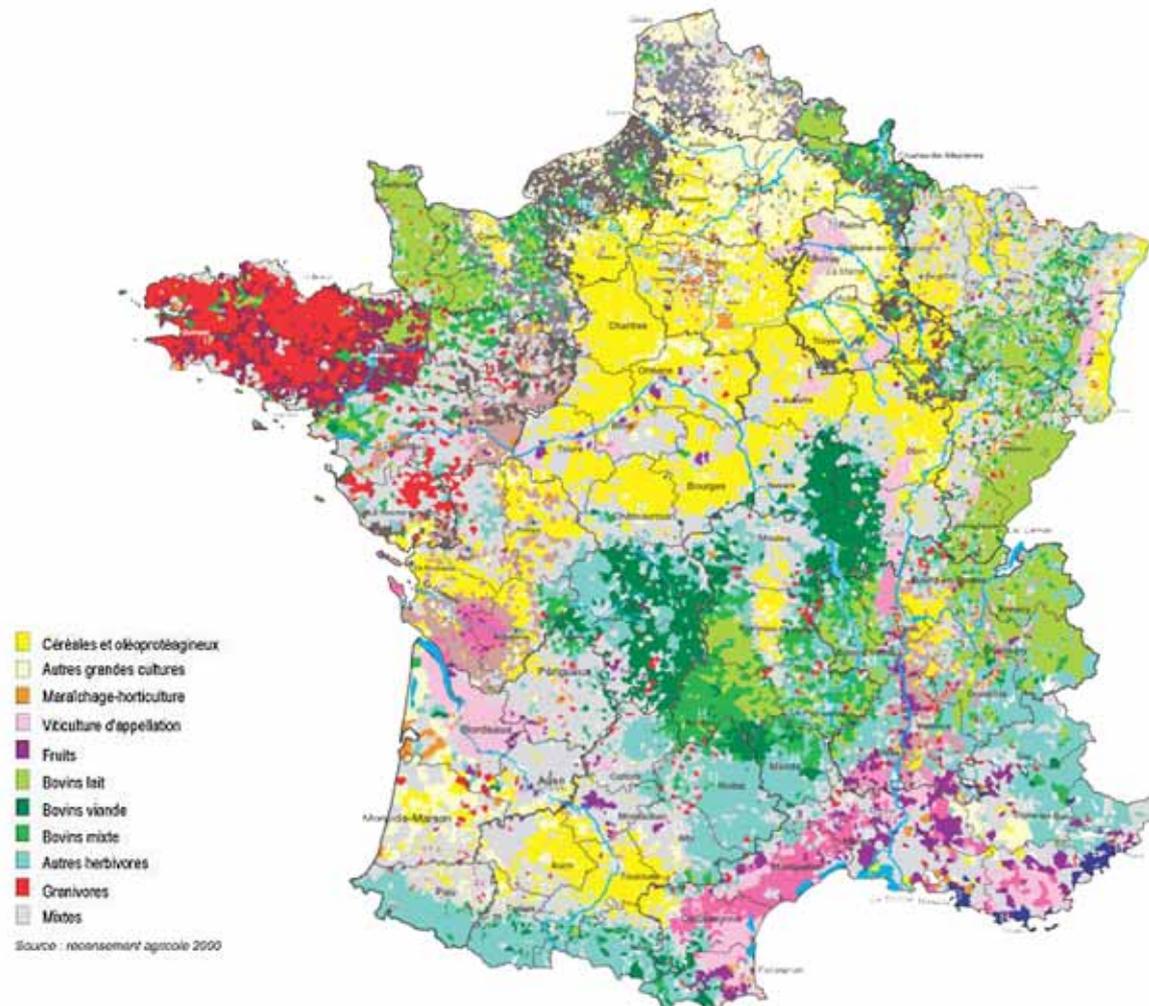


Figure 75 : La répartition agricole en France (Agreste)

Les céréales et oléagineux occupent plutôt le cœur de la France (Ile de France, Centre, Bourgogne partie est de la Normandie) avec une extension sur le Poitou et dans la région toulousaine. Les autres grandes cultures (betteraves, pommes de terre) sont surtout localisées sur le Nord, la Picardie et la Champagne – Ardenne. Le vignoble s'étend de la vallée du Rhône au pourtour méditerranéen sans oublier le bordelais, les coteaux d'Alsace et de Bourgogne, la Champagne et l'Anjou.

Si la diversité et l'abondance des agro-ressources relève principalement du "capital nature" de la France, la transformation et l'innovation impliquent la collaboration des différents acteurs du développement durable. La coopération des chercheurs, des industriels, des producteurs agricoles et des pouvoirs publics a abouti à la (re)naissance de **bioproduits**. La tâche n'est pas si simple, les produits substitutifs à leurs homologues pétrochimiques

doivent présenter des propriétés similaires, être compétitifs sur le marché et posséder des atouts environnementaux.

B. Transformation des agro-ressources

Appuyé par le gouvernement et géré par l'Ademe (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie), le programme Agrice (Agriculture pour la chimie et l'énergie) relatif à la valorisation des agro-ressources a été un succès dans différents secteurs. Par ailleurs, les exigences de la Directive Européenne REACH accélèrent les recherches afin de proposer rapidement des substituts aux produits devant disparaître.

❖ Les solvants

L'utilisation des solvants est règlementée par la directive européenne 99/13/CE relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dus à l'utilisation de solvants dans certaines activités et installations. Un composé organique volatil (COV) correspond à tout composé organique, à l'exclusion du méthane, ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15° Kelvin, auquel est imputé des risques pour la santé humaine, une contribution à la pollution photochimique, un impact sur la destruction de la couche d'ozone et sur l'effet de serre. Les solvants visés sont les substances chlorées, fluorées, certaines hydrocarbonées ou oxygénées. La France, à travers le protocole de Göteborg signé en 1999 s'engage à réduire ses émissions de COV non méthaniques de plus de 50% à l'horizon 2010 par rapport à la valeur de 1998.

Un solvant est un liquide qui a la propriété de dissoudre, de diluer ou d'extraire d'autres substances sans provoquer de modifications chimiques de ces substances et de lui-même. Trois classes d'agro-solvants présentent des caractéristiques techniques qui permettent de se substituer à leurs homologues pétrochimiques :

- L'éthanol et les terpènes : l'éthanol est obtenu par fermentation des sucres (betteraves, céréales). Les terpènes sont des hydrocarbures cycliques insaturés extraits du pin (α et β -pinène) ou des agrumes (d-limonène). L'éthanol et les terpènes sont des composés volatils soumis à la directive sur les émissions de COV. Les terpènes sont inflammables et étiquetés nocifs.
- Les esters d'huiles végétales sont obtenus par une réaction d'estérification entre un alcool (méthanol, éthanol) et un acide gras issu des huiles végétales (colza, soja, tournesol,

lin). Ces solvants sont non inflammables et la longueur de la chaîne de l'acide gras permet de diversifier les fonctionnalités.

- Les esters d'acides organiques fermentaires sont obtenus par une réaction d'estérification entre un alcool et un acide organique biosynthétisé (acétique, citrique, gluconique, lactique, ...). Ce sont des composés oxygénés polaires, miscibles à la plupart des solvants organiques et parfois à l'eau.

Les agrosolvants sont utilisés comme dégraissants (nettoyage des métaux, des textiles, ...), adjuvants et diluants (peintures, encres, vernis, colles, produits phytosanitaires), décapants (élimination des peintures, encres, vernis, colles).

❖ Les biolubrifiants

La collecte et l'élimination des huiles usagées sont soumises à la directive 75/439/CE, modifiée par la directive 87/101/CE qui précise que l'élimination comprend également le stockage et le dépôt sur et dans le sol. Les lubrifiants sont également soumis aux directives 99/45/CE et 01/58/CE relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses. En France, la récente loi d'orientation agricole du 22 décembre 2005 prévoit notamment d'interdire les lubrifiants d'origine pétrochimique substituables par des huiles végétales dans les zones sensibles à partir du 1^{er} janvier 2008.

Il existe trois catégories de biolubrifiants, issus, pour la production française, du colza et du tournesol mais également du recyclage des huiles alimentaires :

- Les huiles végétales brutes avec quelques additifs
- Les esters base végétale
- Les esters élaborés

En France, la production de biolubrifiants est d'environ 1000 tonnes pour un marché de 840 000 tonnes de lubrifiants. Le développement des biolubrifiants est focalisé sur certaines applications :

- les lubrifiants liés aux travaux forestiers et agricoles
- les lubrifiants d'équipements agroalimentaires
- les lubrifiants pour le décoffrage et le démoulage,
- les lubrifiants pour l'ensimage du textile
- additifs pour fluides de forage,
- lubrifiants hydrauliques et graisses en contact avec l'eau

- huiles isolantes pour transformateurs électriques

❖ Les tensioactifs

Le règlement 648/2004 relatif aux détergents qui est entré en vigueur en octobre 2005 simplifie la réglementation en remplaçant cinq directives auxquelles était soumis le tensioactif par une seule. Elle met l'accent sur la notion de biodégradation puisque les méthodes de mesures doivent se baser sur la biodégradabilité ultime (biodégradabilité finale du produit) et non primaire (biodégradabilité de la substance initiale). La complexité des molécules dégradées implique une transformation en produits intermédiaires, parfois plus toxiques que la substance initiale. L'exigence sur l'étiquetage est renforcée (informations sur le contenu des détergents et produit d'entretien, indiquer les composés susceptibles de provoquer des allergies).

Un tensioactif est une molécule amphiphile présentant une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Chacune de ces entités peut provenir de la valorisation des agro-ressources (figure 76).

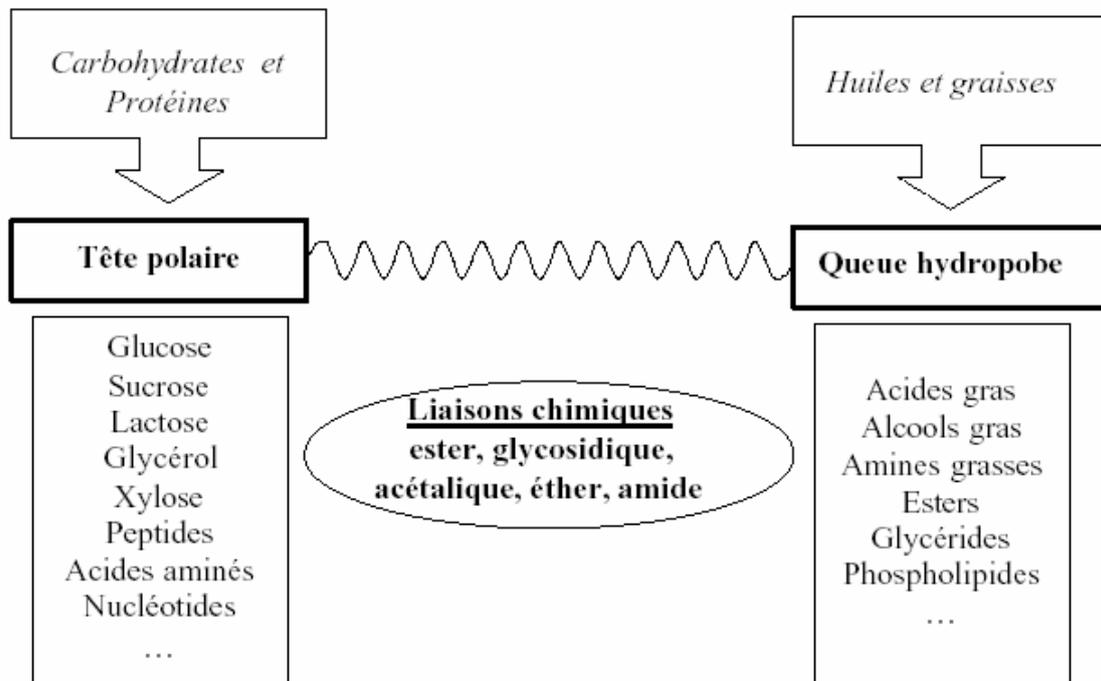


Figure 76 : Les matières premières végétales utilisées dans la synthèse de tensioactifs (Ademe, Tensioactifs et oléagineux, 2001)

Les tensioactifs ont pour rôle de diminuer la tension superficielle et ainsi de faciliter la mouillabilité d'un liquide, l'étalement sur une surface et la dispersion. La longueur de la chaîne lipophile leur confère des fonctionnalités différentes: émulsifiant (C₁₆-C₂₂), moussant (C₁₂-C₁₆), mouillant (C₈-C₁₂) ou détergent (C₈-C₁₂). Cette diversité fonctionnelle en fait un composant à large spectre d'application (cosmétiques, détergence, pharmacie,...).

La production de tensioactifs est encore à 70% d'origine pétrolière. Les 30% restants sont répartis en 25% à base végétale et 5% animale. Le marché des tensioactifs en France est estimé à 400 000 tonnes en 2002.

❖ Les agromatériaux

Un Plan bioproduit et biomatériaux est prévu afin de développer l'utilisation de matériaux, produits et dérivés chimiques renouvelables issus de la biomasse.

Sont regroupés sous le terme agromatériau, le bois-matériau en tant qu'élément de construction dans les structures (habitat, constructions industrielles...) et les agrocomposites.

Le terme agrocomposite est employé pour :

- un mélange de polymères synthétiques ou de matrices minérales et de biopolymères
- un mélange de fibres et de polymères naturels (amidon, cellulose)

Les biomatériaux sont issus de produits et de co-produits des céréales (amidon, gluten), des oléagineux, des protéagineux et des plantes fibreuses. Les différentes applications de ces biomatériaux rappellent une utilisation traditionnelle et régionale (paillage, torchis, chaume,...), engagent un développement dans un but de substitution de produits dangereux ou un appel à la créativité pour une fabrication innovante.

Le bois représente 10% du secteur de la construction d'habitations et de bâtiments. Un accord-cadre signé en 2001 entre huit ministères, l'Ademe et les professionnels du bois prend pour objectif d'augmenter la proportion du bois dans la construction de 10 à 12,5%. Les fibres végétales révèlent un important potentiel (isolation phonique et thermique, granules et bétons légers, revêtements...).

