

UNIVERSITE MONTPELLIER I

Unité de Formation et de Recherche Pharmaceutiques

CHIMIE DES MATERIAUX

**Formation Doctorale Interface Chimie/BIOLOGIE
Discipline 50, Section 33 du CNU**

**DEGRADATION ET BIODEGRADATION DE
POLYMERES D'ACIDE LACTIQUE**

Thèse présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

Par

Angeles TORRES de DOMINGUEZ

Soutenue le 16 Juin 1995 devant le Jury composé de :

**Véronique BELLON, Directeur de Recherche (CEMAGREF)
Jean BONTOUX, Professeur (Université Montpellier I)
Maryvonne BRIGODIOT, Professeur (Université Paris VI)
Philippe GUERIN, Professeur (Université Paris XII)
Su Ming LI, Chargé de Recherche (CNRS)
Sébastianos ROUSSOS, Directeur de Recherche (ORSTOM)
Michel VERT, Directeur de Recherche (CNRS)**

**Rapporteur
Président
Examinateur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur**

A Leo

A mi padre ya ausente

A mi madre

A mis hermanos y hermanas

A todos los sobrinos

A la vida con amor...

AVANT-PROPOS

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM de Montpellier, sous la direction de M. Sévastianos ROUSSOS, et au Centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels (URA CNRS 1465) de la Faculté de Pharmacie de Montpellier, sous la direction de M. Michel VERT.

Ce travail a été effectué grâce à un financement du gouvernement mexicain, dans le cadre du programme d'échange entre le Mexique et la France, CONACYT-SFERE.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord M. Sévastianos ROUSSOS, non seulement pour avoir accepté de diriger cette thèse sous des conditions un peu particulières, mais aussi pour m'avoir toujours montrée sa grande qualité humaine. Il m'aurait été impossible de mener à bien ce travail sans son précieux soutien, scientifique et moral. Gracias Sévastianos por facilitar el intercambio entre México y Francia.

Je remercie également M. Michel VERT pour sa direction et pour m'aider à comprendre l'importance de la rigueur scientifique et de l'honnêteté de pensée dans tous les moments de la vie. J'apprécierai toujours ses conseils et sa bonne volonté. Je le remercie aussi pour m'avoir aidée à mieux comprendre la culture et l'idéologie françaises.

Je n'oublierai jamais les longues heures de discussion et de belles échanges entre mes deux chers directeurs de thèse. Voilà un bel exemple de coopération non seulement scientifique mais aussi humaine entre deux grands personnages. Qu'ils retrouvent ici toute mon estime et toute ma reconnaissance pour le bon encadrement qu'ils m'ont apporté.

Je remercie M. SuMing LI pour avoir accepté d'être dans mon jury de thèse. Je le remercie aussi pour son énorme gentillesse et pour sa constante disponibilité tout au long de la réalisation de ce travail. Merci de m'avoir facilité l'entrée au monde des polymères.

Je remercie Mme. Véronique BELLON et M. Philippe GUERIN d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci à M. Jean BONTOUX et à Mme. Maryvonne BRIGODIOT pour leur présence dans mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Ma plus profonde gratitude à mon Professeur et bon ami Dr. Gustavo VINIEGRA-GONZALEZ. Je ne le remercierai jamais assez pour son sincère soutien pendant toute ma carrière et pour continuer à favoriser la coopération entre le Mexique et la France.

Je serai toujours reconnaissante d'avoir été entourée d'autant de personnes de grande qualité scientifique et morale. Sans elles, je n'aurais jamais réussi à finir cette thèse dans des aussi bonnes conditions.

Je remercie Mlle. Pascale TALAMOND pour son amitié et pour son aide précieuse dans l'utilisation de la technique de HPLC. C'est grâce à elle que j'ai pu obtenir de bons résultats et d'avoir fini correctement une grande partie de mon travail.

Un long séjour dans un pays étranger n'est pas toujours facile. Je remercie à toutes les personnes qui m'ont offert leur chère amitié et qui m'ont aidé à mener une belle vie à Montpellier : Valérie CRASTRE, Christophe BRUSSET, Laure BADET, José Luis ESPARTERO, Héléne ROUSSIGNOL, Katarina MARCINCINOVA, Laure HANNIBAL, Rhama RICHDI, Wâffa KABBAJ. Je remercie particulièrement Allain et Nathalie CHAMPAILLER pour avoir accepté de corriger plusieurs fois la rédaction de cette thèse et pour leur gentillesse. Un affectueux merci à à Jesus CORDOVA et à Juan ESTRADA pour leur amitié et leur soutien lors des derniers mois de la réalisation de ma thèse. Toute ma sympathie à Carmen RAMIREZ pour ces intéressantes heures de discussion et son amitié. Merci aussi à Philippe, Hervé et Rocio pour leur amitié à la fin de mon séjour à Montpellier.

Je remercie Délfine ROSSI, David CAU, et Lélia NOTARDONATO pour m'avoir aidée à réaliser une grande partie du travail expérimental et pour m'avoir apportée leur amitié.

Je suis très reconnaissante aux amis qui m'ont soutenue de loin pendant ces années passées en France. Merci à mon cher ami Ernesto FAVELA et à Gerardo SAUCEDO, de l'équipe de Biotechnologie de la UAM-I. Merci à mes très chers amis Mary TREJO et Léobardo SERRANO. Merci aussi à Lupita RODRIGUEZ y Carlos MORALES pour leur accueil pendant mes séjours à Paris.

Je remercie tous mes amis qui m'ont aidée à m'intégrer rapidement à ce pays, surtout lors de la première année passée à Nancy. En particulier, merci à Nathalie et Philippe QUEMENEUR, Valérie BENOIT et Aurelio LORENÇO. Un grand merci à mes amis Pierre et Martine FRANÇOIS pour m'avoir montrée plusieurs aspects de la vie en France et pour m'avoir aidée pendant toutes ces années.

Je tiens à remercier à mon grand et cher ami Luis FERNANDEZ pour son soutien, sa solidarité lors des moments difficiles et pour tous les instants infiniment agréables que l'on a passés ensemble.

La vie serait inutile si l'on ne pouvait pas apprécier la richesse qui apporte la relation entre les êtres humains, sans importer leur origine et leur culture. Je suis très reconnaissante à ma chère Maria LAMBRAKI pour m'avoir offert sa générosité et son amitié profonde. Je la remercie aussi pour m'avoir fait découvrir un pays aussi beau et riche que la Grèce, de même que mon ami Panagiotis DALIAS à travers de toutes ces heures de discussion sur la vie. Je tiens à remercier encore une fois Sévastianos ROUSSOS pour m'avoir facilité mon séjour dans ce merveilleux pays.

Je remercie énormément mon cher ami Victor JUAREZ pour son aide et son soutien lors de la dernière étape de mon séjour à Montpellier. Je le remercie aussi pour m'avoir aidée à bien passer la difficile période de transition avant mon retour au Mexique.

Je remercie à toutes les personnes du Centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels de la Faculté de Pharmacie de Montpellier, pour la bonne ambiance et leur sympathie : Claire, Khadija, Grégoire, Xavier, Sylvie, Pascal, Sandrine, Illaria, Isabelle, Muriel. Merci aussi aux Ms. Christian BRAUD et Henri GARREAU pour leur soutien technique. Je remercie aussi le personnel du Laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM : Eric GIRAUD, Isabelle GAIME, Nathalie PUJET et Sylvain DENIS.

Enfin, ma plus sincère gratitude à toutes les personnes qui m'ont soutenue pendant ces belles années de séjour en France.

Liste des sigles et abréviations

- BSA** : Albumine de sérum de bœuf
- DSC** : Differential Scanning Calorimetry
- FDA** : Food and Drug Administration
- GPC** : Gel Permeation Chromatography
- HPCE** : High Performance Capillary Electrophoresis
- HPLC** : High Performance Liquid Chromatography
- MEB** : Microscopie Electronique à Balayage
- Mm** : Masse molaire moyenne
- MPa** : Mega Pascals
- PCL** : Poly (ϵ - caprolactone)
- PDA** : Potato Dextrose Agar
- PEA** : Poly (ester amide)
- PEG** : Poly (éthylène glycole)
- PGA** : Poly (acide glycolique)
- PHA** : Poly (hydroxyalkanoates)
- PHB** : Poly (hydroxy butyrate)
- PHV** : Poly (hydroxy valérate)
- PLA** : Poly (acide lactique)
- PLA50** : Poly (acide lactique) contenant 50% d'unités L
- PLA100** : Poly (acide lactique) contenant 100% d'unités L
- PLAGA** : Copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique
- PVC** : Poly (chlorure de vinyle)
- Tf** : Température de fusion
- Tv** : Température de transition vitreuse

TABLE DES MATIERES

	page
1.- INTRODUCTION	6
2.- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
2.1 Introduction	9
2.2 Les polymères d'acide lactique	10
2.2.1 Définition et structure	10
2.2.2 Synthèse	11
2.2.3 Propriétés	11
2.3 Dégradation chimique	12
2.3.1 Cinétique de dégradation	12
2.3.2 Processus de dégradation	13
2.4 Dégradation biologique	16
2.4.1 Définitions	16
2.4.2 Biodégradation des composés synthétiques	18
A) Les microorganismes	19
B) Les enzymes	22
2.4.3 Biodégradation des PLA	23
A) Dégradation enzymatique	24
B) Dégradation microbienne	29
C) Dégradation <i>in vivo</i>	32
2.5 Facteurs influençant la dégradation	33
2.6 Méthodes d'évaluation de la biodégradabilité	36
2.6.1 Considérations générales	36
2.6.2 Cas des matériaux polymères	39
2.7 Comparaison entre les dégradations chimique et enzymatique des PLA	40
2.8 Conclusion	41

3.- SELECTION DES MICROORGANISMES	43
3.1 Introduction	43
3.2 Sélection d'un champignon filamenteux	43
3.2.1 Conditions d'étude	43
3.2.2 Microorganismes	44
3.2.3 Evaluation de paramètres	46
3.2.4 Consommation d'acide D/L lactique sur milieu agar	46
3.2.5 Dégradation d'acide lactique en milieu liquide	47
3.2.6 Dégradation d'oligomères PLA50	49
3.2.7 Dégradation du copolymère PLA/GA	49
3.2.8 Description de <i>Fusarium moniliforme</i>	51
3.3 Sélection d'une bactérie	55
3.4 Criblage naturel de souches	56
3.4.1 Isolement de microorganismes naturels	57
3.4.2 Dégradation d'oligomères PLA50	57
3.5 Conclusion	58
4.- BIODEGRADATION MICROBIENNE DES RESIDUS DE L'HYDROLYSE CHIMIQUE DES PLA	59
4.1 Introduction	59
4.2 Matériels et Méthodes	59
4.2.1 Mise au point des conditions de dégradation	59
4.2.2 Matériaux étudiés	62
4.2.3 Préparation des milieux de dégradation	64
A) Milieu à base d'acide lactique	64
B) Milieu à base de dimère	64
C) Milieu à base d'oligomères	65
4.2.4 Inoculation des milieux de culture	65