Dans l'industrie automobile, les fibres végétales sont employées pour la décoration intérieure des véhicules (lin, jute) et pour le renforcement des matières plastiques

(remplacement des fibres de verre ou de carbone dans les panneaux de portes, les placages de coffres...).

En France, l'industrie papetière a consommé 8,1 Mt de bois et 5,7 Mt de papiers/cartons de récupération et a produit 9,9 Mt de papiers/cartons. Le bois utilisé provient de bois d'éclaircies (75 %) et des déchets de scierie (25 %). Les autres matières fibreuses pouvant être utilisées pour fabriquer du papier et du carton (plantes annuelles comme la paille de céréales, le lin, le chanvre) ne représentent que 0,5 % de l'ensemble des matières fibreuses consommées. Le recyclage du papier nécessite l'incorporation de charges fournies principalement par l'amidon (maïs, blé et pomme de terre).

❖ Les biopolymères

La réglementation européenne (directive 94/62/CEE imposant de trouver des voies alternatives à la mise en décharge, interdite depuis 2002) a accéléré le développement et la commercialisation des polymères biodégradables. En France, la récente loi d'orientation agricole du 22 décembre 2005 prolonge la directive européenne sur les déchets plastiques en prévoyant, d'une part une interdiction des sacs plastiques de caisse d'ici 2010 et, d'autre part une future incorporation rendue obligatoire de biopolymères pour certains usages du plastique (imposition d'un taux d'incorporation croissant au fil des ans).

Il existe quatre familles de biopolymères :

- les biopolymères issus des plantes : polysaccharides tels que l'amidon (maïs, blé, pomme de terre), la cellulose ; les protéines issues des oléagineux (colza, tournesol, soja) ou des protéagineux (pois, fèves), du son des céréales (gluten), du tissu des animaux (collagène, gélatine, caséine) ; les lignines ; ...
- les biopolymères produits par polymérisation chimique qui associent l'utilisation de matière première renouvelable à des processus industriels de polymérisation : PLA (acide polylactique)
- les biopolymères produits par des micro-organismes génétiquement modifiés : PHA (polyhydroxyalcanoates), PHV (polyhydroxyvalérate), PHBV (polyhydroxybutyrate valérate)
- les polymères synthétiques : PVA (polyvinylalcool), BTA (butanediol terephthalate adipate)

Basée sur leur propriété de biodégradabilité, les applications de ces biopolymères sont des produits à usage unique ou à courte durée de vie :

- sacs de collecte des déchets verts et déchets organiques
- sacs de sortie de caisse
- produits de calage qui absorbent les chocs
- produits d'emballage ménager et de la restauration
- produits d'hygiène
- films pour paillage agricole et autres produits pour l'agriculture, l'horticulture, la forêt

C. Les bioproduits et les agro-ressources

Le tableau 37 montre les perspectives de production et de superficie pour les bioproduits à l'horizon 2010 sachant que ces chiffres peuvent évoluer en fonction des politiques gouvernementales. Il apparaît que la surface cultivée devra être multipliée par 2 en conservant la même productivité. Ce qui conduit à réfléchir sur différentes questions :

- disponibilité de cette superficie,
- compétition alimentaire/non alimentaire,
- amélioration de la productivité, notamment par la possibilité de cultures d'organismes génétiquement modifiés (OGM) et le débat public inhérent
- qualité agricole sur du moyen ou du long terme (épuisement de la fertilité)
- les pénuries engendrées par intensification de l'agriculture : eau, biodiversité (augmentation des parcelles, diminution de l'assolement, ...).

Tableau 37 : Situation et perspectives du développement des productions agricoles à usage non alimentaires (Rapport Desmarescaux, 1998)

	Situation 1997/1998		Perspectives 2010	
	Tonnage (T)	Surfaces (Ha)	Tonnage (T)	Surfaces (Ha)
Biocarburants				
EMHV	280 000	233 000		
ETBE	155 000	22 000		
Autres produits				
Total	435 000	255 000	500 000 à 1 000 000	300 000 à 600 000
Biolubrifiants				
Oléagineux	10 000	8 000	110 000	83 000
Solvants, intermédiaires				
Oléagineux			50 000	40 000
Céréales, betteraves	300 000	85 000	450 000	115 000
Total		85 000	500 000	155 000
Tensio-actifs				
Oléagineux (partie lipophile)			75 000	55 000
Autres (partie hydrophile)			25 000	5 000
Total			100 000	60 000
Acides aminés			1 000 000	300 000
Plantes à fibres				
Lin et chanvre		58 000		58 000
Polymères, matériaux				
Divers				10 000
Tabac				
Tabac		10 000		10 000
Pharmacie, plantes à parfum				
Lavande		17 000		17 000
Oeillette		7 000		7 000
Autres		5 000		13 000
Total		29 000		37 000
Amidon industriel				
céréales, pomme de terre		240 000		300 000
Biocombustibles				
Taillis courte rotation		1.000		10 000
Plantes annuelles				30 000
Autres				
Total		1 000		40 000
TOTAL GENERAL		686 000		1 350 000 à 1 650 000

Annexe 4: La flore microbienne

Un écosystème est un ensemble dynamique d'organismes vivants (biocénose) qui interagissent entre eux et avec le milieu (sol, climat, eau, lumière) dans lequel ils vivent (biotope). La biocénose est composée de 3 groupes écologiques fondamentaux : les producteurs, les consommateurs et les décomposeurs. Intégrant le groupe des décomposeurs, les micro-organismes assurent le renouvellement et l'approvisionnement des éléments minéraux (CO_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , ...) à partir de la matière organique qu'ils biodégradent. Invisibles à l'œil nu, les micro-organismes appartiennent à deux règnes : les monères et les mycètes, plus connus sous les termes de bactéries et champignons.

A. Les bactéries

1. Description

Les bactéries sont des organismes unicellulaires, procaryote c'est-à-dire qu'elles ne possèdent pas de membrane nucléaire, leur génome est disposé sur un double brin d'ADN libre dans le cytoplasme, délimité par une membrane semi-perméable. La membrane cytoplasmique joue un rôle fondamental dans les mécanismes de respiration et d'échanges chimiques avec le milieu extérieur. C'est une barrière qui empêche la fuite de composés intracellulaires et contrôle la pénétration de composés extracellulaires. Le franchissement des éléments nutritifs est soit passif, soit actif avec l'intervention de protéines de transport, appelées **perméases**, présentes au niveau de la membrane plasmique. Sur la face extérieure de la membrane plasmique, une paroi plus ou moins épaisse en fonction du groupe bactérien (Gram +, gram -) protège la cellule. Elle est traversée de cils et de flagelle(s) offrant une capacité de déplacement aux bactéries dites mobiles. Dernière couche externe, la capsule ou couche muqueuse assure une protection supplémentaire contre les agressions extérieures (dessiccation, prédateurs, ...).

2. Exigences métaboliques

Pour les synthèses moléculaires, la machinerie cellulaire nécessite une source d'énergie, apportée par la lumière (phototrophie) ou par des réactions d'oxydoréduction (chimiotrophie), une source de carbone fournie par le dioxyde de carbone atmosphérique ou dissous (autotrophie) ou des composés organiques déjà synthétisés (hétérotrophie) et une source d'électrons issue de molécules minérales (litotrophie) ou organique (organotrophie). Les bactéries sont des organismes aux exigences variées : présence d'oxygène (aérobies) ou

absence (anaérobies) ; température ambiante (mésophiles), basses températures (psychrophiles), hautes températures (thermophiles) ; pH neutre (neutrophiles), acide (acidophiles) ou alcalin (alcalinophiles) ; dépendant d'un facteur de croissance (auxotrophes) ou non (prototrophes).

3. Leurs capacités catalytiques

Les bactéries participent aux différents cycles biogéochimiques par leurs activités de dégradation, de transformation et de solubilisation engendrant la décomposition de la matière organique en nutriments disponibles pour les producteurs et les consommateurs. Dotées d'une capacité d'adaptation, elles peuvent résorber une pollution accidentelle de molécules xénobiotiques (pesticides, hydrocarbures).

La matière organique carbonée est transformée par différents groupes écologiques (Dommergues et Mangenot, 1970) : amylolytiques, pectinolytiques, hémicellulolytiques, cellulolytiques aérobies et cellulolytiques anaérobies. Les substances solubles et de faible masse moléculaire sont consommées les premières et rapidement minéralisées par une flore variée. Les polysaccharides plus complexes (hémicelluloses et cellulose) sont dégradés par une flore spécialisée (*Vibrio*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, ...) (Béguin and Aubert, 1994) qui nécessite un équipement enzymatique plus performant (complexe enzymatique). Les bactéries sont incompétentes sur la fragmentation des lignines mais peuvent assurer, sur des dimères phénoliques, une ouverture du cycle aromatique de façon intracellulaire (*Micrococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, ...).

Le cycle de l'azote est entretenu par les groupes des fixateurs d'azote ($N_2 \rightarrow NH_4^+$, *Azotobacter*, *Clostridium* de façon non symbiotique, *Rhizobium*, *Frankia*, en symbiose), des protéolytiques (dégradation des protéines en peptides puis en acides aminés), des ammonificateurs (azote organique $\rightarrow NH_4^+$, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Flavobacter*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*), des nitrificateurs ($NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$, *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrobacter*) et des dénitrificateurs ($NO_3^- \rightarrow N_2$, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*). Son rôle est de garantir un équilibre azoté et des nutriments accessibles aux plantes.

Le soufre entre dans la composition des protéines (méthionine, cystéine), des vitamines (thiamine, biotine) et d'autres composés organiques (glutathion, co-enzyme A, ferrédoxines, sulfates, glucosinolates des Crucifères, ...). Le cycle du soufre est assuré par les

groupes des sulfato-réducteurs ($\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$, *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*), des sulfoxydants ($\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$, *Thiobacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, ...) et des minéralisateurs de soufre organique (soufre organique $\rightarrow \text{H}_2\text{S}$, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, ...).

Le phosphore constitue un élément indispensable à la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN), des transporteurs d'énergie (ATP, ADP, AMP) et d'autres molécules organiques (phospholipides, sucres phosphatés, ...). Il participe activement au métabolisme et à l'activation de certaines enzymes (cascades enzymatiques). Absent dans l'atmosphère, le phosphore se présente sous formes organique et minérale insolubles. Les bactéries participent à ces deux tâches, *Bacillus*, *Serratia*, *Proteus*, *Arthrobacter* pour la première et *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* pour la seconde (Pelmont, 1993).

Les bactéries contribuent au cycle du fer par des réactions d'oxydo-réduction (*Thiobacillus*, *Ferrobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Aerobacter*), par la synthèse et biodégradation de substances complexantes (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*), et par sa précipitation (les sulfato-réducteurs et les minéralisateurs de soufre organique car le soufre réagit avec le fer pour former des sulfures de fer).

Certaines bactéries sont capables d'utiliser des composés xénobiotiques, en particulier des pesticides comme seule source de carbone et d'azote (Davet, 1996). Des études réalisées sur les activités catalytiques d'actinomycètes (*Microbispora fusca*, *Microbispora rosea* et *Streptomyces thermocarboxydus*) ont révélées leur potentiel de biodégradation sur certains polyesters naturels (PHBV) et synthétiques (BTA, PCL, PTMS) (Jarerat and Tokiwa, 2001 Kleeberg *et al.*, 1998).

B. Les champignons

1. Description

Les champignons se caractérisent par la présence d'un thalle, formé uniquement de filaments appelés **filaments mycéliens** ou **hyphes** et dont l'ensemble constitue le **mycélium**. Les filaments sont des tubes constitués de parois chitineuses qui protègent la masse cytoplasmique mobile contenant de nombreux noyaux (cénocytique). Le cytoplasme est parcouru par des **courants cytoplasmiques** dirigés vers la zone apicale. Ce flux assure un apport de nutriments et probablement d'hormones vers les parties en croissance (*apex*). Contrairement aux

bactéries qui peuvent disposer de flagelles, les champignons sont incapables de se déplacer à cause de la rigidité des parois des hyphes. Leur développement sur un substrat solide conduit rapidement à un mycélium macroscopique généralement visible.

2. Exigences métaboliques

Les champignons, dépourvus de pigments chlorophylliens, sont incapables d'effectuer la photosynthèse donc tirent leur énergie de l'oxydation de substrats organiques. Ils sont **hétérotrophes**. La panoplie enzymatique des champignons est extrêmement riche et leur permet d'utiliser, plus efficacement que les bactéries, les substrats les plus complexes : cellulose, lignine, kératine, acides humiques, ... Aérobie et mésophile pour la plupart, les champignons ont besoin d'humidité pour se développer. Ils supportent assez bien les pH faibles et deviennent plus efficaces que les bactéries sur les sols acides. Toutefois, ils ne sont pas considérés comme acidophiles car ce n'est pas dans les sols acides que l'on dénombre le plus de champignons. Ils semblent pouvoir se développer sur une gamme de pH assez large.

3. Leurs capacités catalytiques

Les mycètes sont subdivisés en trois groupes :

✓ Les zygomycètes

Les zygomycètes possèdent un mycélium sans cloison transversale, seules les extrémités en croissance conservent un contenu vivant. Ils se nourrissent des débris animaux, végétaux ou d'humus, sont adaptés à l'habitat terrestre mais préfèrent cependant les milieux riches en eau qui facilitent la dispersion de leurs spores. Leur équipement enzymatique réduit exige qu'ils disposent, pour se développer, d'azote organique facilement assimilable et de glucides simples, bien que certaines espèces attaquent l'amidon et les hémicelluloses. Ils sont présents sur les déjections de certains animaux (rongeurs, équidés, cervidés) et dans les sols recevant de la matière organique fraîche : horizons superficiels des forêts, des prairies, des steppes, dans les tourbières et les marécages pendant la saison estivale. Ils sont moins nombreux dans les sols cultivés où la matière organique est moins abondante et se dégrade plus rapidement suite à des travaux mécaniques répétés.

✓ Les ascomycètes

Les ascomycètes possèdent un mycélium septé dont les cloisons transversales sont munies d'un pore central permettant la communication.

Les *Chaetomium*, cellulolytiques actifs, facilement isolables sur milieu au papier, sont très répandus dans les sols riches en azote facilement assimilable, organique ou minéral, et en cellulose. Ils semblent être parmi les premiers colonisateurs des débris des graminées et sont rencontrés surtout sous végétation herbacée (steppe), sous jachère et dans les sols cultivés, dans les régions tempérées comme sous les tropiques.

Les *Penicillium* sont les champignons les plus fréquemment signalés dans tous types de sols. Certains sont producteurs d'antibiotiques alors que d'autres synthétisent des substances toxiques pour les végétaux, mais dotés d'activités humificatrice et minéralisatrice. Ils sont capables d'utiliser, outre les monosaccharides et disaccharides, l'amidon et la cellulose pour certaines espèces. Ils peuvent emprunter l'azote aux sels minéraux et même à certaines formes complexes tels que les acides humiques.

Les espèces d'*Aspergillus* les plus communes rencontrés dans les sols sont : *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus* et *A. niger*. Quelques uns possèdent l'équipement enzymatique spécialisé leur permettant d'attaquer certaines substances complexes comme les tanins.

Les *Fusarium*, capables de se comporter en parasites des végétaux supérieurs, se développent sur les matières organiques incomplètement humifiées. Bon nombre d'entre eux sont doués d'une grande activité cellulolytique. *F. culmorum* serait le premier colonisateur des pailles de blé. On les trouve parfois en abondance dans la rhizosphère des plantes cultivées et dans les organes herbacés en décomposition. Ils sont plus fréquents dans les prairies et dans les sols cultivés que dans les forêts.

Les *Trichoderma* sont des champignons à croissance rapide. Ils sont présents dans les sols riches en matière organique relativement décomposée et résistante. Ils sont capables de vivre en association avec les basidiomycètes lignivores. Par contre, la salinité des sols entraîne leur disparition.

✓ Les basidiomycètes

Les basidiomycètes comprennent de nombreuses espèces cellulolytiques (Rhizoctones, champignons des litières, bois pourris et autres débris végétaux). Les basidiomycètes décomposeurs de litières se trouvent parmi l'ordre des *agaricales* qui comprend les familles des *Agaricaceae* (*Agaricus*), des *Bolbitiaceae* (*Agrocybe*), des *Coprinaceae* (*Coprinus*), des *Strophariaceae* (*Stropharia*), des *Tricholomataceae* (*Clitocybe*, *Collybia*, *Lepista*,

Marasmius, *Mycena*). Le genre *Pleurotus* est impliqué dans la décomposition du bois. Dès que l'on s'intéresse à la dégradation de la lignocellulose par des champignons, la littérature ne les classe plus en Zygomycètes/Ascomycètes/Basidiomycètes mais opère une classification différente en fonction des substrats qu'ils dégradent.

En effet, la majorité des mycètes sont des saprophytes impliqués dans le recyclage du bois et autres matières végétales. Certains sont très efficaces pour la dégradation de la cellulose et de la lignine car ils produisent et exportent vers le milieu extracellulaire de nombreuses enzymes dont des glucanases (enzymes qui hydrolysent la cellulose) (Wang N.S.), des amylases (enzymes qui hydrolysent l'amidon, principale réserve des plantes), des hémicellulases (pour les hémicelluloses, polymères variés à base de xylose ou de mannose) (Howard *et al.*, 2003) et divers systèmes catalytiques impliqués dans la dégradation de la lignine (Otsuka *et al.*, 2003). Il existe une seconde classification, en fonction des substrats préférentiels :

- Les **pourritures molles** (soft-rot fungi, SRF) sont dues à des populations comprenant notamment des ascomycètes (*Chaetomium*, *Xylaria*, *Hypoxylon*). Elles décomposent progressivement des fractions glucidiques. La lignine ainsi libérée subit une lente altération et le matériel végétal se transforme partiellement en une masse noirâtre et inorganisée mais les pertes de masse restent faibles.
- Les **pourritures brunes** (brown-rot fungi, BRF) sont dues à certains basidiomycètes. Les polysides pariétaux sont rapidement dégradés alors que la lignine subit des altérations partielles. Les parois végétales perdent leur structure et sont réduites en une substance amorphe. La lignine non détruite par le champignon donne à la matière en décomposition sa coloration brune typique.
- Les **pourritures blanches** (white-rot fungi, WRF) sont dues à quelques ascomycètes et surtout à des basidiomycètes. La pourriture blanche est provoquée par une dégradation des trois composés principaux des parois végétales (la lignine, les hémicelluloses et la cellulose). La dégradation est toutefois plus marquée pour la lignine. La cellulose restante donne à la matière décomposée sa couleur typique blanchâtre et son aspect fibreux.

Les champignons de la pourriture blanche forment un groupe particulier de basidiomycètes qui assure, dans la nature, la dépolymérisation et la minéralisation de la

lignine (ligninolyse) et permet ainsi la destructuration des fibres végétales. Ils sont actuellement très étudiés en raison de plusieurs applications, dont certaines sont utilisées par l'industrie :

- *mise en place de procédés propres et économiques dans l'industrie papetière* : le traitement des pâtes améliore la qualité du papier (résistance), diminue le coût énergétique de production et permet le blanchiment du papier en minimisant la consommation de chlore. Le système ligninolytique intervient également dans la décoloration des effluents de papeterie ;

- *bioconversion et production de molécules à haute valeur ajoutée d'intérêts agro-alimentaire et pharmaceutique* : les organismes vivants ou leurs enzymes purifiées sont utilisées pour la production de composés à valeur ajoutée importante comme la vanilline, le phénol, le méthanol. D'autre part, certains métabolites issus de la dégradation de la lignine ont des propriétés antibactériennes ;

- *environnement* : les champignons de la pourriture blanche sont étudiés pour la dépollution des effluents liquides et des sols renfermant des polluants organiques ; ils sont d'une grande richesse enzymatique, produisant à la fois des systèmes extracellulaires peu spécifiques et à fort pouvoir oxydant (les radicaux libres) et des systèmes intracellulaires impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques. Cette richesse enzymatique permet à ces champignons d'assurer un grand nombre de réactions chimiques (oxydation, réduction, hydrolyse et synthèse) sur des xénobiotiques, polluants de structures chimiques différentes et présentant des propriétés physico-chimiques (polarité, lipophilie, etc.) variées. Les enzymes agissent soit sur les polluants dissous dans l'eau du sol, soit sur les polluants adsorbés sur la fraction solide du sol. Le mycélium fongique constitue un piège dans lequel les polluants s'accumulent, y compris les plus volatiles d'entre eux présents dans la phase gazeuse du sol. Ils deviennent alors des substrats potentiels pour les enzymes intracellulaires.

- *biotraitement et valorisation des matériaux lignocellulosiques* : la biodégradation des résidus ligno-cellulosiques améliore la digestibilité et la valeur nutritive de substrats utilisés pour l'alimentation des ruminants. La cellulose libérée de la lignine permet aussi une production facilitée de biogaz.

Annexe 5 : Les techniques d'observation en microscopie photonique

- En fond clair : technique la plus usuelle, elle est adaptée pour des échantillons qui possèdent intrinsèquement un fort contraste. Afin de mieux visualiser certaines structures, des colorations spécifiques peuvent être utiles. A titre d'exemple, le rouge nil colore les lipides, donc des compartiments différenciés riches en lipides au niveau de leurs membranes ou de leurs substances de réserves.
- En fond noir : les rayons lumineux provenant du condenseur ne pénètrent plus directement dans l'objectif, un ensemble de miroirs concaves les oriente vers l'échantillon. Seule la lumière diffusée par l'échantillon atteint l'objectif et sert à former l'image. Les parties de l'échantillon qui ne diffusent pas de lumière d'éclairage apparaissent sombres, et inversement.
- En lumière polarisée : elle permet l'examen des milieux biréfringents. L'équipement nécessite deux filtres de polarisation (un polariseur et un analyseur). Le polariseur oriente la lumière dans une direction (plan de polarisation). Si les deux filtres sont orientés dans le même sens, le champ de vision est lumineux alors que s'ils sont croisés à angle droit le champ devient sombre. Dans la microscopie avec lumière polarisée les filtres de polarisation sont généralement croisés. En l'absence de préparation sur la platine, le fond est noir ; les structures déviant le plan de polarisation apparaissent claires sur fond noir.
- En contraste de phase : des structures biologiques non colorées (pas d'absorption des différentes radiations de la lumière blanche) ou très fines (l'intensité du flux lumineux incident traversant l'objet n'est pas modifiée de façon significative) présentent peu de contraste naturellement et sont difficilement discernables par notre œil. Un artifice optique (déphasage) sur l'onde d'éclairage peut être utilisé. Un condenseur à diaphragme annulaire remplace le diaphragme d'ouverture et laisse passer un cône creux de lumière vers l'échantillon. Un anneau de phase permet une importante atténuation et un retard de phase de la lumière. La condition essentielle pour obtenir un bon contraste de phase est que le déphasage par rapport à la longueur d'onde de la lumière soit très faible (faible épaisseur des détails à observer e/ou différence minime entre les indices de réfraction).
- En contraste interférentiel : il est utilisé pour l'observation des échantillons non colorés. Un polariseur placé juste après la source lumineuse fournit une lumière polarisée

linéairement. Le rayon lumineux polarisé est divisé en deux rayons de même longueur d'onde, mais polarisés orthogonalement et séparés spatialement d'une distance très courte (une fraction de la longueur d'onde). La séparation en deux rayons est réalisée par un assemblage particulier de deux cristaux biréfringents. Bien que très proches dans l'espace, ces deux rayons (nommés respectivement ordinaire et extraordinaire) peuvent être différemment retardés lors de la traversée de l'échantillon, en particulier si l'indice de réfraction ou l'épaisseur varie fortement. Suivant la différence de phase entre les rayons, un contraste positif ou négatif sera créé révélant ainsi les structures cellulaires. Sur ce microscope, le second système biréfringent servant à réunir ces deux faisceaux est un prisme de Nomarsky.

- En épifluorescence : elle permet d'examiner des préparations qui sont naturellement fluorescentes ou qui ont été imprégnées par des fluorochromes. L'échantillon est soumis à une radiation ultraviolette (une lampe à vapeur de mercure entourée d'un miroir collecteur et d'une lentille collectrice pour récupérer le maximum de lumière d'excitation). Un filtre d'excitation permet d'envoyer une bande passante étroite sur l'échantillon et un filtre anticalorique coupe les extrémités du spectre d'émission de la source (dans l'UV et dans l'IR) limitant ainsi l'échauffement du filtre d'excitation et surtout la déshydratation de l'échantillon. Un miroir semi-réfléchissant dirige la lumière d'excitation, à travers l'objectif, sur la préparation. La fluorescence émise est collectée par l'objectif et va traverser le miroir dichroïque. Un filtre d'arrêt permet de sélectionner la longueur d'onde d'émission du fluorochrome. Les tissus végétaux contiennent de nombreuses substances fluorescentes (chlorophylle dans les chloroplastes, phénols dans les vacuoles et tissus végétaux lignifiés, subérisés et cutinisés).

Annexe 6: La purification du CO₂

Une pompe en début de circuit permet de faire le vide. Le schéma est présenté sur la figure 77 et illustré par la figure 78.

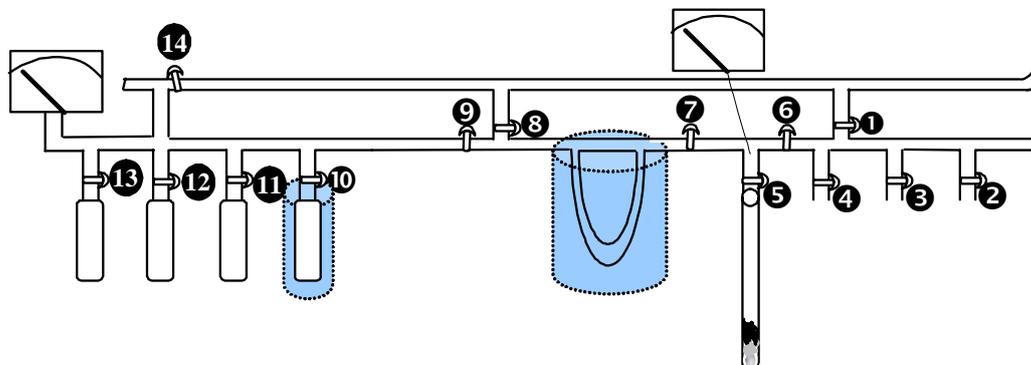


Figure 77: Schéma de purification du CO₂

La purification du CO₂ se déroule selon les étapes suivantes :

- 1 Le porte-échantillon est isolé du circuit (vannes 6 et 7 fermées), le tube contenant le CO₂ à analyser est placé sur le porte-échantillon.
- 2 Le vide d'air est réalisé dans la partie du porte-échantillon (ouverture des vannes 6 et 1).
- 3 La température de solidification du CO₂ étant de -180°C, un thermos contenant de l'azote liquide est placé autour de l'anneau de purification.
- 4 Fermer la sortie vers la pompe (vannes 6 et 1), vérifier la température de -180°C de l'anneau de purification et casser le tube contenant l'échantillon. Le gaz s'échappe, vérifier l'augmentation de la pression au manomètre.
- 5 Vérifier la fermeture des vannes 8 et 9, ouvrir la vanne 7, le CO₂ entre dans l'anneau de purification et doit se solidifier (présence d'un anneau blanc). La présence de gaz autres que le CO₂ empêche la diminution de la pression, ces gaz sont appelés incondensables et s'échappent grâce à l'ouverture de la vanne 8.
- 6 La vanne 8 fermée, le CO₂ doit retrouver sa forme gazeuse à température ambiante. Une résistance autour de l'anneau de purification permet une transformation plus rapide.
- 7 Le thermos d'azote liquide est placé autour de l'ampoule de récupération. Les vannes 9 et 10 ouvertes, le CO₂ gazeux vient se solidifier dans l'ampoule de récupération. Un manomètre permet de voir le passage du gaz. Après fermeture de l'accès à l'ampoule de récupération, le thermos est ôté de l'ampoule et le circuit est ouvert pour faire le vide.