4.2.5 Traitement des échantillons et paramètres évalués	67
A) Dégradation d'acide lactique et du dimère	67
B) Dégradation des oligomères	67
C) Mesure de pH	69
D) Matière sèche	69
E) Mise au point d'une méthode de dosage des résidus de dégradation du PLA	69
F) Electrophorèse capillaire	72
G) Mise au point d'une méthode de dosage des protéines par spectrofluorescence	72
H) Mise au point d'une méthode de dosage de l'activité estérasiq ue	73
4.3 Résultats	74
4.3.1 Comparaison entre l'HPLC et l'HPCE	74
4.3.2 Production de biomasse dans le milieu sans source de carbone	75
4.3.3 Dégradation des composés du type DL-lactique	75
A) Dégradation d'acide lactique	75
B) Dégradation du dimère lactyl lactique	76
C) Dégradation des oligomères PLA50	80
D) Conclusion	84
4.3.4 Dégradation des composés du type L-lactique	85
A) Dégradation d'acide lactique	85
B) Dégradation du dimère lactyl lactique	87
C) Dégradation des oligomères PLA100	89
D) Conclusion	97
4.3.5 Comparaison entre la dégradation du PLA50 et du PLA100	98
A) Vitesses initiales de disparition des substrats	98
B) Vitesses initiales d'apparition des résidus de la dégradation des oligomères	99
C) Conclusion	100

4.3.6 Croissance de <i>P. putida</i> sur les oligomères de PLA	101
4.4 Discussion	103
4.4.1 Cas général des polymères biodégradables	103
4.4.2 Dégradation des composés racémiques	104
4.4.3 Dégradation des composés à 100% d'unités L-lactique	107
4.4.4 Comparaison entre la dégradation PLA50 et celle du PLA100	109
4.5 Conclusion	109
5.- DEGRADATION DES POLYMERES	110
5.1 Introduction	110
5.2 Matériels et Méthodes	110
5.2.1 Conditions de dégradation	110
5.2.2 Matériaux étudiés	111
A) PLA50	111
B) Autres polyesters	111
5.2.3 Préparation des milieux de dégradation	113
A) Milieu à base des plaques massives de PLA50	113
B) Milieu à base des plaques d'autres polyesters	113
5.2.4 Inoculation des milieux de culture	113
5.2.5 Traitement des échantillons et paramètres évalués	113
A) Analyse du milieu	113
B) Analyse des plaques	114
5.3 Résultats	114
5.3.1 Dégradation de PLA50 sous forme de plaques massives	114
5.3.2 Dégradation de plaques massives d'autres polyesters biodégradables	120
5.4 Discussion	127
5.5 Conclusion	129

6.- DEGRADATION ENZYMATIQUE DES PLA	130
6.1 Introduction	130
6.2 Matériels et Méthodes	131
6.2.1 Mise au point des conditions de dégradation	131
6.2.2 Substrats étudiés	131
6.2.3 Enzymes utilisées	131
6.2.4 Préparation des milieux de dégradation	132
6.2.5 Traitement des échantillons et paramètres évalués	132
6.3 Résultats	133
6.3.1 Dégradation des oligomères PLA50	133
A) Apparition d'acide lactique	133
B) Apparition de dimère	133
C) Apparition de trimère	133
D) Evolution du pH	135
E) Fraction d'oligomères solubles	135
F) Conclusion	135
6.3.2 Dégradation des oligomères PLA100	137
A) Apparition d'acide lactique	137
B) Apparition de dimère	137
C) Apparition de trimère	137
D) Evolution du pH	137
E) Fraction d'oligomères solubles	137
F) Conclusion	140
6.3.3 Dégradation du polymère PLA50	141
6.4 Discussion	147
6.5 Conclusion	148

7.- BIOASSIMILATION DES PLA PAR DES MICROORGANISMES ISOLES DU SOL	149
7.1 Introduction	149
7.2 Matériels et Méthodes	149
7.2.1 Matériaux étudiés	149
7.2.2 Conditions de dégradation	149
A) Dégradation des plaques massives	149
B) Dégradation des oligomères	150
7.2.3 Traitement des échantillons et paramètres évalués	150
A) Plaques massives	150
B) Milieux à base d'oligomères	150
7.3 Résultats	150
7.3.1 Analyse des plaques par MEB	150
7.3.2 Dégradation des oligomères PLA	152
7.4 Discussion	154
7.5 Conclusion	157
8.- CONCLUSION GENERALE	158
9.- REFERENCES	163
ANNEXES	171

INTRODUCTION

1.- INTRODUCTION GENERALE

Les matériaux polymères, appelés plus communément "plastiques"*, sont largement utilisés dans plusieurs domaines de l'activité humaine car ils sont légers, résistants, chimiquement inertes et bon marché. Ces caractéristiques sont dues à leur masse molaire élevée, à leur stabilité chimique et à leur très faible densité par rapport aux matériaux minéraux. Néanmoins, la résistance des matériaux plastiques au vieillissement chimique et à l'imputrescibilité devient un problème sérieux lorsque leur utilisation n'est plus nécessaire. En effet, la plupart des déchets plastiques restent pratiquement inchangés dans les milieux naturels pendant peut-être plus de 20 ans. Ils sont parmi les formes les plus visibles et volumineuses des déchets solides.

A titre d'exemple, il a été signalé par HUANG et coll. (1990) qu'en 1988 presque 30% des 25 millions de tonnes des matières plastiques produites aux E.U. ont été utilisées comme matériaux d'emballage. Les déchets produits après leur utilisation sont souvent rejetés dans les milieux naturels (sol, mer, lacs) de façon non discriminée, parfois avec des conséquences nocives. Au niveau mondial, la production des plastiques a approché 78 millions de tonnes pour 1991 (PIETRASANTA, 1994).

Seules, la mise en décharge et l'incinération sont les voies d'élimination des déchets plastiques utilisées à grande échelle. Or, ces méthodes ne sont pas toujours exemptes d'effets négatifs pour l'environnement.

La mise en décharge est une pratique qui est de plus en plus contestée à cause de la diminution des surfaces disponibles et du risque de contamination des eaux souterraines (KLEMCHUK, 1990).

L'incinération peut être une bonne voie d'élimination des déchets plastiques, à condition que les procédés soient bien maîtrisés. En effet, il a été démontré à l'échelle du laboratoire que lorsque des plastiques purs ou mélangés sont incinérés efficacement, ils libèrent des effluents plus propres et moins toxiques que certains produits naturels (MAGEE, 1989). Cependant, il est difficile de considérer que ces résultats seront les mêmes à grande échelle. Les conditions d'un incinérateur industriel sont très variables et il est impossible d'arriver à une incinération idéale. Ainsi, la toxicité des produits gazeux est mal contrôlée et, de plus, les cendres résiduelles de l'incinération doivent être traitées par un autre moyen (MAGEE, 1989). Le cas typique est celui de l'émission de composés toxiques (dioxine, furane, gaz acides, poly-

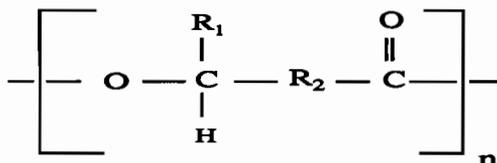
* Le terme "plastiques" est scientifiquement impropre mais d'usage courant pour désigner les matériaux polymères ou macromoléculaires. Nous l'utiliserons dans la suite pour sa simplicité.

chlorobenzènes) lors de l'incinération du poly(chlorure de vinyle) (PVC).

Le recyclage des matériaux polymères a été proposé comme une troisième voie d'élimination, mais il conduit souvent à des produits ayant une qualité inférieure à celle des composés originaux. De plus, il est nécessaire d'établir des systèmes efficaces de collecte pour faciliter la récupération des déchets purement plastiques (VERT, 1991).

Dans le domaine des polymères, la notion de "biodégradation" est apparue relativement récemment. Les matériaux plastiques traditionnels ne sont pas "biodégradables". Néanmoins, le terme de "polymères biodégradables" a commencé à être employé dans les années 70, souvent de manière abusive. Par conséquent, la synthèse de nouveaux polymères a eu, depuis, un intérêt croissant, l'idéal étant d'obtenir des matériaux à durée de vie programmable. L'utilisation de tels polymères est donc limitée à des applications bien spécifiques pour lesquelles une courte durée de vie est nécessaire. Par exemple, en agriculture, la libération prolongée des nutriments, de pesticides, herbicides, etc. ; en emballage, les sacs poubelle, les bouteilles ; enfin, dans le domaine biomédical, les sutures, les implants, etc...

La "biodégradabilité" peut être obtenue par la présence des liaisons hydrolysables dans les chaînes macromoléculaires. C'est pourquoi les efforts ont été concentrés sur la famille des polyesters aliphatiques dont la structure de base est la suivante :



Les polyesters aliphatiques les plus fréquemment considérés correspondent aux groupements R_1 et R_2 suivants:

Nom	R_1	R_2
Poly (acide glycolique) : PGA	H	--
Poly (acide lactique) : PLA	CH_3	--
Poly (ϵ - caprolactone) : PCL	H	$(\text{CH}_2)_4$
Poly (hydroxy butyrate) : PHB	CH_3	CH_2
Poly (hydroxy valérate) : PHV	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2$	CH_2

L'exemple de tentative d'application le plus connu dans le domaine de l'emballage est celui des bouteilles pour shampoing à base d'un copolymère PHB/HV (Biopol[®]) produit par une

bactérie. Le PGA, le PLA et leurs copolymères sont quant à eux commercialisés comme sutures chirurgicales (Dexon[®] par American Cyanamide ou Viticar[®] par Ethicon, entre autres) ou comme implants (Phusis).

Plusieurs études ont démontré que l'hydrolyse du PLA dans des milieux aqueux modèles ou *in vivo* produit des petites chaînes hydrosolubles qui peuvent être assimilées ou excrétées par les cellules animales (COFFIN et MC GINITY, 1992; LI et coll., 1990a et b; VERT et coll., 1991). Récemment, les polymères du type PLA cristallin ont quitté le stade des applications thérapeutiques à haute valeur ajoutée (70.000 F/kg) pour le domaine des polymères de commodité (emballage et autres applications grande diffusion des matériaux plastiques) avec l'apparition des ECOPLA (Gargill, USA) dont le coût annoncé est de l'ordre de 15 à 20 F le kg. Cependant, la dégradation microbienne du PLA, ainsi que l'assimilation par des microorganismes des produits intermédiaires, n'ont pas été démontrées de manière approfondie, même si des attaques par quelques enzymes (WILLIAMS et MORT, 1977) et notamment la protéinase K bactérienne (REEVE et coll., 1994) ont été rapportées.

A l'heure actuelle, seule la biodégradation du produit de dégradation ultime, l'acide lactique, et l'hydrolyse chimique des polymères PLA pouvant le générer sont démontrées de manière scientifiquement contrôlée et susceptible de se produire dans des conditions réelles (compostage, enfouissement ou abandon dans le sol).

Dans le cadre de ce travail, nous avons abordé l'étude comparée de la dégradation et de la biodégradation de polymères d'acide lactique en présence de microorganismes dans le but de :

- Démontrer le caractère "bioassimilable" des résidus de la dégradation chimique du PLA,
- Mettre en évidence la possible accélération de la dégradation chimique grâce à la présence des microorganismes,
- Démontrer l'effet synergique des cultures mixtes de microorganismes sur la biodégradation,
- Apprécier plus généralement les mécanismes de dégradation en présence d'enzymes pures à titre d'exemple.

Une analyse bibliographique exhaustive nous a aidé à faire le point sur l'avance scientifique et les différentes méthodes analytiques mises en œuvre pour suivre le devenir des matériaux polymères dans un environnement défini.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Introduction

L'accumulation des déchets plastiques dans l'environnement pose un problème qui préoccupe de plus en plus les communautés urbaines, les organisations politiques et les écologistes, comme le montrent les nombreuses revues bibliographiques concernant les matériaux de synthèse dégradables publiées ces dernières années (HUANG et coll., 1990; KLEMCHUK, 1990; SATYANARAYANA et CHATTERJI, 1993; ALBERTSSON, 1992; TIMMINS et LENZ, 1994; LENZ, 1993; JOHNSON et coll., 1993; HOCKING, 1992; entre autres).

Les efforts réalisés dans ce domaine ont abouti à différents matériaux dégradables :

- Biodégradables, fondés sur le principe selon lequel ce que la Nature sait fabriquer, elle sait le recycler par biodégradation : mélanges de polymères naturels avec des polymères synthétiques (polyéthylène/amidon), polymères à base d'amidon, polyesters aliphatiques bactériens.
- Biodégradables, fondés sur l'aptitude de microorganismes à attaquer certains polymères de synthèse : polymères de vinyle-alcool ou des polymères contenant des groupements fonctionnels sensibles à l'attaque microbienne (esters, amides, ...).
- Dégradables, fondés sur une dégradation chimique : inclusion dans la chaîne polymère de composés sensibles à la lumière (copolymères éthylène-CO, ou avec des groupements cétoniques ; additifs photosensibles)(photodégradables).

Lors de cette étude, nous nous sommes concentrés sur les polymères d'acide lactique, appartenant aux polymères synthétiques actuellement considérés comme "dégradables". L'analyse bibliographique examinera les points suivants :

- a) Description des polymères d'acide lactique.
- b) Dégradation chimique.
- c) Biodégradation.
- d) Facteurs influençant la dégradation.
- e) Méthodes d'évaluation.

2.2 Les polymères d'acide lactique

2.2.1 Définition et structure

Les polymères d'acide lactique (PLA) appartiennent à la famille des poly(α -hydroxy acides) dont les unités de répétition sont unies par des liaisons ester (Fig. 2.1).

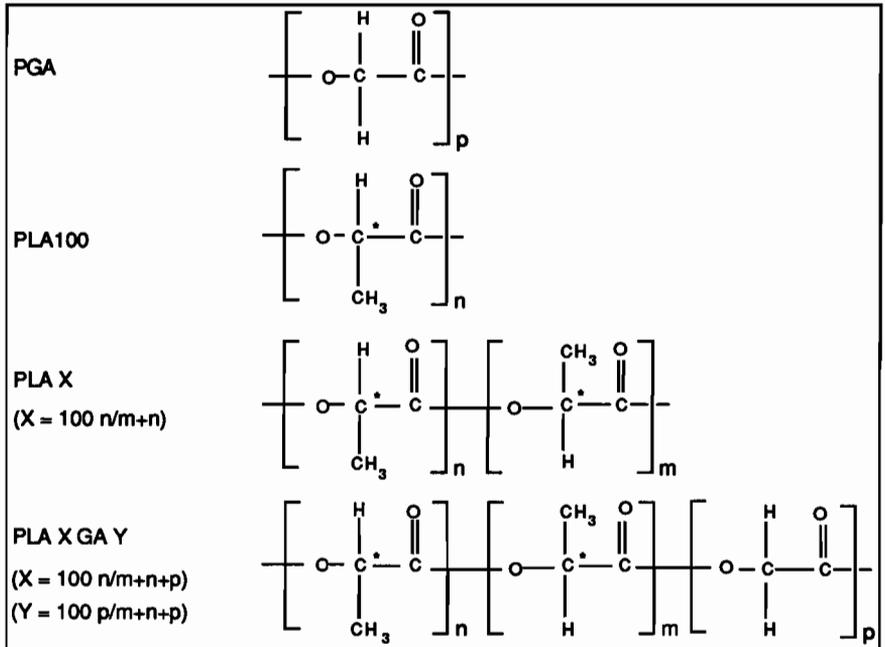


Fig. 2.1 Les poly(α -hydroxy acides) dérivés de l'acide glycolique et des acides lactiques (VERT, 1991).

Les PLA sont désignés PLAX, où X indique le pourcentage d'unités de répétition d'acide lactique sous forme L. En jouant sur la configuration des atomes de carbone asymétriques, sur les masses molaires, sur la polymolécularité, sur les mélanges oligomères/polymères...il est possible d'obtenir des matériaux se présentant sous formes de pâtes visqueuses, de films, de poudres ou de pièces massives plus ou moins rigides à température ambiante. Leur durée de vie peut aller de quelques semaines à quelques années, selon l'enchaînement d'unités, la configuration, la morphologie et les conditions d'utilisation (VERT, 1991).

La copolymérisation des PLA avec d'autres polyesters de la même famille (PGA, PCL) donne lieu à une gamme de produits présentant une dégradabilité variable (VION et coll., 1986).

2.2.2 Synthèse

Les polymères d'acide lactique peuvent être obtenus par deux moyens différents (LI et coll., 1990):

- a) Polycondensation directe d'acide lactique, source de polymères de faibles masses molaires et très sensibles à l'humidité.
- b) Polymérisation du dimère cyclique, le lactide, source de polymères de masses molaires élevées.

Pour des amorceurs convenablement choisis, la polymérisation respecte la chiralité (PENCZEK et coll., 1981; KRICHELDORF et JONTE, 1983).

2.2.3 Propriétés

Les propriétés des PLA dépendent en général des masses molaires, de la proportion des énantiomères L et D dans les chaînes et de leur distribution (aléatoire ou plus ou moins ordonnée).

Les homo poly(L-acide lactique) et poly(D-acide lactique) sont intrinsèquement cristallins, bien qu'ils puissent être amorphes après trempage. L'introduction dans leurs chaînes d'unités de configuration opposée ou d'unités comonomères (GA, par exemple) diminue la cristallinité jusqu'à l'annuler lorsque la proportion d'unités étrangères devient suffisante (VERT, 1991).

La température de transition vitreuse (T_v) des PLAX est située vers 60°C et est relativement indépendante de la composition en énantiomère. Par contre, elle dépend de la composition en unités comonomères (la T_v du PLA37,5GA25 est de l'ordre de 34°C). La T_v dépend aussi de la masse molaire. Ainsi, la T_v s'abaisse jusqu'à 0°C pour les très petits oligomères des PLAX. La même tendance est observée pour les températures de fusion (T_f). Le PLA100 de hautes masses fond bien au-dessus d'un composé analogue de plus faibles masses (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 Propriétés thermiques du PLA100

Masse molaire moyenne	T_f (°C)	T_v (°C)
5.300	156	55
20.000	174	59
691.000	186	64

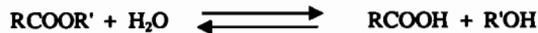
(CELLI et SCANDOLA, 1992)

2.3 Dégradation chimique des polymères d'acide lactique

La plupart des études de la dégradation des PLA et de leurs copolymères avec l'acide glycolique ont été réalisées en simulant les conditions physiologiques du corps humain (37°C et pH 7,4 dans un tampon phosphate ou dans du sérum physiologique)(LI et coll., 1990 ; KENLEY et coll., 1987 ; VERT et coll., 1991 ; entre autres).

2.3.1 Cinétique de dégradation

Du point de vue moléculaire, l'hydrolyse des esters est une réaction bien connue en chimie organique :



Cette réaction peut être catalysée par des bases et par des acides. Ainsi, le produit de la réaction, le RCOOH, par son acidité en milieu aqueux, est aussi capable d'accélérer l'hydrolyse par un mécanisme connu comme "autocatalyse".

Dans le cas des polyesters aliphatiques, la coupure des chaînes au niveau de la liaison ester est autocatalysée par les groupements carboxyle terminaux présents initialement ou produits par la dégradation elle-même :



Pour des réactions autocatalytiques, la vitesse de dégradation peut s'exprimer par l'équation cinétique suivante (BUCHHOLZ , 1992) :

$$d\{E\} / dt = - d\{\text{COOH}\} / dt = - k \{\text{COOH}\} \{\text{H}_2\text{O}\} \{E\}$$

où {E}, {COOH}, et {H₂O} représentent les concentrations en ester, en groupements carboxyle terminaux et en eau, respectivement. L'intégration de cette équation aboutit à la relation :

$$\ln \overline{Mn} = \ln \overline{Mn}^0 - k_2 t$$

où k_2 est la constante de réaction hydrolytique et \overline{Mn} est la masse molaire moyenne en nombre et \overline{Mn}^0 est la masse molaire moyenne initiale.

Ce modèle ne tient pas compte des changements de l'absorption d'eau et des variations dimensionnelles pendant la dégradation, mais il est adéquat pour démontrer l'autocatalyse. Des déviations surviennent une fois que la perte de masse devient importante.

KENLEY et coll. (1987) ont observé que, dans le cas de la dégradation des copolymères PLAGA, la vitesse de la perte de masse molaire suit un comportement de pseudo premier ordre où le nombre de coupures des liaisons ester par chaîne (X) est donné par l'expression :

$$\ln (X) = -2,04 - 1,08t \text{ (sem}^{-1}\text{)}$$

2.3.2 Processus de dégradation

Du point de vue macroscopique, le mécanisme principal d'hydrolyse chimique des polyesters aliphatiques se produit dans la masse et non préférentiellement à la surface, selon le concept d'érosion. La dégradation hydrolytique se déroule en deux étapes : une première phase correspondant à l'hydrolyse aléatoire des liaisons ester accompagnée d'une diminution de la masse molaire et, une deuxième phase correspondant à un début de perte de matière lorsque les fragments moléculaires deviennent solubles.

SAWAN et BARRY (1988) ont trouvé que la libération de l'acide lactique présente une période d'induction de 40 à 60 jours. Ils en ont conclu qu'une masse molaire critique doit être atteinte avant que l'apparition de sous-produits ne soit détectée.