Figure 78 : Le banc de purification du CO₂ (a : les ampoule de récupération. b : le banc. c : les porte-échantillons)

Annexe 7: Tableaux de valeurs du test de biodégradabilité (OCDE 301F) sur les résines époxydées**1. Produit de référence : acétate de sodium**

Tableau de résultats : produit de référence		Temps en jours														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Consommation d'O ₂ par le produit de référence testé (mg/l)	a ₁	2	40	43	48	56	58	61	61	61	62	62	62	62	62	
	a ₂	5	43	47	53	60	63	65	66	66	67	67	67	68	68	
Consommation d'O ₂ par le témoin (mg/l)	b ₁	6	7	7	7	9	9	11	11	11	12	12	13	15	16	
	b ₂	7	7	7	7	7	8	9	9	9	10	10	10	11	12	
	bm moy	6,5	7	7	7	8	8,5	10	10	10	11	11	11,5	13	14	
Consommation d'O ₂ corrigée (mg/l)	(a1-bm)	-4,5	33	36	41	48	49,5	51	51	51	51	51	50,5	49	48	
	(a2-bm)	-1,5	36	40	46	52	54,5	55	56	56	56	56	55,5	55	54	
DBO (mgO ₂ /mg produit de référence)	DBO1(a1)	-0,05	0,39	0,42	0,48	0,56	0,58	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,59	0,57	0,56	
	DBO ₂ (a ₂)	-0,02	0,42	0,47	0,54	0,61	0,64	0,64	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,64	0,63	
% dégradation D : DBO/DThO	D1(a1)	-7%	49%	54%	61%	72%	74%	76%	76%	76%	76%	76%	76%	73%	72%	
	D2(a2)	-2%	54%	60%	69%	78%	82%	82%	84%	84%	84%	84%	84%	83%	82%	81%
	moy.*	-4%	52%	57%	65%	75%	78%	79%	80%	80%	80%	80%	80%	79%	78%	76%

* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre D₁ et D₂

Tableau de résultats : produit de référence		Temps en jours												
		15	16	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Consommation d'O ₂ par le produit de référence testé (mg/l)	a ₁	62	62	63	64	65	65	65	65	65	65	65	65	65
	a ₂	69	69	70	71	72	72	73	73	73	73	74	74	
Consommation d'O ₂ par le témoin (mg/l)	b ₁	18	18	20	21	22	22	23	23	24	25	26	26	
	b ₂	14	15	16	17	18	18	19	19	19	20	20	20	
	bm moy	16	16,5	18	19	20	20	21	21	21,5	22,5	23	23	
Consommation d'O ₂ corrigée (mg/l)	(a1-bm)	46	45,5	45	45	45	45	44	44	43,5	42,5	42	42	
	(a2-bm)	53	52,5	52	52	52	52	52	52	51,5	50,5	51	51	
DBO (mgO ₂ /mg produit de référence)	DBO1(a1)	0,54	0,53	0,53	0,53	0,53	0,53	0,51	0,51	0,51	0,50	0,49	0,49	
	DBO ₂ (a ₂)	0,62	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,60	0,59	0,60	0,60	
% dégradation D : DBO/DThO	D1(a1)	69%	68%	67%	67%	67%	67%	66%	66%	65%	64%	63%	63%	
	D2(a2)	79%	79%	78%	78%	78%	78%	78%	78%	77%	76%	76%	76%	
	moy.*	74%	73%	73%	73%	73%	73%	73%	72%	72%	71%	70%	70%	

* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre D₁ et D₂

2. Substances d'essai :

Tableau de résultats : résine base lin		Temps en jours													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consommation d'O ₂ par la substance d'essai testée (mg/l)	a ₁	5	7	7	7	8	8	9	9	9	9	9	9	9	10
	a ₂	4	5	5	5	5	6	7	7	7	7	7	7	7	7
Consommation d'O ₂ par le témoin (mg/l)	b ₁	6	7	7	7	9	9	11	11	11	12	12	13	15	16
	b ₂	7	7	7	7	7	8	9	9	9	10	10	10	11	12
	bm moy	6,5	7	7	7	8	8,5	10	10	10	11	11	11,5	13	14
Consommation d'O ₂ corrigée (mg/l)	(a ₁ -bm)	-1,5	0	0	0	0	-0,5	-1	-1	-1	-2	-2	-2,5	-4	-4
	(a ₂ -bm)	-2,5	-2	-2	-2	-3	-2,5	-3	-3	-3	-4	-4	-4,5	-6	-7
DBO (mgO ₂ /mg p substance d'essai)	DBO ₁ (a ₁)	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,01	-0,02	-0,02	-0,02	-0,04	-0,04
	DBO ₂ (a ₂)	-0,04	-0,03	-0,03	-0,03	-0,05	-0,04	-0,05	-0,05	-0,05	-0,06	-0,06	-0,07	-0,09	-0,11
% dégradation D : DBO/DThO	D ₁ (a ₁)	-1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-1%	-1%	-1%	-2%	-2%
	D ₂ (a ₂)	-2%	-1%	-1%	-1%	-2%	-2%	-2%	-2%	-2%	-3%	-3%	-3%	-4%	-4%
	moy.*	-1%	-1%	-1%	-1%	-1%	-1%	-1%	-1%	-1%	-1%	-2%	-2%	-2%	-3%

* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre D₁ et D₂

Tableau de résultats : résine base lin		Temps en jours											
		15	16	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Consommation d'O ₂ par la substance d'essai testée (mg/l)	a ₁	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	a ₂	8	9	9	11	12	12	12	12	13	14	15	16
Consommation d'O ₂ par le témoin (mg/l)	b ₁	18	18	20	21	22	22	23	23	24	25	26	26
	b ₂	14	15	16	17	18	18	19	19	19	20	20	20
	bm moy	16	16,5	18	19	20	20	21	21	21,5	22,5	23	23
Consommation d'O ₂ corrigée (mg/l)	(a ₁ -bm)	-5	-5,5	-7	-8	-9	-9	-10	-10	-10,5	-11,5	-12	-12
	(a ₂ -bm)	-8	-7,5	-9	-8	-8	-8	-9	-9	-8,5	-8,5	-8	-7
DBO (mgO ₂ /mg p substance d'essai)	DBO ₁ (a ₁)	-0,05	-0,05	-0,06	-0,07	-0,08	-0,08	-0,09	-0,09	-0,10	-0,11	-0,11	-0,11
	DBO ₂ (a ₂)	-0,13	-0,12	-0,14	-0,13	-0,13	-0,13	-0,14	-0,14	-0,13	-0,13	-0,13	-0,11
% dégradation D : DBO/DThO	D ₁ (a ₁)	-2%	-2%	-3%	-3%	-3%	-3%	-4%	-4%	-4%	-4%	-5%	-5%
	D ₂ (a ₂)	-5%	-5%	-6%	-5%	-5%	-5%	-6%	-6%	-5%	-5%	-5%	-4%
	moy.*	-3%	-3%	-4%	-4%	-4%	-4%	-4%	-5%	-5%	-5%	-5%	-4%

* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre D₁ et D₂

Tableau de résultats : résine base colza		Temps en jours													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consommation d'O ₂ par la substance d'essai testée (mg/l)	a ₁	4	6	6	6	7	7	7	8	8	8	8	8	8	
	a ₂	3	6	6	6	7	8	10	10	10	10	11	11	12	13
Consommation d'O ₂ par le témoin (mg/l)	b ₁	6	7	7	7	9	9	11	11	11	12	12	13	15	16
	b ₂	7	7	7	7	7	8	9	9	9	10	10	10	11	12
	bm moy	6,5	7	7	7	8	8,5	10	10	10	11	11	11,5	13	14
Consommation d'O ₂ corrigée (mg/l)	(a ₁ -bm)	-2,5	-1	-1	-1	-1	-1,5	-3	-2	-2	-3	-3	-3,5	-5	-6
	(a ₂ -bm)	-3,5	-1	-1	-1	-1	-0,5	0	0	0	-1	0	-0,5	-1	-1
DBO (mgO ₂ /mg substance d'essai)	DBO ₁ (a ₁)	-0,02	-0,01	0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,03	-0,02	-0,02	-0,03	-0,03	-0,03	-0,05	-0,06
	DBO ₂ (a ₂)	-0,06	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,01	0	0	0	-0,02	0	-0,01	-0,02	-0,02
% dégradation D : DBO/DThO	D ₁ (a ₁)	-1%	0%	0%	0%	0%	-1%	-1%	-1%	-1%	-1%	-1%	-1%	-2%	-2%
	D ₂ (a ₂)	-2%	-1%	-1%	-1%	-1%	0%	0%	0%	0%	-1%	0%	0%	1%	-1%
	moy.*	-2%	-1%	-1%	-1%	-1%	0%	-1%	0%	0%	-1%	-1%	-1%	-1%	-2%
* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre D ₁ et D ₂															

Tableau de résultats : résine base colza		Temps en jours											
		15	16	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Consommation d'O ₂ par la substance d'essai testée (mg/l)	a ₁	10	11	11	13	14	14	14	14	15	16	16	17
	a ₂	14	15	17	18	19	19	19	19	19	20	21	21
Consommation d'O ₂ par le témoin (mg/l)	b ₁	18	18	20	21	22	22	23	23	24	25	26	26
	b ₂	14	15	16	17	18	18	19	19	19	20	20	20
	bm moy	16	16,5	18	19	20	20	21	21	21,5	22,5	23	23
Consommation d'O ₂ corrigée (mg/l)	(a ₁ -bm)	-6	-5,5	-7	-6	-6	-6	-7	-7	-6,5	-6,5	-7	-6
	(a ₂ -bm)	-2	-1,5	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-2,5	-2,5	-2	-2
DBO (mgO ₂ /mg substance d'essai)	DBO ₁ (a ₁)	-0,06	-0,05	-0,07	-0,06	-0,06	-0,06	-0,07	-0,07	-0,06	-0,06	-0,07	-0,06
	DBO ₂ (a ₂)	-0,04	-3,00	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04
% dégradation D : DBO/DThO	D ₁ (a ₁)	-2%	-2%	-3%	-2%	-2%	-2%	-3%	-3%	-2%	-2%	-3%	-2%
	D ₂ (a ₂)	-1%	-1%	-1%	-70%	-1%	-1%	-1%	-1%	-2%	-2%	-1%	-1%
	moy.*	-2%	-2%	-2%	-36%	-2%	-2%	-2%	-2%	-2%	-2%	-2%	-2%
* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre D ₁ et D ₂													

Annexe 8: Tableaux de valeurs du test de biodégradabilité (OCDE 301F) sur Fus X**1. Produit de référence : acétate de sodium**

Tableau de résultats : acétate de sodium		Temps en jours													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consommation d'O ₂ par le produit de référence testé (mg/l)	a ₁	18	40	44	47	51	55	58	58	59	60	60	61	63	65
	a ₂	12	47	54	59	64	68	71	71	72	73	73	74	76	77
Consommation d'O ₂ par le témoin (mg/l)	b ₁	5	5	6	7	8	10	12	12	13	14	14	16	18	19
	b ₂	7	7	7	7	8	9	10	11	11	12	12	13	15	16
	bm moy	6	6	6,5	7	8	9,5	11	11,5	12	13	13	14,5	16,5	17,5
Consommation d'O ₂ corrigée (mg/l)	(a ₁ -bm)	12	34	37,5	40	43	45,5	47	46,5	47	47	47	46,5	46,5	47,5
	(a ₂ -bm)	6	41	47,5	52	56	58,5	60	59,5	60	60	60	59,5	59,5	59,5
DBO (mgO ₂ /mg produit de référence)	DBO ₁ (a ₁)	0,15	0,42	0,47	0,50	0,54	0,57	0,59	0,58	0,59	0,59	0,59	0,58	0,58	0,59
	DBO ₂ (a ₂)	0,06	0,43	0,50	0,55	0,59	0,62	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63
% dégradation D : DBO/DThO	D ₁ (a ₁)	19%	54%	60%	64%	69%	73%	75%	74%	75%	75%	75%	74%	74%	76%
	D ₂ (a ₂)	8%	55%	64%	70%	76%	79%	81%	81%	81%	81%	81%	81%	81%	81%
	moy.*	14%	55%	62%	67%	72%	76%	78%	77%	78%	78%	78%	77%	77%	78%
* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre D ₁ et D ₂															

Tableau de résultats : acétate de sodium		Temps en jours													
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Consommation d'O ₂ par le produit de référence testé (mg/l)	a ₁	66	66	69	69	70	71	72	74	74	74	74	74	76	77
	a ₂	79	79	82	82	85	85	85	86	86	86	86	86	87	88
Consommation d'O ₂ par le témoin (mg/l)	b ₁	21	21	23	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	26
	b ₂	18	18	19	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	21
	bm moy	19,5	19,5	21	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	23,5
Consommation d'O ₂ corrigée (mg/l)	(a ₁ -bm)	46,5	46,5	48	47	48	49	50	52	52	52	52	52	54	53,5
	(a ₂ -bm)	59,5	59,5	61	60	63	63	63	64	64	64	64	64	65	64,5
DBO (mgO ₂ /mg produit de référence)	DBO ₁ (a ₁)	0,58	0,58	0,60	0,59	0,60	0,61	0,62	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,67	0,67
	DBO ₂ (a ₂)	0,63	0,63	0,64	0,63	0,67	0,67	0,67	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,69	0,68
% dégradation D : DBO/DThO	D ₁ (a ₁)	74%	74%	77%	75%	77%	78%	80%	83%	83%	83%	83%	83%	86%	86%
	D ₂ (a ₂)	81%	81%	83%	81%	85%	85%	85%	87%	87%	87%	87%	87%	88%	87%
	moy.*	77%	77%	80%	78%	81%	82%	83%	85%	85%	85%	85%	85%	87%	86%
* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre D ₁ et D ₂															