Par ailleurs, COFFIN et MC GINITY (1992) ont observé que le pH est un bon indicateur de l'hydrolyse du PLA : au fur et à mesure que le polymère se dégrade, il y a formation de groupements carboxyle.

Enfin, KENLEY et coll. (1987) ont noté que les profils de perte de matière et de masse molaire d'implants cylindriques de PLA25GA50 montrent une période d'induction où il n'y a pas de changements. Pour la perte de masse molaire, la période est courte et elle représenterait le temps nécessaire pour que l'eau imbibe complètement la structure polymère. Pour la perte de matière, la période d'induction est longue confirmant ainsi que l'hydrolyse se fait dans la masse.

La libération différée de fragments moléculaires solubles est observée plus particulièrement dans le cas des matériaux massifs où l'accumulation des sous-produits de la dégradation provoque une différenciation entre l'intérieur et la surface par suite de phénomènes de réaction-diffusion conduisant à une autocatalyse relativement plus importante au centre.

Ces phénomènes ont été étudiés par LI et coll. (1990) dans le cas de la dégradation de plaques massives. Ces auteurs ont observé une autocatalyse plus importante à l'intérieur qu'à la surface qui a été expliqué par la séquence d'événements suivante (Fig. 2.2) :

- 1.- Initialement, l'échantillon est homogène. Dès la mise en contact avec le milieu aqueux, il absorbe l'eau et les liaisons ester s'hydrolysent. A ce moment, la surface est supposée se dégrader plus vite car il y a plus d'eau absorbée à ce niveau.
- 2.- Des produits de dégradation se forment alors en surface comme au cœur, mais ceux localisés près de la surface peuvent plus facilement diffuser vers le milieu extérieur avant d'être complètement dégradés et de libérer leur pouvoir catalytique potentiel.
- 3.- Une différenciation entre la surface et l'intérieur apparaît, et elle s'accroît au fil du temps, le cœur s'hydrolysant de plus en plus vite par rapport à la surface. L'intérieur évolue progressivement vers des oligomères de faibles masses molaires (1000 à 3000).
- 4.- La couche superficielle s'affine ensuite avec la propagation de la dégradation vers l'extérieur. Lorsque la surface devient perméable aux oligomères de l'intérieur, une perte massive de matière est observée.
- 5.- L'échantillon se vide progressivement par dissolution des oligomères solubles dans le milieu extérieur pour ne laisser qu'une coquille creuse.

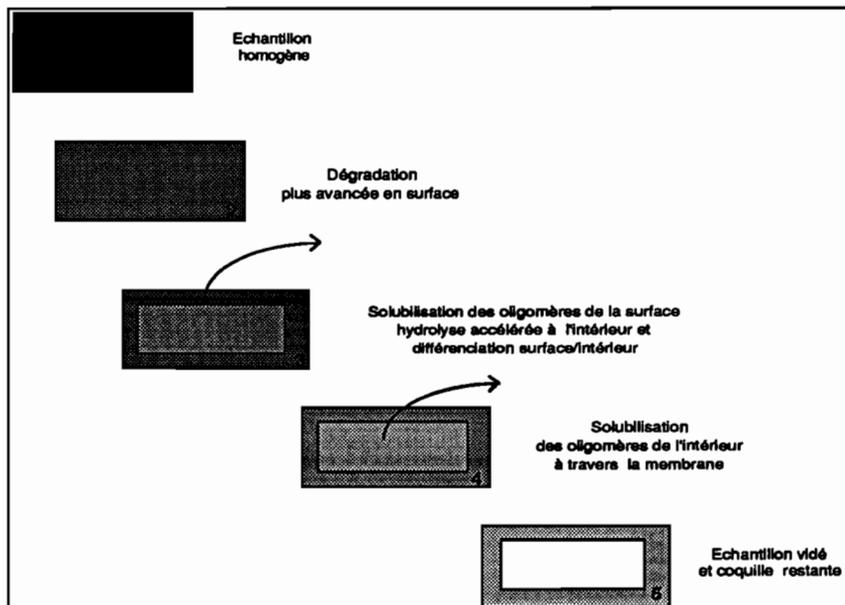


Fig. 2.2 Représentation schématique de l'hydrolyse des matériaux massifs des PLA/GA (LI et coll., 1990).

Il est supposé que la diffusion des oligomères est limitée à une couche dont l'épaisseur dépend à la fois des coefficients de diffusion des macromolécules dans la matrice du polymère et de la vitesse de dégradation. De cette façon, plus l'hydrolyse est lente, plus importante sera l'épaisseur de la couche superficielle moins dégradée (VERT et coll., 1994).

Dans le cas des polymères intrinsèquement amorphes, la formation de la coquille se réalise pendant les étapes finales de la dégradation, lorsque tout le matériel interne devient soluble dans le milieu extérieur et diffuse à travers la membrane semi-perméable.

Dans le cas des polymères semi-cristallins, la dégradation interne est plus rapide, mais le matériel cristallin résiduel empêche la formation de la coquille.

La formation d'une structure creuse est donc loin d'être un phénomène général de dégradation. Beaucoup d'autres caractéristiques secondaires, telles que la porosité, la taille ou la présence d'additifs, peuvent favoriser ou défavoriser la différenciation cœur/surface.

Il peut notamment y avoir d'autres phénomènes tels que le changement de morphologie pendant l'hydrolyse. En effet, il a été observé que la cristallinité augmente avec le temps de dégradation comme résultat de la rupture préférentielle :

- des séquences de GA, dans le cas des copolymères PLA/GA (THERIN et coll., 1992).
- des régions amorphes, dans le cas des PLAX (LI et coll., 1990).

La coupure préférentielle des chaînes amorphes est confirmée par l'analyse des thermogrammes. L'endotherme de fusion est très faible au départ et son aire, donc la cristallinité, augmente avec le temps de dégradation (KULKARNI et coll., 1971; LI et coll., 1990).

De même, FUKUZAKI et coll. (1989) ont étudié la dégradation de PLAX avec X comprise entre 50 et 98 et de masses molaires variées. Ils ont observé que la perte de matière du PLA98 et du PLA92 a un comportement parabolique, ce qui implique que la dégradation hydrolytique intervient préférentiellement dans les régions amorphes. Dans ce cas, la dégradation est très influencée par la masse molaire. Si la masse molaire initiale augmente, la vitesse de dégradation diminue.

En résumé, le mécanisme de dégradation préférentielle au centre est basé sur des phénomènes de diffusion-réaction ayant comme conséquence une dépendance de la taille. Ainsi, les matériaux massifs se dégradent plus vite que des matériaux de taille plus petite (films, poudres, nanoparticules, etc...). Le phénomène principal est le contrôle de la libération de matière de faibles masses molaires lorsque le seuil de solubilité est atteint par les fragments moléculaires.

2.4 Dégradation biologique

Actuellement, il existe une grande confusion dans l'utilisation des termes relatifs aux phénomènes de dégradation des matériaux polymères. Pour cette raison, nous avons jugé nécessaire de présenter en premier lieu quelques définitions utiles. Deuxièmement, nous décrirons le procédé général de biodégradation des composés synthétiques dans les milieux naturels, comprenant l'action des microorganismes et de leurs enzymes. Finalement, nous présenterons les connaissances actuelles sur la dégradation biologique des PLA par des microorganismes, par des enzymes et *in vivo* chez des animaux supérieurs.

2.4.1 Définitions

Dans le domaine des matériaux polymères, le terme de "biodégradabilité" connaît actuellement un usage abusif en raison des intérêts industriels et commerciaux. Une suggestion complète de terminologie a été proposée par VERT et GUERIN (1992) (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 Dégradation des polymères synthétiques. Définitions

Phénomène de dégradation	Suggestions	
	Biomédical	Environnement
<i>Délitement du matériau sans altération des macromolécules synthétiques</i>		
- fragmentation en morceaux ou en poudre par voie physique	Fragmentable	Fragmentable
par voie biologique	Biofragmentable	Biofragmentable
- par solubilisation	Erodible	Erodible
sans élimination rénale	Absorbable	--
avec élimination rénale	Excrétable	--
<i>Délitement du matériau avec dégradation des macromolécules</i>		
- et formation d'oligomères ou de petites molécules dont le devenir n'est pas établi par voie chimique	Dégradable	Dégradable
par voie biologique	Biodégradable	Biodégradable
- et formation de molécules assimilées par les cellules	Biorésorbable	Bioassimilable
assimilées par les organismes vivants	Biorésorbable	

(VERT et GUERIN, 1992)

D'après ces propositions, on considère que la dégradation refléterait l'altération d'une ou plusieurs propriétés indispensables à l'usage auquel est destiné le matériau polymère. Le terme de "biofragmentation" serait mieux adapté à un phénomène macroscopique. La "biorésorption", dans le cas de matériaux polymères d'intérêt thérapeutique, correspondrait à une élimination par un organisme animal des résidus de dégradation par voies naturelles. Dans le cas des matériaux plastiques et de l'environnement, l'idéal serait d'employer le terme de "bioassimilation", c'est-à-dire une dégradation jusqu'à des formes moléculaires réutilisables par les écosystèmes (VERT, 1991; VERT et GUERIN, 1992).

Il faut cependant garder à l'esprit que la biodégradabilité ne peut être qu'une propriété supplémentaire pour un produit dont le premier rôle est d'être au service de l'homme. Avant d'être biodégradable, un composé polymère doit être un matériau. Il s'agirait donc de concevoir des systèmes stables pendant leur utilisation, et après une période d'induction, dégradables jusqu'à assimilation totale. L'induction peut être chimique (photodégradation, oxydation, hydrolyse...) ou biologique (intervention des microorganismes). Ainsi, il faut qu'à un moment ou un autre, les produits de dégradation soient repris par des microorganismes pour achever l'élimination.

Des définitions concernant le phénomène global de biodégradation des composés chimiques dans l'environnement ont été proposées par d'autres auteurs (GILBERT et WATSON, 1977; GRADY, 1985) :

Biodégradation : dégradation moléculaire d'une substance organique, normalement dans un milieu aqueux, résultant de l'action complexe d'organismes vivants.

Biodégradabilité : habilité d'une substance organique à subir une biodégradation.

Biodégradation primaire ou fonctionnelle : biodégradation d'une substance à un degré suffisant pour réduire les propriétés caractéristiques de la molécule. Dans la pratique, ceci sera déterminé comme la perte d'une fonction spécifique et qui sera souvent reliée à une biodégradation acceptable pour l'environnement.

Biodégradation environnementalement acceptable : biodégradation d'une substance à un degré tel que des propriétés non acceptées par l'environnement sont perdues.

Biodégradation ultime : dégradation d'un composé organique jusqu'à la production de composés minéraux : CO₂, eau, sels minéraux ou d'autres éléments présents et des produits associés au métabolisme normal des microorganismes.