2. Substance d'essai : Fus X

Tableau de résultats : agro-solvant ARD		Temps en jours													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consommation d'O ₂ par la substance d'essai testée (mg/l)	a ₁	6	7	7	22	23	27	30	32	34	35	36	39	45	48
	a ₂	7	9	9	31	34	42	47	52	56	59	62	67	74	79
Consommation d'O ₂ par le témoin (mg/l)	b ₁	5	5	6	7	8	10	12	12	13	14	14	16	18	19
	b ₂	7	7	7	7	8	9	10	11	11	12	12	13	15	16
	bm moy	6	6	6,5	7	8	9,5	11	11,5	12	13	13	14,5	16,5	17,5
Consommation d'O ₂ corrigée (mg/l)	(a ₁ -bm)	0	1	0,5	15	15	17,5	19	20,5	22	22	23	24,5	28,5	30,5
	(a ₂ -bm)	1	3	2,5	24	26	32,5	36	40,5	44	46	49	52,5	57,5	61,5
DBO (mgO ₂ /mg substance d'essai)	DBO ₁ (a ₁)	0,00	0,02	0,01	0,30	0,30	0,35	0,38	0,41	0,44	0,44	0,46	0,49	0,57	0,61
	DBO ₂ (a ₂)	0,01	0,03	0,03	0,24	0,27	0,33	0,37	0,41	0,45	0,47	0,50	0,54	0,59	0,63
% dégradation D : DBO/DThO	D ₁ (a ₁)	0%	1%	1%	19%	19%	23%	25%	26%	28%	28%	30%	32%	37%	39%
	D ₂ (a ₂)	1%	2%	2%	16%	17%	21%	24%	27%	29%	30%	32%	34%	38%	40%
	moy.*	0%	2%	1%	18%	18%	22%	24%	26%	29%	29%	31%	33%	37%	40%
* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre D ₁ et D ₂															

Tableau de résultats : agro-solvant ARD		Temps en jours													
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Consommation d'O ₂ par la substance d'essai testée (mg/l)	a ₁	54	59	63	63	65	66	66	68	68	68	69	71	73	75
	a ₂	86	90	96	98	104	106	110	113	115	116	118	121	124	126
Consommation d'O ₂ par le témoin (mg/l)	b ₁	21	21	23	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	26
	b ₂	18	18	19	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	21
	bm moy	19,5	19,5	21	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	23,5
Consommation d'O ₂ corrigée (mg/l)	(a ₁ -bm)	34,5	39,5	42	41	43	44	44	46	46	46	47	49	51	51,5
	(a ₂ -bm)	66,5	70,5	75	76	82	84	88	91	93	94	96	99	102	102,5
DBO (mgO ₂ /mg substance d'essai)	DBO ₁ (a ₁)	0,69	0,79	0,84	0,82	0,86	0,88	0,88	0,92	0,92	0,92	0,94	0,98	1,02	1,04
	DBO ₂ (a ₂)	0,68	0,72	0,76	0,78	0,84	0,86	0,90	0,93	0,95	0,96	0,98	1,01	1,04	1,05
% dégradation D : DBO/DThO	D ₁ (a ₁)	45%	51%	54%	53%	55%	57%	57%	59%	59%	59%	61%	63%	66%	66%
	D ₂ (a ₂)	44%	46%	49%	50%	54%	55%	58%	60%	61%	62%	63%	65%	67%	67%
	moy.*	44%	49%	52%	51%	55%	56%	57%	59%	60%	60%	62%	64%	66%	67%
* Ne pas faire la moyenne s'il existe une grande différence entre D ₁ et D ₂															

Annexe 9: Etude de la bioassimilation théorique de Fus X

La première étape de dégradation du fus X est son hydrolyse en xylose et alcool amylique, soit de façon extracellulaire puis chacune des deux entités pénètrent dans le micro-organisme (xylose, molécule hydrophile nécessite un transporteur, et l'alcool amylique, plutôt hydrophobe, diffuse à travers la membrane), soit l'agrosolvant pénètre dans le micro-organisme par un transporteur à spécificité modérée.

A. Le catabolisme du xylose

La source de xylose prépondérante dans la nature est l'hémicellulose, l'un des éléments constitutifs des parois végétales et du bois. Les voies cataboliques de ce polysaccharide ont été étudiées (dégradation de la matière organique du sol, formation de l'humus, dégradation dans le rumen des ruminants) et sont bien décrites dans la littérature. Evidemment, la dégradation simulée en laboratoire n'utilise pas la même flore que celle du sol ou du rumen des ruminants mais la diversité de la flore des boues activées est telle qu'une certaine variété de micro-organismes est commune (actinomycètes, protozoaires, ...). De plus, si le xylose n'est pas dégradé pendant l'assainissement des eaux usées et se retrouve dans l'eau épurée, il sera rejeté en rivière où il sera rapidement dégradé.

1. Le transport du xylose et la synthèse des enzymes de dégradation

Après son transport, les premières étapes du catabolisme du xylose sont les mêmes pour un grand nombre d'organismes, impliquant deux enzymes intracellulaires, la *xylose isomérase* (XYL A) et la *xylulose kinase* (XYL B). Les gènes codant ces protéines sont organisées en opéron. Lors de l'explication des mécanismes biochimiques, souvent les gènes et les protéines correspondantes portent le même nom. Par convention, les gènes s'écrivent en minuscules et les protéines correspondantes en majuscules.

L'expression de xylA et xylB est induite par la présence de xylose et sous contrôle d'une protéine de régulation XYL R. Le mode de régulation est différent selon les micro-organismes.

L'opéron xylose comprend également un transporteur membranaire. La littérature est encore assez indécise concernant le mécanisme de transport du xylose car plusieurs gènes sont impliqués dans l'opéron :

- xylE codant un transporteur de faible affinité
- xylF codant un récepteur de xylose
- xylG codant une protéine de transport primaire (ATP dépendante)
- xylH codant un transporteur

(Song and Park, 1997)

Chez les Entérobactéries gram -, le facteur de transcription fonctionne comme un régulateur positif (figure 79):

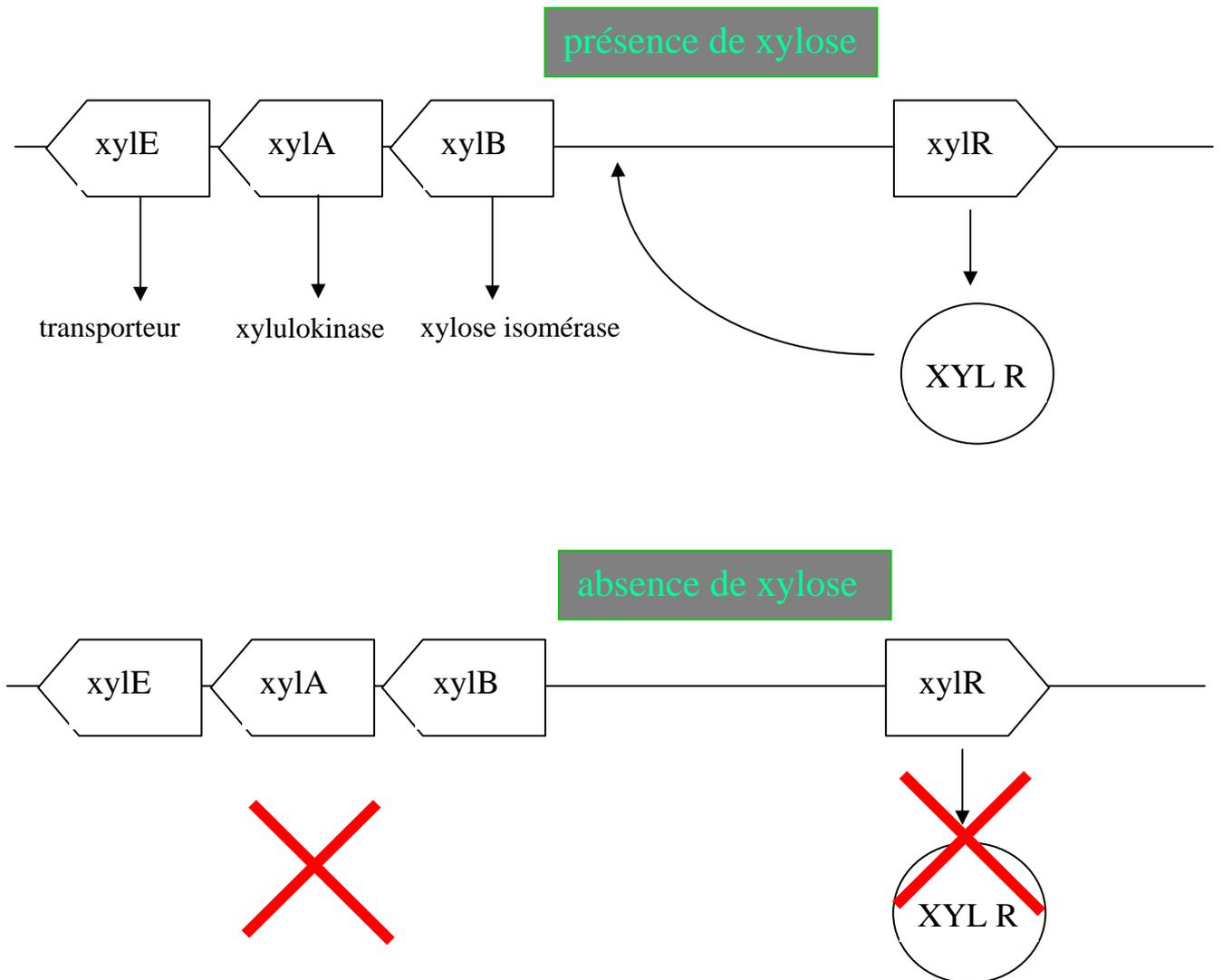


Figure 79 : Schéma simplifié du fonctionnement de l'opéron xylose chez les bactéries gram -

La présence de xylose active une protéine régulatrice XYL R, qui à son tour active le facteur de transcription. Les gènes sont alors transcrits puis traduits en protéines. Un transporteur est synthétisé, il va se fixer sur la membrane plasmique et permet la pénétration du xylose en quantité plus importante (ce qui correspond à la phase exponentielle de dégradation). Les enzymes de catabolisme du xylose sont également synthétisées. Elles permettent l'assimilation de ce sucre, la production d'énergie et de métabolites nécessaires à la croissance des micro-organismes. Quand il n'y a plus de xylose dans le milieu, la protéine de régulation n'est plus activée, ni le facteur de transcription, le transporteur et les enzymes ne sont plus synthétisés. Le micro-organisme ne gaspille pas son énergie, s'il n'éprouve pas le besoin de synthétiser certaines enzymes, il arrête leur synthèse, coûteuse en énergie. Il a cette capacité de régulation et de mettre en silence ou en activité certains gènes et ainsi la faculté de s'adapter à tout substrat éventuel.

Par exemple, chez les *Lactobacillus* et autre gram ⁺, l'opéron xylose fonctionne différemment, l'expression de xylA-xylB est régulée négativement par un répresseur (figure 80) :

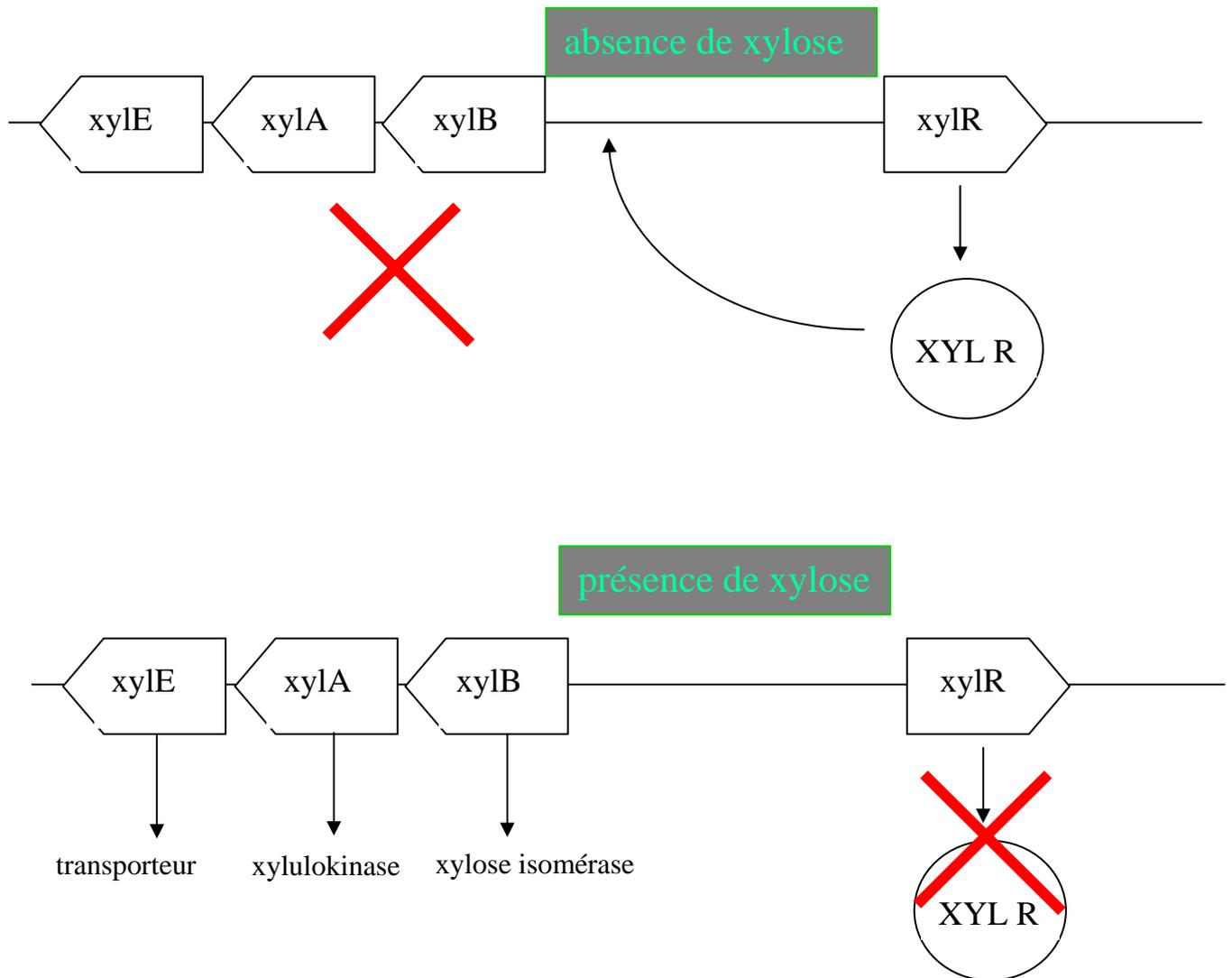


Figure 80 : Schéma simplifié du fonctionnement de l'opéron xylose chez les bactéries gram +

La protéine de régulation XYL R est activée en absence de xylose et inactivée en sa présence. Son site de fixation sur l'ADN est au même endroit que celui du facteur de transcription. Ils sont donc en compétition. Lorsque XYL R se fixe sur le site, le facteur de transcription ne peut plus lire les gènes, le transporteur et les enzymes ne sont pas synthétisés. En présence de xylose, XYL R change de conformation, ne peut plus se fixer sur son site qui est alors libre pour le facteur de transcription. Le transporteur et les enzymes sont synthétisés.