Minéralisation complète : transformation totale du composé organique jusqu'aux formes minérales décrites ci-dessus (oxydes des autres éléments ; nitrate, sulfate...). Ce phénomène n'est pas observé dans l'évaluation de la biodégradabilité car seule la biodégradation ultime est considérée : une partie du composé est transformée en cellules nouvelles (biomasse).

Bioélimination : élimination d'un composé d'une solution aqueuse ou d'une suspension pendant le traitement biologique. Ce procédé peut ne pas impliquer une biodégradation (e.g. adsorption).

Acclimatation : procédé d'adaptation grâce auquel un microorganisme développe la capacité de dégrader un composé.

Biomasse : matériel vivant présent.

Récalcitrance : résistance inhérente d'un composé à un degré quelconque de biodégradation.

Persistance : susceptibilité d'un composé à n'être biodégradé que dans certaines conditions spécifiques.

Co-métabolisme : mécanisme dans lequel l'enzyme produite par un microorganisme pour dégrader un composé sert aussi pour dégrader une autre substance dont les métabolites intermédiaires peuvent être utilisés pour l'induction d'autres enzymes.

Des efforts ont été réalisés pour la standardisation des définitions par quelques organismes (AFNOR, ASTM, DIN, ISO, entre autres).

2.4.2 Biodégradation des composés synthétiques

En général, la dégradation biologique partielle des substances organiques est insuffisante. L'environnement est constamment rempli de fragments résiduels provenant des molécules originales, avec souvent des effets inconnus à long terme. La minéralisation complète des substances est alors un des principaux besoins pour le maintien d'un équilibre biologique dans la nature (PITTER, 1976).

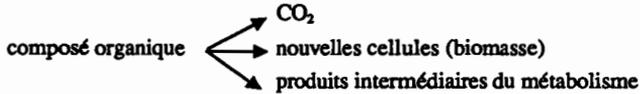
Pour considérer l'acceptabilité d'un produit dans l'environnement, il est nécessaire de prendre en compte ses propriétés biologiques et physico-chimiques. Il doit être démontré que sa présence ou celle des composés intermédiaires ne représente aucun danger pour un environnement donné.

Même si des phénomènes chimiques tels que la photo-oxydation jouent un rôle dans la transformation d'un composé organique, peu d'entre eux peuvent réaliser la minéralisation totale dans l'environnement. L'activité microbienne sera toujours indispensable. Néanmoins, cette transformation peut ne pas être anodine. En effet, un composé non toxique au départ (les polymères le sont généralement) peut le devenir par action biologique en raison de sa décomposition en sous-produits.

Un facteur important pour la détermination de la biodégradabilité d'un composé est la durée de son séjour dans l'environnement. La plupart des composés naturels (biogéniques) ont été

présents pendant des millions d'années et des microorganismes capables de les minéraliser ont eu le temps d'apparaître quelque part. Certains composés produits par l'industrie moderne peuvent ressembler aux composés naturels et être biodégradés facilement. D'autres également étrangers à la biosphère (xénobiotiques) posent de graves problèmes étant donné qu'ils peuvent provoquer une accumulation nocive dans l'environnement.

La biodégradation d'un composé organique est schématisée comme suit :



A) Les microorganismes

Le terme de microorganisme recouvre un ensemble très hétérogène d'êtres vivants qui ont une taille microscopique et sont en majorité unicellulaires. Les microorganismes appartiennent à deux grands groupes distincts : a) les procaryotes, qui ne possèdent pas de noyau ; b) les eucaryotes, dont l'ADN est contenu dans un noyau délimité par une double membrane. Parmi les procaryotes, on distingue les Eubactéries (comprenant les bactéries pourpres, les cyanobactéries et les myxobactéries) et les Archéobactéries. Les eucaryotes comprennent les protozoaires (aussi appelées protistes), les algues unicellulaires et les champignons (unicellulaires ou non).

Les microorganismes ont des caractéristiques communes à tous les êtres vivants : a) ils sont capables de se reproduire ; b) ils peuvent consommer et assimiler des substances nutritives et les métaboliser pour produire de l'énergie nécessaire pour se développer ; c) ils excrètent des métabolites ; d) ils peuvent s'adapter à des changements de leur milieu environnant ; et e) ils sont capables de subir des mutations génétiques (PELCZAR et coll., 1982).

Les microorganismes sont très répandus dans la nature. Ils sont transportés par les courants d'air ascendant depuis la surface de la terre jusqu'aux parties les plus élevées de l'atmosphère; ils sont dans les sédiments marins des très grandes profondeurs; ils sont dans les sols fertiles, transportés par les rivières et ils sont présents dans toutes les activités humaines. Ils sont responsables du recyclage des matériaux organiques complexes synthétisés par les animaux, les plantes ou par d'autres microorganismes.

Ces organismes sont très utiles pour étudier la physiologie, la génétique et les réactions biochimiques qui sont la base de la vie. En effet, leurs processus métaboliques et leur mode d'utilisation de l'énergie sont fondamentalement les mêmes que ceux des animaux et ceux des plantes supérieures.

Or, la source d'énergie varie selon les organismes. Les plantes se caractérisent par leur capacité à utiliser l'énergie solaire par le processus de photosynthèse, alors que les animaux ont besoin de substances organiques. Il existe des microorganismes dénommés autotrophes, qui, comme les plantes, utilisent des sources d'énergie d'origine minérale. Il existe aussi des microorganismes dits hétérotrophes qui puisent leur énergie soit des sous-produits métaboliques des microorganismes autotrophes, soit des multiples composés organiques disséminés dans l'environnement. Par ailleurs, en fonction de leurs besoins en oxygène, les microorganismes peuvent être aérobies, anaérobies ou facultatifs.

Les champignons filamenteux sont des organismes eucaryotes dépourvus de chlorophylle, dont l'appareil végétatif est sous forme de thalle septé ou non, et en forme de filaments. Ces champignons appartiennent au groupe des Deutéromycètes ou des champignons imparfaits dont la reproduction sexuée n'est pas connue. La reproduction asexuée, elle, se fait au moyen de conidies ou spores (BOTTON et coll., 1985).

Les bactéries sont des organismes procaryotes unicellulaires ou groupées en colonies qui se multiplient généralement par fission binaire. Les cellules peuvent se présenter sous diverses formes : bacilles, cocci, vibrions, etc... (PELCZAR et coll., 1982).

Les champignons filamenteux et les bactéries ont évolué pendant des millions d'années et durant ce temps, ils ont développé l'habilité à dégrader toute classe de composés organiques. Toutefois, certains composés, comme la lignine, sont dégradés très lentement. Globalement, tous les microorganismes ont une période d'adaptation au substrat avant que la biodégradation se réalise (phase de latence). Simultanément, il y a la production d'enzymes de dégradation. Cette production est plus importante chez les microorganismes en contact avec le composé organique pour la première fois (GILBERT et WATSON, 1977).

Le facteur environnement est déterminant pour l'expression de la capacité des microorganismes à consommer certains substrats. En effet, même des composés biogéniques (cellulose, amidon) peuvent devenir non-biodégradables sous certaines conditions (modifications chimiques, par exemple). En conséquence, pour que la biodégradation ait lieu trois facteurs principaux doivent être réunis :

- a) Présence d'un microorganisme capable de dégrader le composé.
- b) Synthèse des enzymes responsables de la dégradation.
- c) Des conditions environnementales favorables.

Le phénomène de biodégradation est donc très spécifique. Des composés artificiels peuvent également être biodégradés par des enzymes ayant une faible spécificité.

Pour que des composés inertes, tels que les alcanes, puissent être dégradés, certains microorganismes, en particulier les bactéries aérobies, doivent être capables de catalyser d'abord une oxydation avant d'intégrer les sous-produits aux voies biochimiques normales (β -oxydation). D'autres biodégradations peuvent se réaliser dans des conditions anaérobies.

La présence dans un milieu de culture d'un composé facilement assimilable, tel le glucose, peut rendre un composé synthétique beaucoup moins biodégradable. Par exemple, il a été démontré que la présence de glucose fait diminuer la vitesse de dégradation de composés phénoliques (GILBERT et WATSON, 1977). Par contre, d'autres composés peuvent faire augmenter la biodégradation (vitamines, co-facteurs, traces minérales), surtout dans le cas des bactéries en culture pure, où il est nécessaire d'utiliser des substrats complexes comme l'extrait de levure. Dans les cultures mixtes, la lyse d'autres microorganismes peut être une source de nutriments.

Si un microorganisme hétérotrophe se montre incapable d'utiliser un composé comme source de carbone, il meurt. La sélection de microorganismes est basée sur ce principe. Dans une culture mixte, l'utilisation de sources de carbone et d'énergie alternatives fournies par l'action d'autres microorganismes est possible. Dans ce cas, il s'agit d'un "co-métabolisme" pouvant aider à transporter le composé ou ses sous-produits à l'intérieur de la cellule et à favoriser leurs transformations ultérieures. Du fait de ces interactions microbiennes, il est conseillé d'évaluer la biodégradabilité d'un composé en cultures mixtes (GRADY, 1985).

En effet, la minéralisation complète d'un composé xénobiotique peut nécessiter l'action de plusieurs microorganismes de façon à disposer de toute la machinerie génétique, donc enzymatique, indispensable. Cette association de microorganismes est appelée "consortium" avec des actions synergiques. Dans une communauté microbienne, les interactions entre les microorganismes dépendent des besoins nutritionnels de chacun. Il peut exister trois types de microorganismes : dominants, associés et incidentaux. Les premiers sont ceux qui ont un impact décisif sur la biodégradabilité. Les seconds dépendent des premiers pour survivre mais fournissent en échange des facteurs de croissance ; les troisièmes bénéficient des métabolites produits par les autres.

Les interactions naturelles entre microorganismes peuvent conduire à un transfert d'information génétique lorsque deux microorganismes de la même espèce se lient pendant un certain temps. L'apparition de voies alternatives de dégradation est favorisée par ce moyen. C'est ce qu'on appelle "génie génétique naturel" (GRADY, 1985).

B) Les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques produits par les cellules (animales, végétales, microbiennes) pour faciliter certaines réactions biochimiques.

Du point de vue structural, les enzymes sont des protéines spécialisées dont les masses molaires peuvent varier entre 10^3 et 10^6 Da. Dans le monde vivant, chacune d'entre elles a une fonction chimique spécifique. Elles sont classées en 6 groupes selon leur activité : hydrolases, estérases, isomérases, réductases, lyases et ligases (DURAND et MONSAN, 1982).

La principale caractéristique des enzymes est liée à leur fonction catalytique. Leur spécificité peut être très limitée ou très large. Dans le premier cas, les enzymes ne tolèrent pas de changement dans la structure chimique et la configuration du substrat. Dans le deuxième cas, elles peuvent avoir une spécificité envers un groupement fonctionnel, indépendamment de la conformation des chaînes latérales. De cette manière, quelques enzymes peuvent se lier à un substrat non-biogénique ou xénobiotique ayant une similitude avec le substrat original.

Les enzymes peuvent accélérer la vitesse d'une réaction par un facteur de 10^6 à 10^{20} sans en modifier le bilan réactionnel. Elles fonctionnent mieux en milieu aqueux homogène et dans des conditions définies, notamment à un pH et une température spécifiques. Leur activité enzymatique est liée à la structure tertiaire de leur site actif. La perte de cette conformation (dénaturation) produit généralement une perte de l'activité.

Au niveau de leur biosynthèse, il existe deux types d'enzymes :

- a) Enzymes constitutives : enzymes nécessaires pour les fonctions métaboliques essentielles et toujours présentes dans la cellule.
- b) Enzymes inductibles : enzymes non-constitutives qui sont produites seulement si le substrat est présent.

Dans le cas des microorganismes, le contrôle de la synthèse des enzymes est réalisé de telle sorte que les sources de carbone et d'énergie ne sont pas utilisées inutilement. Si le micro-organisme se trouve dans un milieu nutritif pauvre avec une source de carbone potentielle, des enzymes inductibles sont synthétisées. S'il se trouve dans un milieu nutritif riche, il réduira l'activité des enzymes inductibles. De cette façon, le microorganisme non seulement s'oppose à l'accumulation de sous-produits du métabolisme pouvant atteindre des niveaux toxiques, mais aussi préserve le substrat inducteur.

Quand un composé inconnu est introduit dans l'environnement, des nouvelles voies biochimiques de transformation peuvent être nécessaires. Si le composé synthétique a une

structure similaire à un composé naturel, les microorganismes n'auront besoin que d'une légère adaptation de leurs voies biochimiques préexistantes, par modification de la spécificité des enzymes. Dans le cas contraire, les changements nécessaires dans la structure et la spécificité des enzymes seront plus importants. Par conséquent, le temps d'adaptation est plus long mais une fois le microorganisme adapté, la biodégradation sera très rapide.

Ce phénomène a été appelé "métabolisme gratuit" (GRADY, 1985) et il dépend de l'habilité du composé à induire la synthèse de l'enzyme selon sa ressemblance structurale avec le substrat naturel. Evidemment, la biodégradabilité diminuera si le nombre de groupements fonctionnels dans la molécule xénobiotique augmente. Si le composé xénobiotique est incapable d'induire la synthèse de l'enzyme, sa biodégradation peut néanmoins être observée en présence de l'inducteur naturel.

2.4.3 Biodégradation des PLA

L'action biologique sur les matériaux polymères peut avoir des effets de nature diverse (KLEMCHUK, 1990; ALBERTSSON et LJUNGQUIST, 1992) :

- a) physique : détérioration mécanique suite à la croissance microbienne.
- b) moléculaire : rupture des chaînes macromoléculaires sous l'action enzymatique directe.
- c) biochimique secondaire : excrétion des substances autres que celles libérées par des enzymes (acides organiques, surfactants) qui peuvent agir sur le polymère en changeant le pH ou le pouvoir réducteur du microenvironnement du milieu.

A première vue, la voie biochimique de dégradation des polymères de synthèse classiques serait une adaptation au système de β -oxydation des acides gras par fonctionnalisation en extrémités de chaînes. Des enzymes oxydent d'abord le carbone β non substitué pour former un groupement carboxyle. Ensuite, un segment de deux carbones est libéré sous forme d'acétyl CoA, lequel rentre dans le cycle de l'acide citrique.

Cependant, le problème des polymères synthétiques tient au fait que le substituant greffé sur le carbone β n'est pas toujours un H et qu'en général la rigidité des chaînes s'oppose à l'activité des enzymes. Parmi ces polymères, seul le polyéthylène pourrait être dégradé de cette façon à condition qu'il se présente avec des masses molaires très faibles et sans ramification des chaînes (KLEMCHUK, 1990).

La biodégradation des polymères naturels implique normalement des mécanismes d'hydrolyse ou d'oxydation enzymatiques ayant comme résultat la coupure des chaînes principales et la formation de fragments suffisamment petits pour être solubles dans l'eau. Normalement, ces

réactions se font par une attaque nucléophile sur l'atome de carbone polarisé positivement (COOKE, 1990, HUANG et coll., 1990, SCHINK et coll., 1992).

En prenant ces constatations comme base de réflexion, ces auteurs suggèrent que les polymères synthétiques doivent satisfaire les critères suivants pour être biodégradés :

- a) Comporter dans leur structure des groupements hydrolysables : amides, esters...
- b) Faciliter l'action des enzymes au moyen d'un caractère hydrophile majoritaire.
- c) Présenter une certaine flexibilité des chaînes de façon à permettre l'action du site actif des enzymes (caractère plutôt aliphatique).

Les polymères d'acide lactique présentent toutes ces caractéristiques mais les mécanismes de leur biodégradation sont peu connus à l'heure actuelle, bien que leur disparition en compost ait été soulignée sans autre forme de démonstration.

A) Dégradation enzymatique

La biodégradabilité d'un polymère de synthèse exige l'existence d'enzymes capables de catalyser sa dégradation. Ces enzymes (estérases, cellulases, amylases, etc...) sont appelées en général "dépolymérase" (TIMMINS et LENZ, 1994). En fait, seules quelques unes sont actives sur un nombre limité de polymères.

Plusieurs études sur la dégradation enzymatique des polyesters aliphatiques permettent de conclure que l'action des enzymes est limitée à la surface car ces grosses molécules sont incapables de pénétrer la masse du polymère. De ce fait, les polymères dégradés enzymatiquement montrent une réduction importante de la masse et un très faible changement des masses molaires, contrairement à la dégradation chimique (VERT et coll. 1992; HOLLAND et coll., 1986; FUKUZAKI et coll., 1989).

D'après VERT et coll. (1992), les enzymes ne peuvent pas diffuser à travers la masse polymère pour plusieurs raisons : l'exclusion par la taille (les enzymes sont également des polymères), la faible affinité des enzymes pour les milieux non-aqueux et des caractéristiques thermodynamiques défavorables. Deux polymères sont rarement compatibles au point de diffuser l'un dans l'autre.

De façon générale, la dégradation enzymatique d'un polymère se ferait par un procédé en deux étapes. Premièrement, l'enzyme s'attache au substrat et ensuite elle catalyse la rupture hydrolytique. La façon dont laquelle une protéine, enzymatique ou non, peut s'attacher au polymère est très complexe. A titre d'exemple, en étudiant les interactions entre la protéine BSA et des copolymères PEG/PLA, HU et coll. (1993) ont observé que l'adsorption d'une

protéine sur un polymère est fonction des interactions hydrophobes et de l'encombrement stérique. Dans le cas du PLA100, l'adsorption de la protéine est favorisée par l'augmentation de la polarité à la surface du polymère.

Les estérases

Les estérases sont présentes dans les tissus animaux, les tissus végétaux et dans les micro-organismes. En fonction du site d'action, elles peuvent être divisées en différents groupes (JUNGE, 1984):

- a) Carboxyl-estérases. Elles catalysent l'hydrolyse des esters carboxyliques pour produire les acides libres et les alcools correspondants. En fonction du résidu acyle, les esters de chaînes courtes sont coupés le plus rapidement. La longueur optimale est de 3 à 6 atomes de carbone. Les esters carboxyliques aliphatiques, les esters aromatiques, les amides aromatiques et les thioesters sont les substrats de ces enzymes. Selon l'état physique du substrat, elles agissent tant sur des esters en solution micellaire qu'en émulsion. Dans les organismes animaux, elles se trouvent principalement dans les cellules du foie. Leur rôle physiologique est celui du métabolisme de composés xénobiotiques de type ester ou amide.
- b) Aryl-estérases. Elles catalysent l'hydrolyse des esters aromatiques en attaquant préférentiellement les esters de l'acide acétique, le meilleur substrat étant le phényl-acétate. Ces enzymes sont présentes principalement dans le sérum des animaux.
- c) Lipases. La définition de ce type d'estérases est basée non sur la structure chimique du substrat mais plutôt sur son état physique. Ces enzymes sont capables de couper des triglycérides à longues chaînes et émulsifiés. L'activité lipolytique est fonction de l'origine de l'enzyme. Les enzymes testées par HOU (1993) ne présentent pas de stéréospécificité. Même si certaines lipases peuvent fonctionner comme des estérases, elles ne sont pas aussi efficaces.

Les PLA étant des polyesters, les estérases ont été considérées comme susceptibles de les dégrader. Plusieurs auteurs ont étudié l'effet d'estérases sur la dégradation des PLA et ses copolymères avec le PGA (HOLLAND et coll., 1986; FUKUZAKI et coll., 1989; WILLIAMS et MORT, 1977). Dans la plupart des cas, les enzymes utilisées sont des estérases porcines et des lipases microbiennes.

FUKUZAKI et coll. (1989) ont étudié l'action de différentes enzymes sur le PLA50, le PLA92 et le PLA98 de faibles masses dans un tampon phosphate 1/15 M (pH 7,2) et avec un rapport enzyme/polymère de 20 mg/g. Ils ont observé que le procédé de dégradation est

accélééré surtout en présence des enzymes de type estérase dont la meilleure est la lipase produite par *Rhizopus delemere*. La vitesse de dégradation de ces polymères tend à augmenter avec le temps, en particulier dans les régions amorphes : une dégradation complète est observée au bout de 21 jours pour le PLA50 alors que seulement 24-38% de dégradation est observée pour les polymères PLA98 et PLA92, respectivement, dans la même période. Les enzymes auraient beaucoup de difficulté pour pénétrer dans les zones cristallines.

VERT et coll. (1992) ont étudié l'effet de l'estérase porcine sur la dégradation du PLA50 et du PLA100 dans un tampon borate 0,1 M (pH 8). Ils ont observé que des éprouvettes de PLA50 absorbent une quantité importante d'eau (environ 80% au bout de 8 semaines) et subissent ensuite une perte rapide de matière. Ces auteurs ont affirmé qu'il n'y a pas de différence significative avec la dégradation dans le tampon seul et que, de toute façon, l'absorption d'eau par le polymère produit une plastification qui elle-même peut faciliter l'attaque par l'enzyme. Le PLA100, lui, ne se dégrade pas de manière importante en présence ou en absence d'enzyme. Ces auteurs ont conclu que la présence de l'estérase n'altère pas la dégradation des deux polymères testés.

Cependant, les auteurs affirment que l'absence de l'activité estérasique observée n'exclut pas que d'autres enzymes puissent être actives mais que, dans le cas étudié, la dégradation des PLA serait exclusivement due à la simple hydrolyse. Le fait que des changements en masse et en surface du PLA aient lieu en présence de l'estérase peut être dû aux effets de l'enzyme sur les caractéristiques physico-chimiques des milieux aqueux tamponnés. De plus, les PLA, comme d'autres matériaux polymères, sont capables d'adsorber des protéines, menant ainsi à la modification de la surface et d'autres caractéristiques physico-chimiques (MAKINO et coll., 1987).