L'opéron xylose est réprimé par la présence de glucose (figure 81). En effet, le glucose agit comme un double répresseur. Il active la synthèse de XYL R qui va se fixer sur son site ainsi qu'un complexe de régulation du catabolisme CcpA. (Takeda *et al.*, 1998).

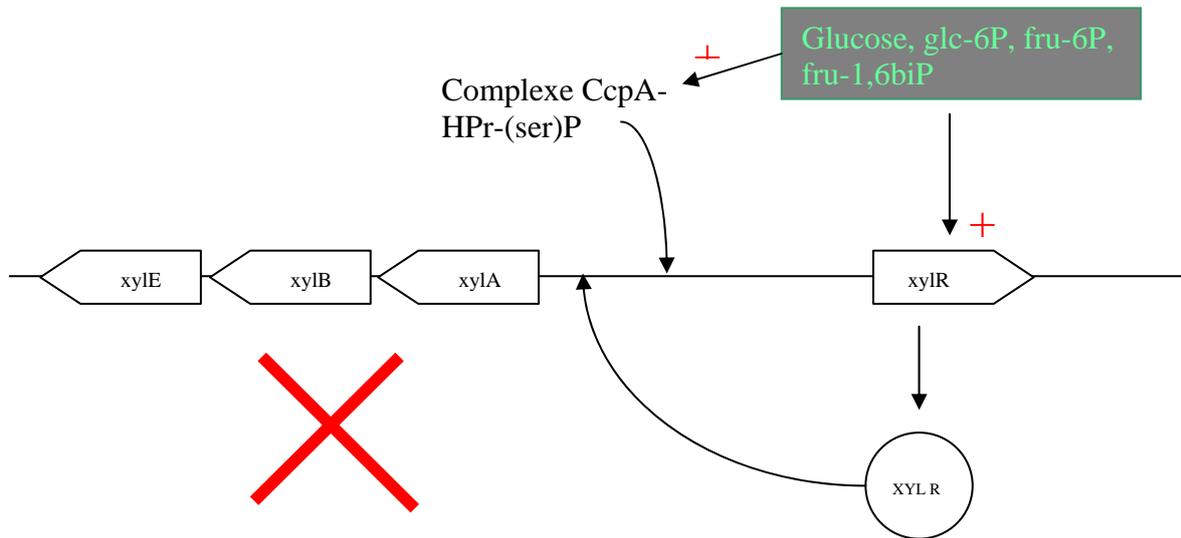


Figure 81 : Schéma simplifié montrant la répression de l'opéron *xyl* par le glucose

Le complexe CcpA est le dernier maillon de la chaîne de régulation impliquant des protéines qui s'activent ou s'inactivent par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation (par exemple, la seryl-phosphotransférase HPr-(ser)). (Titgemeyer and Hillen, 2002).

La découverte d'un autre gène (*xyl Q*) de l'opéron *xyl* codant une xylosidase intracellulaire oriente les scientifiques vers un nouveau fonctionnement de l'opéron *xyl* (Heuberger *et al.*, 2001). Pour la première fois, il est suggéré que XYL P serait un transporteur de xylosides (oligomères de xylose) et non de xylose. L'équipe d'Heuberger a démontré le transport d'isoprimeverose (disaccharide composé de xylose et glucose) par XYL P, confirmé par Chaillou *et al.*, 1998, qui ajoutent que le gène *xylP* codent un co-transporteur symport isoprimeverose/cations chez *Lactobacillus pentosus*.

XYL P fait parti des transporteurs transmembranaires de la famille des GPH (Glycosides-pentosides-hexuronides). C'est un transport secondaire avec un gradient électrochimique comme source d'énergie, symport (Davis and Hendersen, 1987), c'est-à-dire que les oses et les ions vont dans le même sens. Le récepteur est seulement accessible d'un côté, le sucre et le cation (H^+ ou Na^+) se fixent en même temps sur le coté extérieur. La protéine transmembranaire se réoriente vers l'intérieur où elle libère le sucre et le cation. Cette libération induit l'isomérisation de la protéine dans sa conformation initiale.

Si XYL P est spécifique des xylosides, comment le xylose pénètre t-il dans le micro-organisme ? Il existerait un autre moyen de pénétration. Le xylose serait intégrée dans la cellule par diffusion facilitée grâce au système mannose PTS (mannose phosphotransférase) mis en évidence par l'utilisation d'un mutant déficient en transporteur de mannose, incapable de croître sur un milieu avec du xylose comme unique source de carbone. Il existe d'autres système PTS impliquant la diffusion des sucres : le transport de D-galactose et tréhalose via le mannose PTS de *Salmonella typhimurium* ou le transport de galactose et de fructose via le glucose PTS d'*Escherichia coli*. (Heuberger *et al.*, 2001).

2. Le catabolisme du xylose dans le cytoplasme

La principale activité d'une cellule est d'assurer sa propre survie :

- elle doit trouver l'énergie nécessaire à son fonctionnement. Celle-ci est principalement obtenue par dégradation de molécules organiques ou minérales (catabolisme)
- elle doit fabriquer ou trouver des molécules de bases (lipides, glucides, acides aminés et acides nucléiques), matières premières de sa construction (anabolisme).

Ces deux activités sont regroupées sous le terme de métabolisme, ne sont pas dissociables et se servent respectivement.

L'assimilation du xylose se déroule en deux étapes :

- la transformation du xylose en xylulose-5-phosphate dans la 1^{ère} partie oxydative de la voie des pentoses phosphates (figure 82)

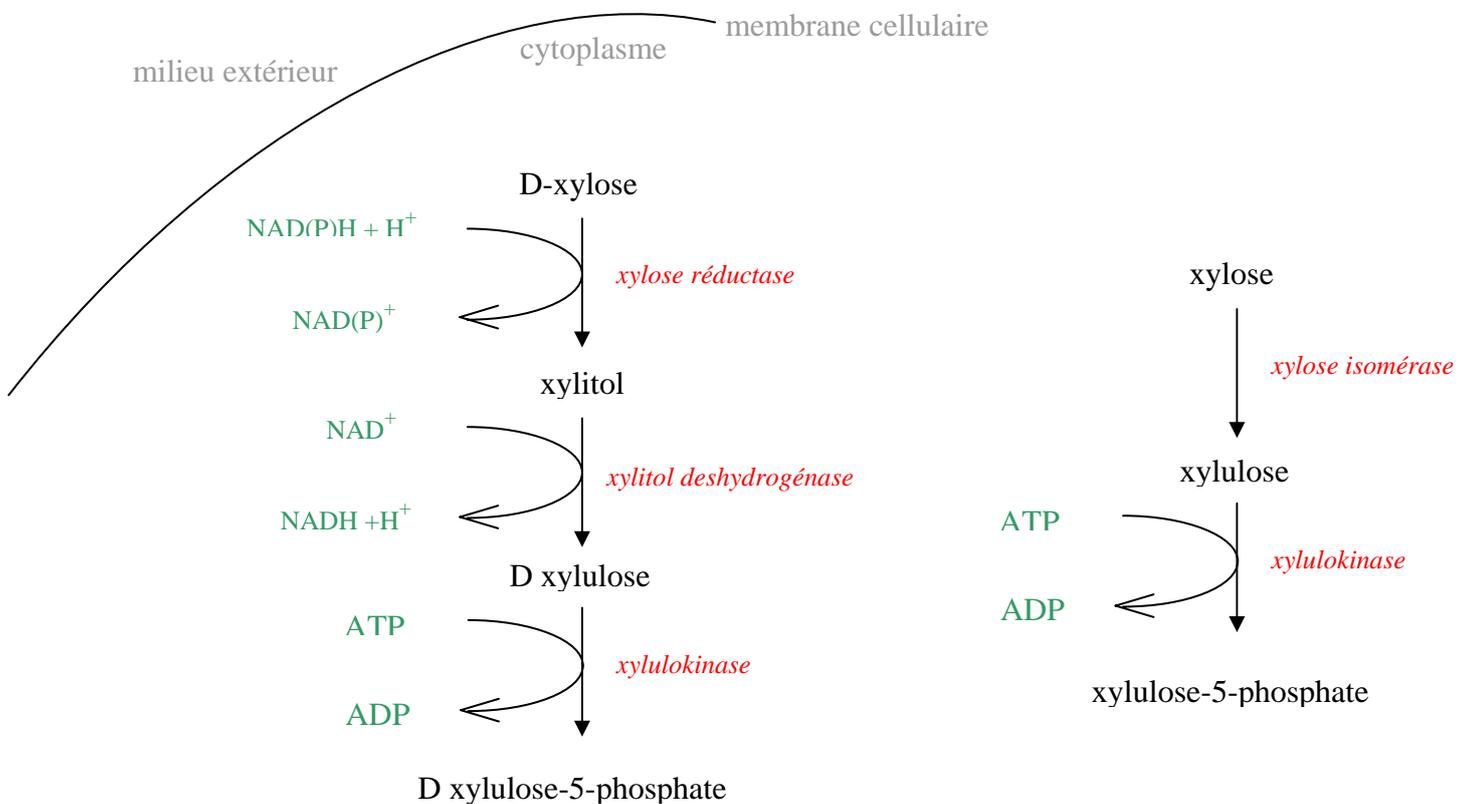


Figure 82: 1^{ère} partie oxydative de la voie des pentoses-phosphates

- réactions de transaldolisation-transcétolisation dans la 2^{ème} partie non oxydative de la voie des pentoses phosphates (figure 83)

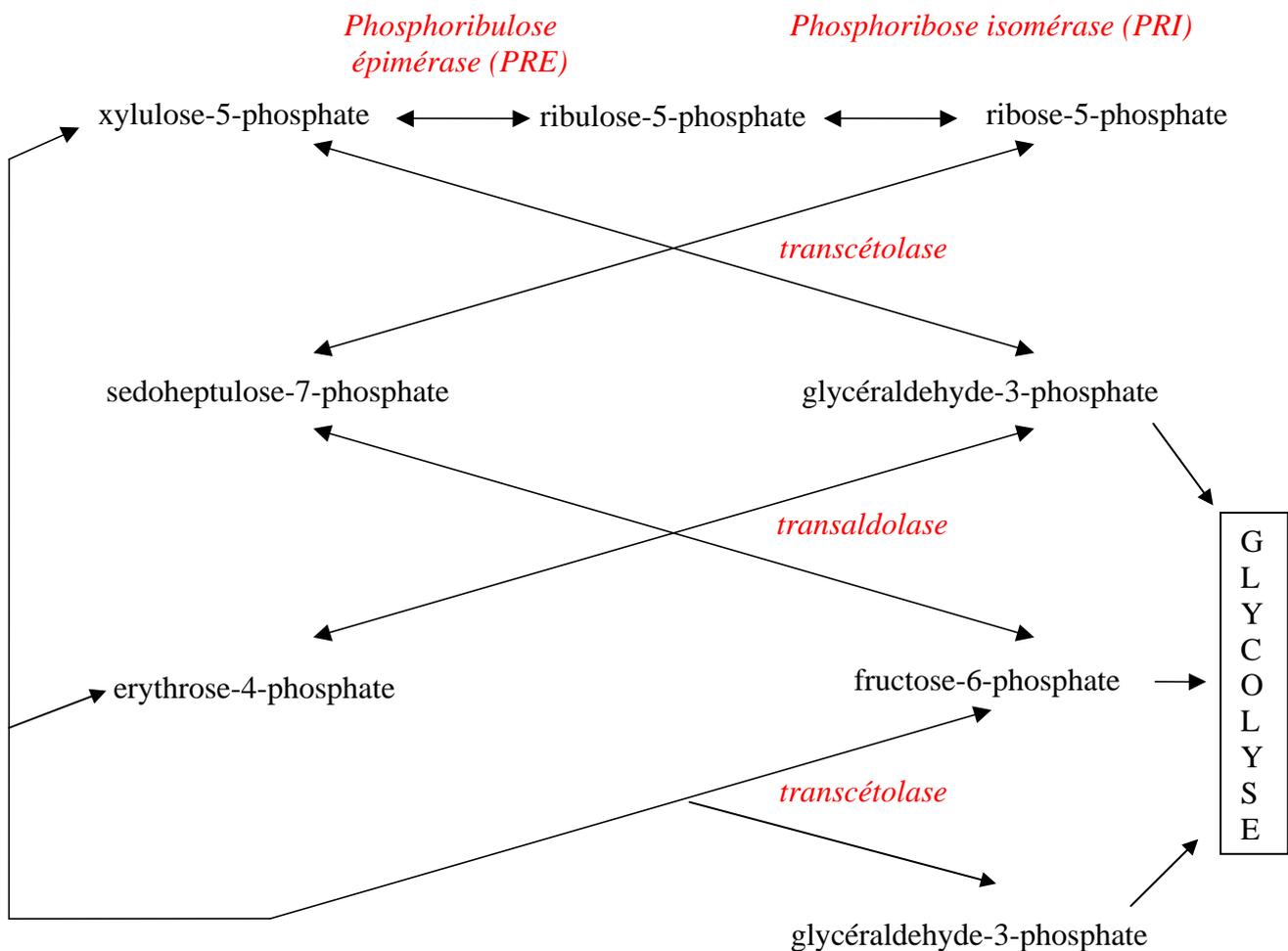


Figure 83: 2ème partie non oxydative de la voie des pentoses phosphates

Chez certaines souches (les levures, Batt *et al.*, 1985 ; les champignons, Prathumpai *et al.*, 2003 ; ...), la partie oxydative implique deux enzymes de conversion, la xylose réductase qui réduit, en présence de NADH, le xylose en xylitol et la xylitol deshydrogénase qui, en présence de NAD⁺, oxyde le xylitol en xylulose. Le bilan de ces deux réactions s'équilibre terme de co-facteurs. La dernière étape est la phosphorylation du xylulose, coûteuse en énergie puisqu'elle nécessite l'utilisation d'un ATP.