L'effet de la protéinase K sur des polymères d'acide lactique a été étudié par quelques auteurs. WILLIAMS et MORT (1977) ont réalisé une comparaison entre une estérase animale (tampon Tris 0,1M, pH 7,5 et 0,1 mg/ml d'enzyme) et la protéinase K (tampon Tris 0,1M, pH 8 et 0,17 mg/ml d'enzyme) sur la dégradation des copolymères PLA/GA. Ils ont observé que l'estérase est plus efficace que la protéinase. Ils ont également signalé l'importance du témoin, car d'autres substances présentes dans le milieu (dans ce cas le sulfate d'ammonium) peuvent modifier le comportement du système enzyme/polymère.

HOLLAND et coll. (1986) ont indiqué que la protéinase K produit l'hydrolyse du PLA, de même que la pronase et la bromeline, et que les effets de l'estérase et de la trypsine sont moins importants. La pronase et la bromeline ont un comportement "exo" car elles provoquent une rupture physique, alors que la protéinase K a un comportement "endo" qui ne produit pas de changements physiques, même si elle fait diminuer la masse molaire.

Une étude plus détaillée de l'effet de la protéinase K sur des films de PLA contenant différents pourcentages d'unités L (de 0 à 100%) a été réalisée par REEVE et coll. (1994). Ils ont confirmé certains phénomènes :

- La protéinase K dégrade préférentiellement les unités L : le PLA contenant 100% d'unités D ne présente pas de dégradation. Pour les autres configurations, il est possible qu'au bout d'un certain temps, la dégradation de la surface laisse une région enrichie en unités D provoquant ainsi une diminution de la vitesse de réaction.
- La vitesse de dégradation enzymatique est fonction du degré de cristallinité : le PLA100 recuit à haute température est dégradé plus lentement que le PLA100 qui n'a pas été recuit du fait du caractère plus cristallin du premier. De plus, de petits changements dans la configuration des PLA (de 92 à 100% d'unités L) provoquent des changements importants de la cristallinité et donc de la dégradation. Une diminution de 7% d'unités L produit une différence proche de 50% de la vitesse de dégradation.
- Lorsque le pourcentage d'unités L augmente de 0 à 92, c'est le caractère L qui contrôle la vitesse de dégradation. Au-delà de cette valeur, c'est la cristallinité qui détermine la vitesse de la réaction de façon supposée non linéaire.
- La protéinase K dégrade totalement les films jusqu'à des oligomères solubles : si la perte de poids dépasse 60%, la disparition totale du film est observée.
- Il existe une bonne concordance entre la vitesse de dégradation superficielle initiale (évaluée par la mesure de la concentration en ions H^+) et la perte de matière : il existe une phase de latence qui correspondrait à l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Après cette période, un profil linéaire est observé. D'autre part, la vitesse de dégradation superficielle initiale est similaire pour toutes les configurations.

REEVE et coll. (1994) concluent que la relation entre la dégradation et la cristallinité est particulière pour chaque système enzyme/polymère étudié.

Toutefois, dans toutes ces études de dégradation enzymatique des polyesters, la quantité d'enzyme utilisée par rapport à la quantité du substrat est souvent très importante (quelques fois de 1:1 en masse). Dans ces conditions, l'enzyme doit être considérée du point de vue chimique et physico-chimique puisqu'il peut y avoir des effets autres qu'une activité enzymatique proprement dite (VERT et coll., 1992) :

- des changements de la solubilité des composés hydrophobes dans des microdomaines lipophiles présents dans les molécules protéiques ;
- une complexation de quelques ions ou de composés ioniques présents dans le milieu tampon ou dans la masse polymère ;
- des effets physico-chimiques lorsque des molécules complexes comme les enzymes ne sont pas dans leurs conditions catalytiques.

Par conséquent, les relations entre les enzymes et les PLA pourraient être connues si les effets d'autres composés (lipides, cations, détergents) sur des phénomènes d'absorption, de diffusion, d'échange d'ions... étaient mieux définis.

Dégradation de polymères naturels

Pour mieux comprendre les phénomènes de dégradation des polymères synthétiques, il serait intéressant de faire une comparaison avec la dégradation des polymères naturels insolubles (amidon cru, cellulose, polyglucosides, polyesters bactériens) dont les mécanismes sont bien connus.

Citons comme premier exemple, le cas de l'enzyme α -amylase. L'hydrolyse des chaînes linéaires (amylose) et/ou des chaînes ramifiées (amylopectine) de l'amidon par cette enzyme suit la séquence :

amidon ----> α -dextrines ----> α -dextrine limite (ramifiées) ----> maltose

La α -amylase est une endo-enzyme dont l'action s'effectue à la fois sur plusieurs chaînes et en plusieurs endroits d'une même chaîne. Quelques microorganismes produisent des α -amylases capables d'attaquer l'amidon à l'état granulaire. L'action de ces enzymes semble liée à leur possibilité de pénétration à l'intérieur des grains et en particulier d'en attaquer la surface (DUPRAT et coll., 1980).

L'attaque de la surface se traduit par la formation de canaux vers l'intérieur des grains d'amidon (FRANCO et coll., 1987; GALLANT et coll., 1972). Puis, au fur et à mesure que l'enzyme atteint les régions internes, l'hydrolyse se fait très rapidement (GALLANT et coll., 1972). La taille des granules ne semble pas avoir d'influence sur la vitesse de dégradation (LEACH et SCHOCH, 1961).

Comme deuxième exemple, il y a le cas de la cellulose. La dégradation de ce polymère se fait par un complexe multi-enzymatique qui catalyse l'hydrolyse complète jusqu'à des sucres simples capables de traverser les parois cellulaires (ROUSSOS, 1985). Dans le cas particulier du système de *Trichoderma viride*, la dégradation de la cellulose se fait en trois étapes :

cellulose native ----> cellulose amorphe ----> cellobiose ----> glucose

Chaque étape de cette dégradation est réalisée par des enzymes spécifiques : endoglucanases, exoglucanases et β -glucosidases, respectivement. Dans un premier temps, les endoglucanases sont supposées attaquer la cellulose microcristalline, créant des failles dans les chaînes

linéaires. Ensuite, les exoglucanases attaquent les extrémités et produisent des oligomères et des molécules de cellobiose qui sont finalement transformées en glucose par les β -glucosidases (Figure 2.3).

L'adsorption des enzymes sur les substrats celluloseux est nécessaire pour initialiser leur dégradation (ROUSSOS et coll., 1991). Le mécanisme d'adhésion est particulier pour chaque système enzymatique.

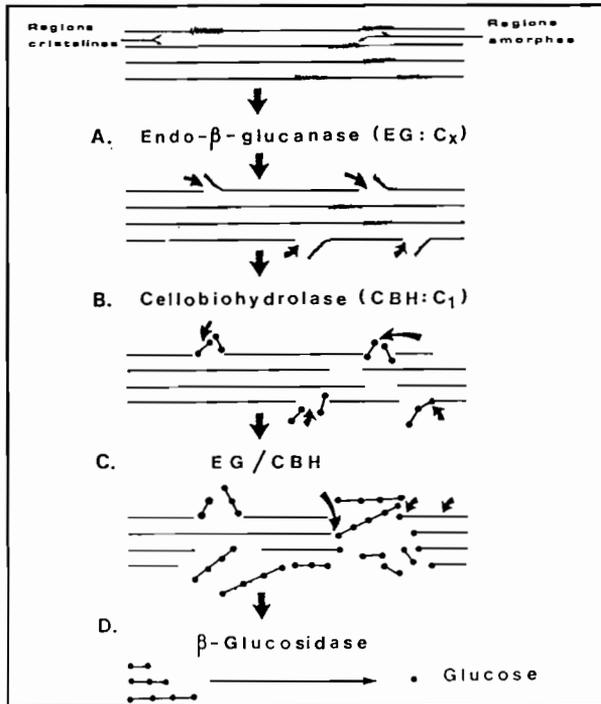


Fig. 2.3 Mécanisme proposé pour la dégradation de la cellulose par le système enzymatique de *Trichoderma viride* (ROUSSOS, 1982, 1985).

Finalement, nous citerons le cas de la dégradation par la lysozyme des polyglucosides (poly-N-acétyl glucosamine) des parois cellulaires de quelques microorganismes. La réaction de cette enzyme est normalement inhibée par les produits (oligomères ou monomère) car ils peuvent interférer avec l'affinité enzyme/substrat (AIBA et coll., 1973).

B) Dégradation microbienne

Nous avons constaté qu'il n'existe dans la bibliographie aucune étude détaillée sur la dégradation des PLA par des microorganismes. Par contre, beaucoup d'études ont été réalisées sur des polymères naturels (PHB/HV, amidon, cellulose, etc...) et sur d'autres polyesters aliphatiques synthétiques : poly(ϵ -caprolactone), poly(ester amide) (ALBERTSSON et LJUNQUIST, 1992 ; DOI et coll., 1991 ; JARRET et coll., 1983; KUMAGAI et coll., 1992 ; YAKABE et coll., 1992).

Dans le cas des matériaux polymères en général, IMAM et GOULD (1990) affirment que la vitesse de biodégradation dépend de la bonne colonisation microbienne de la surface. L'adhérence des microorganismes aux substrats insolubles est importante pour leur survie dans un milieu où la concurrence pour les ressources limitées est très intense. Cette capacité est caractéristique d'une large gamme de systèmes biologiques. Elle joue un rôle important dans la régulation de la croissance ainsi que dans d'autres activités cellulaires.

Afin de mieux comprendre ce phénomène, IMAM et coll. (1990, 1991 a et b) ont étudié l'action d'une bactérie amylolytique sur un mélange amidon-polyméthyl-acrylate. Ils ont constaté les faits suivants :

- a) L'adhésion des bactéries à la surface de ces polymères est un procédé énergie-dépendant.
- b) Les molécules impliquées dans l'adhésion (probablement des protéines de la membrane cellulaire) ne peuvent pas être inactivées par des détergents, mais par une force ionique importante ou par un pH acide.
- c) Seules les cellules vivantes ou actives sont capables d'adhérer à la matrice polymère insoluble.
- d) Il peut exister des sites spécifiques d'adhésion dans la membrane extérieure des cellules et ils seraient différents des sites actifs des enzymes.

Ces auteurs concluent que l'adhésion ne serait pas une condition indispensable pour que la dégradation ait lieu : elle peut se faire par les enzymes excrétées par les microorganismes, lesquelles peuvent se mettre en contact directement avec le polymère. Cependant, la dégradation microbienne des polymères peut impliquer l'action simultanée des deux types d'adhésion (membranaire et enzymatique).

Dans le cas des polyesters bactériens (PHB, PHV et ses copolymères), la purification, la caractérisation et la description des dépolymérase microbienne ont été réalisées par plusieurs auteurs (DOI et coll., 1991; GILMOR et coll., 1991; JENDROSSEK et coll., 1993; KUMAGAI et coll., 1992; MULLER et JENDROSSEK, 1993; SCHRIMER et coll., 1993, SCHINK et coll., 1992).