Xanthomonas campestris, bactérie gram⁻ et souche pathogène des crucifères (Feldmann *et al.*, 1992) utilise une autre stratégie. Elle possède une xylose isomérase qui transforme le xylose en xylulose puis une xylulokinase qui phosphoryle le xylulose. Les co-facteurs ne sont plus nécessaires mais toutes les réactions de phosphorylation demandent de l'énergie.

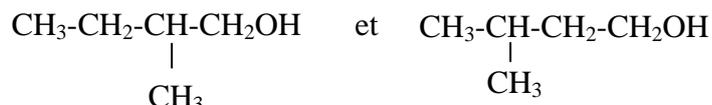
Suscitant un intérêt commercial avec la possibilité d'utiliser la biomasse végétale ou leur co-produits (bois, fibres, pulpes) pour synthétiser de l'éthanol par fermentation, la recherche industrielle s'est intéressée au catabolisme du xylose par les micro-organismes. Les travaux portent sur l'insertion de gènes du transport du xylose et des enzymes de dégradation (Jackson and Nicolson, 2002) et confirment l'existence des deux voies citées ci-dessus, chez les levures et les champignons dépourvus de xylose isomérase pour la première et chez les bactéries, les actinomycètes et les eucaryotes pour la seconde.

La deuxième partie de la voie des pentoses phosphates permet la transformation du xylulose-5-phosphate en ribulose-5-phosphate, grâce à une phosphoribulose épimérase (PRE), qui peut lui-même s'isomériser en ribose-5-phosphate par une phosphoribose isomérase (PRI). Ces deux réactions sont réversibles. Le xylulose-5-phosphate et le ribose-5-phosphate entrent dans un jeu de transcétolisation/transaldolisation qui aboutit à des intermédiaires de la glycolyse.

La glycolyse permet d'obtenir du pyruvate, carrefour des voies métaboliques, notamment le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire (minéralisation du xylose en CO₂) en aérobiose, ou les différentes fermentations en anaérobiose.

B. Le catabolisme de l'alcool amylique

L'alcool amylique est un méthylbutanol :



Sa voie catabolique n'est pas présentée dans la littérature. Sa chaîne carbonée est relativement courte, sans insaturation, sans substitution aromatique, halogénée, aminée ou tout autre groupement qui pourrait poser des problèmes de dégradation.

L'alcool amylique est une petite molécule hydrophobe qui peut diffuser à travers la membrane de phospholipides. La voie la plus simple de dégradation est une oxydation de cet alcool gras en acide gras. La dégradation biochimique des acides gras est la β-oxydation.

Une fois dans la cellule, les acides gras sont activés dans le cytoplasme (figure 84), par formation de thioester avec le coenzyme A. Cette activation est coûteuse en énergie puisque le bilan global est de deux moles d'ATP consommées par mole d'acide gras activé en acyl-CoA. L'acide gras est ensuite diminué de deux carbones à chaque tour, (la dégradation des acides gras est également connu sous le nom d'hélice de Lynen) (figure 85) et libère un acétylCo A, minéralisable en CO₂ par le cycle de Krebs.

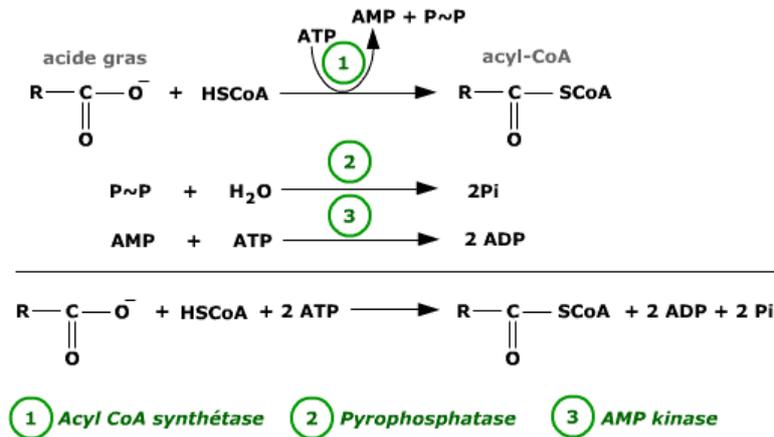


Figure 84: Activation des acides gras

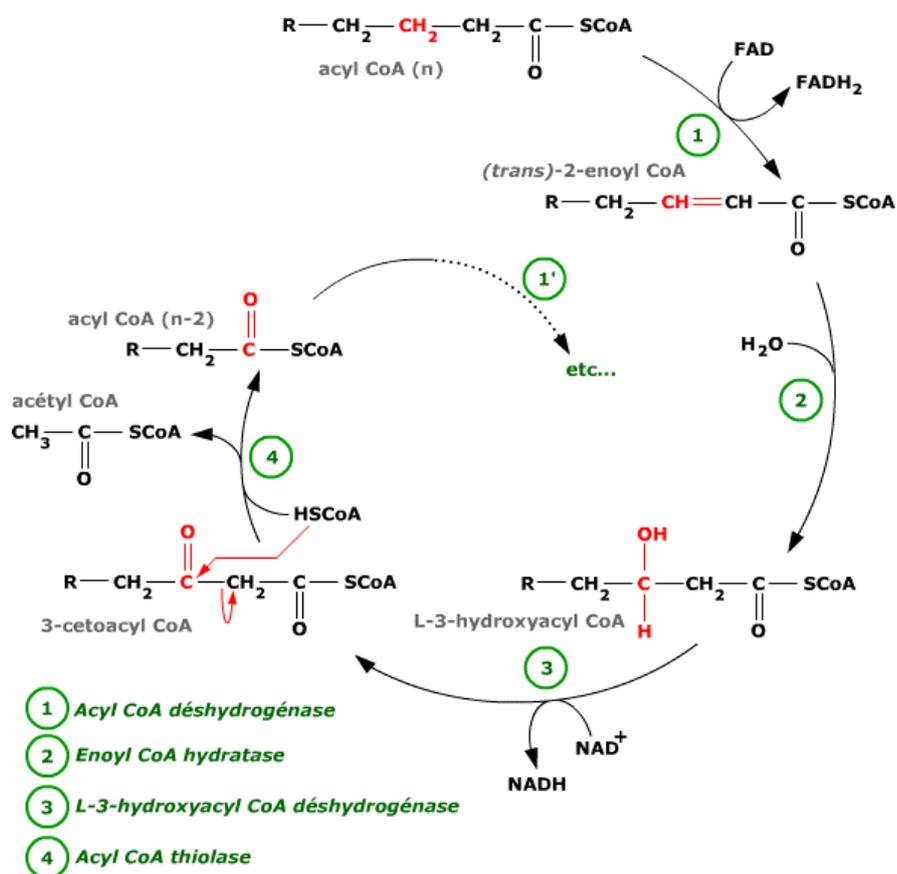


Figure 85: un cycle de β -oxydation

L'agro-solvant Fus X est une petite molécule relativement simple. Soit elle est hydrolysée de façon extracellulaire puis chacune des deux parties entrent dans le cytoplasme (transporteur spécifique du xylose ou système PTS ; diffusion de l'alcool amylique), soit elle pénètre par un transporteur à xyloside non spécifique et est hydrolysée par des xylosidases intracellulaires. Le xylose est ensuite métabolisé par la voie des pentoses phosphates, la glycolyse et le cycle de Krebs et minéralisé en CO_2 (en aérobiose). L'alcool amylique est probablement transformé en acide gras puis en acétylCo A par la voie de la β -oxydation.

Annexe 10: Etude de l'écotoxicité de Fus X vis-à-vis des daphnies

L'écotoxicologie a pour but d'étudier le comportement et les effets des polluants dans les écosystèmes. Face aux nombreuses substances issues des activités technologiques qui se retrouvent quotidiennement dans l'environnement, la détection rapide d'une présence excessive de contaminants, la détermination de leur toxicité et une prévention des atteintes nuisibles sont nécessaires pour assurer la protection des écosystèmes.

Cette estimation se concrétise par des tests d'écotoxicité monospécifiques qui établissent une relation entre une dose de substance administrée dans des conditions définies et la réponse d'un individu d'une population végétale ou animale.

La pertinence du choix des bioessais est appréciée selon des critères tels que l'objectif de l'étude, le type de toxicité déterminée (aiguë ou chronique), la simplicité de mise en œuvre, la sensibilité relative envers les micropolluants, la rapidité, la représentativité écologique, la normalisation des protocoles opératoires, et enfin le coût.

Par adéquation des tests de biodégradabilité réalisés en milieu liquide, les tests d'écotoxicité doivent se révéler représentatif de l'écosystème aqueux. La toxicité aiguë vis-à-vis de *Daphnia magna* est réalisée.

Les daphnies, connues également sous le nom de puces d'eau, sont des petits crustacés d'eau douce fréquemment rencontrés dans les eaux douces, de l'ordre *Cladocera*. L'espèce *Daphnia magna* Straus est répandue et commune dans les petits étangs, mares et bassins d'eaux riches en matière organique et peu oxygénées. Relativement grande (jusqu'à 5 mm de longueur), elle se déplace au moyen de ses antennes et se nourrit par filtration de bactéries, de détritus très fins en suspension et de phytoplancton. La reproduction des daphnies par parthénogenèse (reproduction asexuée) permet de maintenir en laboratoire une bonne uniformité des individus (organismes génétiquement identiques) et de supprimer une éventuelle différence de sensibilité liée au sexe.

L'antériorité du test avec les daphnies, sa simplicité et son utilisation universelle font que ce bioessai est un standard reconnu pour déterminer l'écotoxicité aiguë et pour lequel on dispose d'un grand nombre de données.

1. Principe

Le principe consiste à déterminer, dans les conditions définies par la norme adaptée à chaque composé, la concentration initiale qui en, 24 ou 48h, immobilise 50% de *Daphnia magna* mises en expérimentation.

L'essai est conduit en une ou deux étapes :

- un essai préliminaire qui sert à déterminer la gamme de concentrations pour l'essai définitif (0, 100% d'immobilisation et les concentrations intermédiaires) et qui donne une indication approximative de la CE₅₀₋₂₄ ou 48h
- un essai définitif, effectué lorsque la valeur approximative fournie par l'essai préliminaire ne peut suffire.

Lorsque la méthode est appliquée aux substances chimiques, un essai limite peut être effectué à 100 mg/L. En effet, l'Union européenne distingue les catégories suivantes sur la base des résultats des tests avec les poissons, les daphnies et les algues vertes (Directive 93/21/CEE) :

- très toxique : $CE50 < 1 \text{ mg/L}$
- toxique : $1 \text{ mg/L} < CE50 < 10 \text{ mg/L}$
- nocif : $10 \text{ mg/L} < CE50 < 100 \text{ mg/L}$
- non toxique : $CE50 > 100 \text{ mg/L}$

2. Protocole

Les solutions mères des substances à étudier doivent être préparées par dissolution d'une quantité connue de la substance à étudier dans un volume défini d'eau de dilution, d'eau déionisée ou d'eau distillée dans un récipient en verre. Elles doivent être préparées au moment de l'emploi à moins que la substance en solution soit connue pour être stable, auquel cas, la solution mère peut être préparée jusqu'à 2 jours avant l'essai.

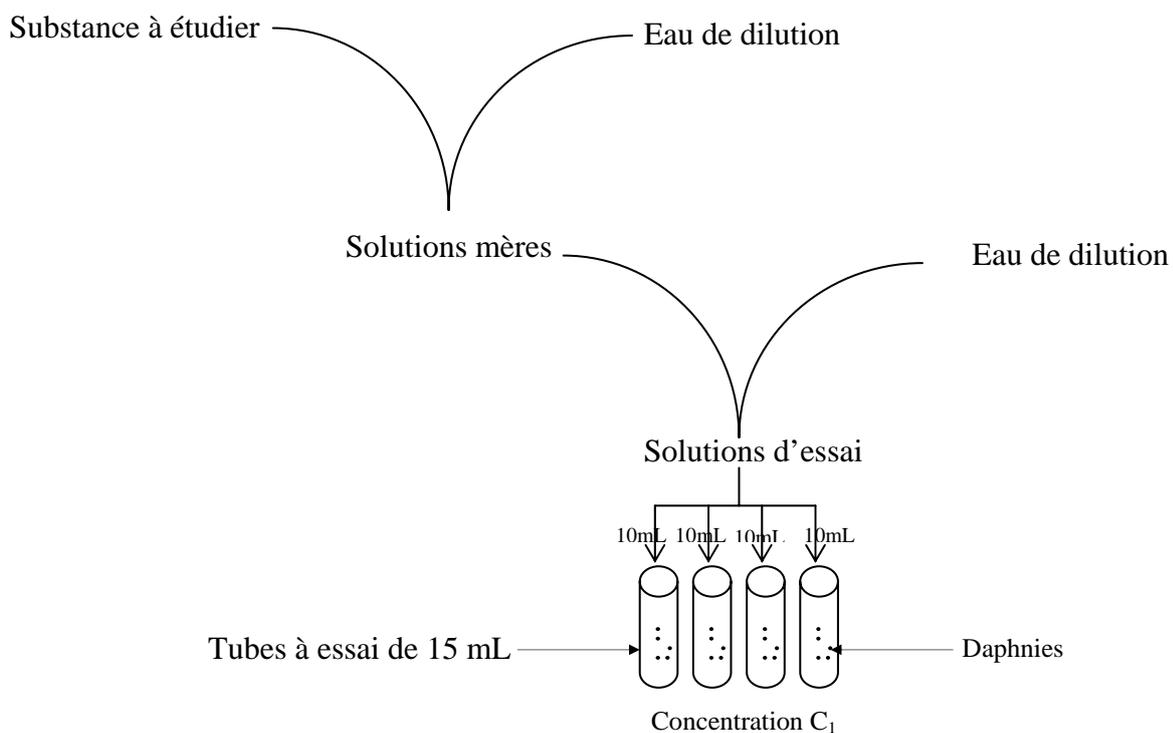
Les solutions d'essais doivent être préparées par ajout des solutions mères à l'eau de dilution en quantités définies

1. Eau de dilution (exemple)

	réactifs	Concentration (g/L)
solution 1	$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	11.76
solution 2	$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	4.93
solution 3	NaHCO_3	2.59
solution 4	KCl	0.23

L'eau de dilution s'effectue avec 25 mL de chacune de ces 4 solutions minérales pour 1 L. Son pH doit être de $7,8 \pm 0,2$, une dureté totale de $250 \text{ mg/L} \pm 25 \text{ mg/L}$, un rapport molaire Ca/Mg voisin de 4:1 et une concentration en oxygène dissous supérieure à 7 mg/L . L'eau de dilution est aérée jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous ait atteint la valeur de saturation dans l'air et jusqu'à stabilisation du pH. Si nécessaire, ajuster le pH à $7,8 \pm 0,2$ avec une solution d'hydroxyde de sodium NaOH ou d'acide chlorhydrique HCl.

2. Test :

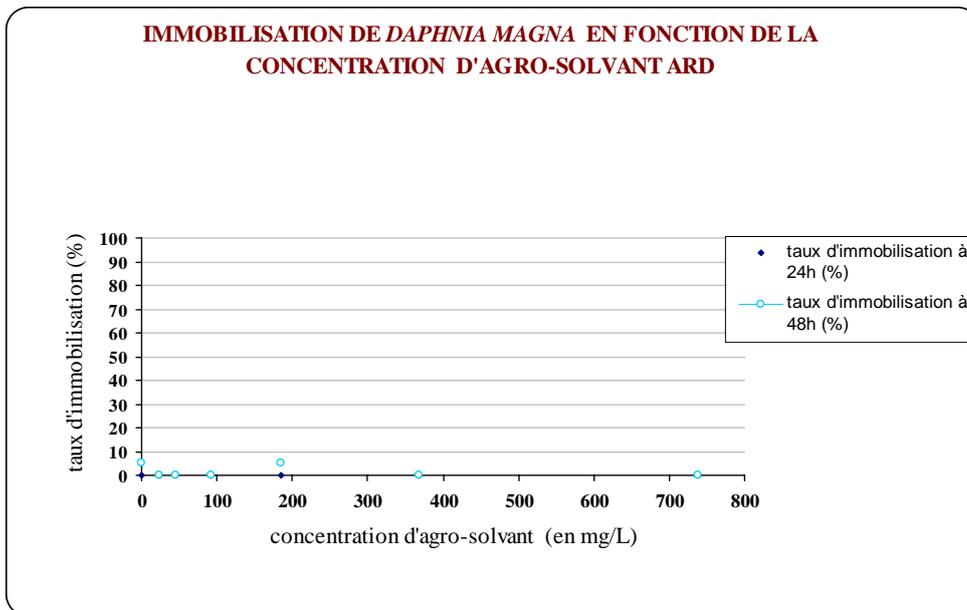


Matériel	<ul style="list-style-type: none"> - enceinte climatisée à 20 ± 2 °C - tubes à essais (au min 10 mL)
Organisme d'essai	<ul style="list-style-type: none"> - souche : <i>Daphnia magna Straus</i> - âgée de moins de 24h, en bonne santé - jeunes de 3ème génération au moins - tester au minimum 20 daphnies, réparties de préférence en 4 groupes de 5 organismes - les daphnies ne sont pas nourries durant le test
Conditions	<ul style="list-style-type: none"> - pH = $7,8 \pm 0,2$ - O2 dissous : $\geq 80\%$ saturation (≥ 7 mg/L) - température : 20 ± 2 °C - éclairage : cycle jour/nuit ou obscurité
Mode opératoire	<ul style="list-style-type: none"> - au min 2 mL de solution /daphnie - au min 4 concentrations ; gamme de concentrations (selon une série géométrique de raison inférieure à 2,2) déterminée avec un essai préliminaire de façon à obtenir 3-4 pourcentages compris entre 10 et 90 % - 4 répliques /concentrations et 4 témoins
Paramètre mesuré	Pourcentage de daphnies immobilisées à 24 et 48h
Substance de référence	Dichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$
Critères de validité	<ul style="list-style-type: none"> - témoin : immobilisation $\leq 10\%$ - sensibilité $K_2Cr_2O_7$: $0.6 < CE_{50-24h} < 2.1$ mg/L - O2 dissous ≥ 2 mg/L à la fin de l'essai - Variation pH < 1 unité
Calcul et expression des résultats	Détermination des CE_{50-24} et 48h avec méthodes des probits, moyennes mobiles, binomiale ou estimation graphique sur diagramme gaussio-logarithmique

3. Ecotoxicité de Fus X vis-à-vis des daphnies

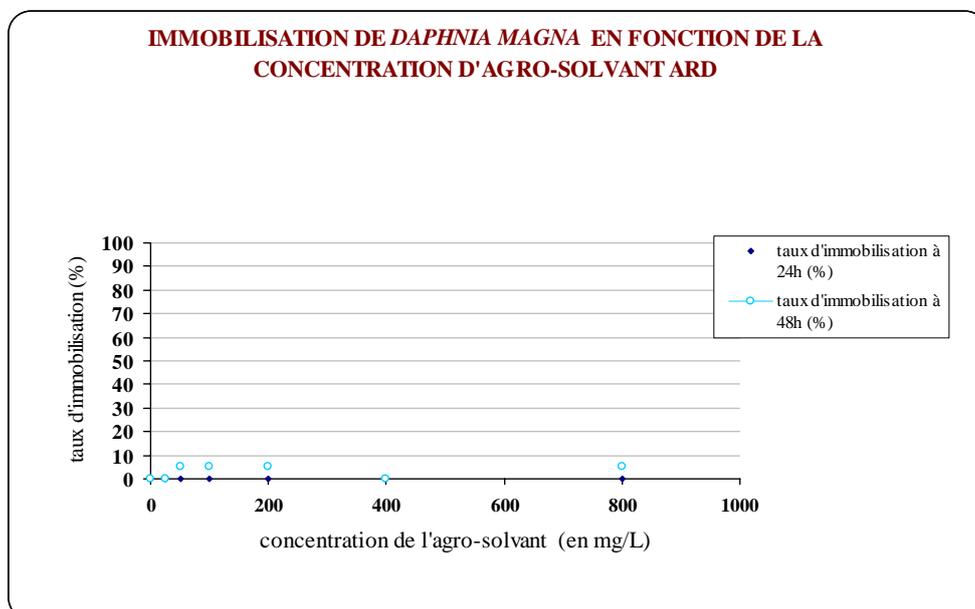
Essai 1 :

Gamme désirée (mg/L)	0	25	50	100	200	400	800
pH initial	7.68	7.39	7.54	7.56	7.54	7.51	7.46
O ₂ initial (mg/L)	6.97	6.81	6.99	6.89	6.94	6.92	6.73
Température (°C)		22.5		21.4			
nb daphnies initial	5 5 5 5 20						
nb daphnies 24h	5 5 5 5 20						
nb daphnies 48h	5 5 4 5 19	5 5 5 5 20	5 5 5 5 20	5 5 5 5 20	5 4 5 5 19	5 5 5 5 20	5 5 5 5 20
pH final	7.05	7.34	7.40	7.34	7.29	7.24	7.23
O ₂ finale (mg/L)	6.46	6.59	6.74	6.44	6.00	6.00	5.34
Température (°C)	22.2	22.4	22.4	21.7	21.5	21.4	21.8



Essai 2 :

Gamme désirée (mg/L)	0	25	50	100	200	400	800
pH initial	7.8	7.52	7.53	7.47	7.23	7.17	6.94
O ₂ initial (mg/L)	7.8	5.81	6.09	5.71	5.94	5.91	5.63
Température (°C)						20.5	
nb daphnies initial	5 5 5 5	5 5 5 5	5 5 5 5	5 5 5 5	5 5 5 5	5 5 5 5	5 5 5 6
nb daphnies 24h	20	20	20	20	20	20	21
nb daphnies 48h	5 5 5 5	5 5 5 5	5 4 5 5	5 4 5 5	4 5 5 5	5 5 5 5	5 5 5 5
	20	20	19	19	19	20	20
pH final	7.06	7.04	7.05	7.11	7.09	7.14	7.13
O ₂ finale (mg/L)	5.43	4.97	4.94	5.51	4.94	5.75	4.30
Température (°C)	21.3	21.1	21.3	21.3	21.6	21.7	21.2



Les résultats doivent être représentés graphiquement selon une échelle semi-logarithmique. Ayant un taux d'immobilisation nul, je ne peux pas modifier l'échelle.

La CE₅₀ de l'agro-solvant d'ARD est supérieur à 800 mg/L. Il n'est pas considéré comme toxique vis-à-vis des daphnies.

4. Entretien de *Daphnia magna*

L'élevage de *Daphnia magna* n'est pas standardisé par les différentes normes (AFNOR, OCDE ou ISO) où seules quelques recommandations sont formulées. En revanche, l'USEPA (1987) inclut dans son "user's guide" un chapitre complet sur la procédure et les conditions d'élevage de ce microcrustacé (guide pour l'utilisation des tests écotoxicologique avec les daphnies, les bactéries luminescents et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement, 2002)

- Population

Les daphnies peuvent se reproduire aussi bien par parthénogenèse que de manière sexuée. Cette dernière doit cependant être évitée pour garantir l'homogénéité de la culture. La formation "d'éphippies" (œufs noirs résistants de 1-2 mm dans la poche incubatrice) est un signe de stress. Il faut éviter leur formation car ces œufs donneront naissance à une population génétiquement différente. De même, il faut éliminer les mâles, reconnaissables à leur taille plus petite que celle des femelles, et pouvant apparaître en faible proportion sous certaines conditions défavorables.

Les jeunes daphnies sont matures après 7-8 jours. Les femelles se reproduisent ensuite pendant environ deux mois et demi à raison d'une portée de 10 à 30 jeunes tous les 2 à 3 jours. Pour avoir une culture homogène, il est nécessaire que les daphnies d'un même cristalliseur soient de la même génération.

- Milieu de culture

Plusieurs milieux peuvent être utilisés pour l'élevage de *Daphnia magna*, comme par exemple les milieux reconstitués *M4* ou *M7* (Ellenita et Biais, 1990). Le milieu ISO 6341, plus pauvre en éléments minéraux, doit être enrichi de vitamines B12 et de sélénium pour des cultures à long terme.

Le service Environnement d'ARD utilise un milieu de culture dont le protocole a été fourni par le laboratoire municipal de Reims. Il se prépare en plusieurs étapes :

Milieu LC :

Solution 1 : Ca(NO₃)₂, 4H₂O, 40 g/L

Solution 2 : KNO₃, 100 g/L

Solution 3 : MgSO₄, 7H₂O, 30 g/L

Solution 4 : KH₂PO₄, 40 g/L

Solution 5 : CuSO₄, 5H₂O, 0.03 g/L ; (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4H₂O, 0.06 g/L ; ZnSO₄, 7H₂O, 0.06 g/L ; CoCl₂, 6H₂O, 0.06 g/L ; Mn(NO₃)₂, 4H₂O, 0.06 g/L ; C₆H₈O₇, 4H₂O, 0.06 g/L ; H₃BO₃, 0.06 g/L

Solution 6 : C₆H₅FeO₇, 5H₂O, 1.625 g/L ; FeSO₄, 7H₂O, 0.625 g/L ; FeCl₃, 6H₂O

Milieu oligo-LC :

1 mL des solutions 1, 2, 3 et 4, 0,5 mL des solutions 5 et 6 dans 1L d'eau distillée. Le pH doit être de $7 \pm 0,2$ ajusté si nécessaire avec NaOH ou HCl. Le milieu oligo-LC se conserve 15 jours à 20°C.

Milieu d'élevage :

1/5 d'oligo-LC + 4/5 d'eau Volvic, supplémenté de vitamines (thiamine, 75 µg/L et biotine 0.75 µg/L).

- Conditions ambiantes :

En règle générale, les conditions suivantes sont recommandées :

Température : $20 \pm 2^\circ\text{C}$

Eclairage : lumière blanche froide, éclairement optimal entre 5 et 8 µE/m²/s (500 à 800 lux) mais inférieur à 12 µE/m²/s (1200 lux) pour éviter la prolifération d'algues ; photopériode de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité.

- Nourriture

Les microcrustacés sont en général nourris quotidiennement avec une solution d'algues unicellulaires (exemple : *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* ou encore un mélange de ces dernières). La quantité recommandée est de 0,1-0,2 mg de C /daphnie/jour (OCDE, 1996). Cependant, dans la pratique la quantité de carbone n'est pas évaluée à chaque fois. On détermine une première fois la correspondance avec la concentration cellulaire puis on travaille avec le nombre de cellules ajoutées ou encore "à l'œil", en fonction de la couleur plus ou moins verte du milieu (pour *P. subcapitata*, 0,2 mg C/daphnies/jour correspond à $2,3 \cdot 10^7$ cellules /daphnies/jour).

En plus des algues, il est souhaitable d'ajouter de la nourriture pour poissons (sous la forme d'extrait soluble) pour assurer un apport en lipides.

- Entretien

Il est recommandé de procéder 3 fois par semaine à un tamisage (à l'aide de tamis Artémia) pour écarter les jeunes daphnies et garantir l'homogénéité de la culture. A cette occasion, il n'est pas nécessaire de renouveler complètement le milieu. Cependant, un renouvellement complet doit être effectué une fois par semaine pour éviter un développement bactérien. De même, il faut éliminer chaque jour les daphnies mortes pour éviter d'éventuelles contaminations microbiennes.

- En cas de difficulté lors de l'élevage (grande mortalité, pas de ponte, etc ...) les points suivants sont à vérifier :

- la qualité de l'eau qui sert à préparer le milieu de culture
- la photopériode (la minuterie)
- la lumière (intensité et le spectre d'un tube varient avec le temps)
- la concentration des solutions stock (la mesure du pH et de la conductivité peuvent donner des indications sur une éventuelle erreur de préparation)
- l'état des algues (forte odeur, ...). Il vaut mieux préparer une petite quantité d'algues régulièrement
- une densité de daphnies trop élevée (ne pas dépasser 100 adultes pour 2 L). Si l'eau jaunit rapidement (le lendemain du tamisage par exemple), c'est un signe de surpopulation
- l'état du matériel (un nettoyage régulier peut éviter des problèmes de contamination et un bon rinçage, des problèmes dus au détergent)
- la manière de tamiser : si les mailles du tamis sont grandes par rapport à la taille des daphnies, ces dernières peuvent être blessées, ce qui entraîne une importante mortalité.