YAKABE et coll., (1992) déclarent que les bactéries ne peuvent pas assimiler directement les polyesters dans les cellules car ils sont insolubles. Ils supposent que le premier pas pour l'assimilation est la libération des dépolymérase dans le milieu qui libèrent à leur tour des oligomères dont la pénétration dans la cellule peut être plus facile.

Ainsi, il a été supposé que la biodégradation des polyesters bactériens se réalise par les étapes suivantes (COX, 1991; YAKABE et coll., 1992) :

- a) Colonisation microbienne de la surface.
- b) Excrétion des dépolymérase dans le voisinage des cellules.
- c) Production des oligomères solubles diffusant plus facilement vers l'intérieur des cellules.
- d) Métabolisation des sous-produits.

Comme pour le reste des polymères, l'action des dépolymérase extracellulaires est dépendante de la morphologie du polymère, de l'aire superficielle spécifique, de la proportion des zones cristallines (elles sont dégradées 20 fois moins vite que les parties amorphes), des masses molaires et de la stéréochimie (la plupart des dépolymérase de ces polymères présentent une spécificité vers la configuration R, mais cette spécificité n'est pas toujours stricte).

L'importance de l'aire superficielle est présentée par BRANDL et PUCHNER (1992). Ils ont étudié la dégradation des bouteilles et des films de Biopol[®] dans le sédiment marin. Ils ont observé que les films sont complètement dégradés en moins d'un an, alors que les bouteilles ont une durée de vie sous ces conditions de 5 à 10 ans. Par microscopie électronique à balayage, ils constatent un effet "éponge" de la biodégradation par la formation de pores et de cavités à l'intérieur de la masse polymère.

Par ailleurs, MERGAERT et coll. (1991) ont isolé plus de 200 microorganismes (bactéries, levures, champignons) capables de dégrader les copolymères PHB/HV. NISHIDA et TOKIWA (1992 et 1993) ont affirmé que de 0,2 à 11% de microorganismes retrouvés dans différents milieux naturels (décharge, boues activées, compost, sol...) peuvent dégrader ces polyesters et que la plupart des microorganismes dégradant le PHB sont des bactéries.

Il est donc possible qu'il existe dans la nature des microorganismes capables de dégrader les PLA.

C) Dégradation *in vivo*

Dans cette partie, nous considérons la dégradation *in vivo* des PLA comme étant celle réalisée suite à des implantations dans des tissus d'animaux supérieurs.

En général, la comparaison entre les conditions chimiques et les conditions *in vivo* montre que les PLA présentent le phénomène de dégradation préférentielle au centre et que la vitesse de dégradation augmente dans les conditions *in vivo* (THERIN et coll., 1992 ; KENLEY et coll., 1987 ; KULKARNI et coll., 1971 ; HOLLAND et coll., 1986).

En effet, THERIN et coll. (1992) ont observé que l'évolution des masses molaires se présente de manière similaire *in vivo* et *in vitro*, mais que la libération des oligomères internes est plus rapide *in vivo* : les échantillons sont presque complètement vidés au bout de 6 semaines alors qu'il n'y a qu'une très légère perte de matière au bout de 12 semaines *in vitro*. Ceci peut être expliqué par la différence en contrainte mécanique provoquée par les contractions musculaires *in vivo*. En plus, la solubilité des oligomères est plus importante dans les fluides vivants que dans un tampon phosphate. Ces auteurs ont également observé que la polymolécularité du PLA50 augmente (jusqu'à des valeurs de 8,1) avec la durée de dégradation et que les masses molaires moyennes peuvent augmenter lorsque les oligomères sont libérés dans le milieu.

KULKARNI et coll. (1971) ont également comparé la dégradation du PLA50 et du PLA100 *in vivo* et *in vitro*. Ils ont trouvé que, *in vivo*, le PLA50 se dégrade plus vite que le PLA100, de la même façon qu'en conditions *in vitro*.

La dégradation *in vivo* du PLA50 augmente de 18% la perte de matière par rapport aux conditions *in vitro* et elle se fait en deux étapes : il y a d'abord une rupture aléatoire des liaisons ester, suivie d'une diminution linéaire des masses molaires. Deuxièmement, le procédé s'accélère à partir d'une masse molaire de 15.000 jusqu'à la perte totale. La durée de la première étape est fonction des masses molaires initiales. Ce mécanisme est analogue à celui observé *in vitro*, mais se déroule plus lentement (HOLLAND et coll., 1986).

SCHAKENRAAD et coll. (1990) ont observé que des implants de PLA100 *in vivo* provoquent une augmentation au niveau de l'enzyme lactate-déhydrogénase (LDH) et du cofacteur NADH, ce qui confirme la libération de l'acide lactique vers les tissus. Des implants de PLA100 de 159.000 ne présentent une dégradation qu'au bout d'un an, une fois que la masse molaire atteint la valeur de 5000.

Ce n'est donc que la phase de résorption des produits de dégradation qui peut être qualifiée de biodégradation, l'étape initiale étant une dégradation chimique. Cependant, la plupart des auteurs s'accordent pour affirmer que la dégradation des PLA *in vivo* n'est pas enzymatique.

2.5 Facteurs influençant la dégradation des PLA

Comme pour le reste des polyesters aliphatiques, la dégradation chimique ainsi que la dégradation enzymatique des polymères d'acide lactique dépendent de différents facteurs (COOKE, 1990 ; VERT et coll., 1992 ; SATYANARAYANA et CHATTERJI, 1993 ; TIMMINS et LENZ, 1994). Malgré l'existence de contradictions trouvées dans la littérature, en grande partie liées à la complexité des phénomènes, nous avons essayé de classer ces facteurs.

a) Bilan hydrophilicité / hydrophobicité.

L'hydrolyse chimique ainsi que l'attaque enzymatique sont influencées par la capacité d'absorption d'eau du polymère. Plus le polymère est hydrophile, plus il sera sensible à l'hydrolyse.

b) Morphologie.

Il a été observé que la dégradation est plus importante dans les zones amorphes que dans les zones cristallines et que cette dégradation préférentielle a comme résultat une augmentation de la cristallinité avec le temps de dégradation (YASIN et TIGHE, 1992 ; LI et coll., 1990).

Les polymères amorphes sont plus facilement dégradables du fait d'une meilleure mobilité des chaînes. Dans le cas de l'attaque enzymatique, cette mobilité facilite l'accessibilité des enzymes.

c) Masse molaire.

La dégradation est favorisée par des valeurs faibles de masses molaires, surtout pour l'action des enzymes.

d) Structure chimique.

Les propriétés chimiques déterminant la capacité des polymères à être dégradés sont : les types de liaisons des chaînes polymères, les groupements fonctionnels (effets stériques), leur position, leur réactivité et les groupes terminaux.

Dans le cas des copolymères PLA/GA, la dégradation augmente avec le pourcentage d'unités GA et non avec la masse molaire : le GA fait augmenter l'hydrophilicité et diminue l'encombrement stérique. Toutefois, ces copolymères sont beaucoup plus stables à l'hydrolyse lorsqu'un des monomères se trouve en majorité, par rapport aux compositions intermédiaires (ZHU et coll., 1991).

Dans le cas des PLA, le PLA50 se dégrade plus vite alors que les PLAX, avec X entre 50 et 100, ont des vitesses de dégradation comprises entre celles du PLA50 et du PLA100 (LI et coll., 1990).

e) pH du milieu.

Pour les polyesters en général, le mécanisme de dégradation dépendant du pH est bien connu. Dans les solutions acides ou neutres, l'hydrolyse se fait par un procédé de protonation suivi d'une addition d'une molécule d'eau et la rupture de la liaison ester. Dans un milieu alcalin, les ions hydroxyle sont attachés aux groupes carbonyle et la liaison est cassée. Cette différence d'attaque chimique détermine le point de rupture. Pour les copolymères de PLA/GA, KENLEY et coll. (1987) ont remarqué que la vitesse de dégradation est indépendante du milieu pour des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 7,4. Ceci confirme le fait qu'il y a un micro-environnement acide entourant le polymère résultant de la production des groupements carboxyle en extrémités des chaînes.

En revanche, MAKINO et coll. (1986) ont observé que le PLA100 est dégradé rapidement dans des solutions très alcalines (pH>9,8).

f) Taille des échantillons.

Il a été observé que la dégradation chimique du PLA50 sous forme de films, de poudre et de microsphères est plus lente que celle des échantillons massifs du fait du modèle de diffusion-réaction décrit auparavant (cf. §2.3.1) (GRIZZI et coll., 1995). Ainsi, la dégradation chimique est d'autant plus rapide que l'épaisseur des échantillons est importante.

Dans le cas des nanoparticules, COFFIN et MC GINTY (1992) affirment que l'influence de la taille sur la dégradation chimique est pratiquement nulle.

Pour la dégradation enzymatique, la surface disponible a une forte influence.

g) Température.

La dégradation des polyesters est dépendante de la température. REED et GILDING (1981) ont affirmé que la température a une forte influence sur la dégradation des sutures de PLA/GA dans un rang compris entre 25 et 50°C. Ils expliquent que la température est très liée à l'état physique des polymères (caoutchoutique ou vitreux).

h) Force ionique du milieu.

MAKINO et coll. (1986) ont observé que la dégradation chimique des PLA est accélérée par une force ionique importante. Ils expliquent ce phénomène en termes de

la distribution du potentiel électrique dans l'interface polymère/solution. Ils ont également remarqué que la dégradation est influencée par la concentration de sels dans les solutions tampon, indiquant que la coupure des liaisons ester des polymères est favorisée par la conversion des sous-produits acides en sels neutres.

i) Présence de composés de faibles masses molaires.

La présence de composés de faibles masses molaires (oligomères, monomères résiduels, solvants résiduels, eau absorbée, sous-produits de dégradation thermique ou par UV) provoque des changements importants dans les propriétés intrinsèques d'un polymère, et en conséquence, affecte la dégradation. L'absorption d'eau, par exemple, fait diminuer la T_v du PLA50 (VERT et coll., 1992).

En plus des facteurs inhérents aux polymères, d'autres facteurs propres aux activités biochimiques déterminent l'action microbienne sur les polymères (KLECKA et LANDI, 1985 ; MEANS et ANDERSON, 1981) :

a) Facteurs biologiques.

Histoire de la culture, âge de l'inoculum, toxicité, disponibilité en eau et en oxygène dissous.

b) Solubilité.

Une solubilité limitée peut diminuer le développement initial de la biomasse, mais ne pose pas de difficulté lorsque la biomasse est suffisamment importante.

c) Concentration.

La concentration est importante car elle peut devenir inhibitrice pour le micro-organisme. A partir d'un certain seuil, la concentration doit être identique à celle trouvée dans des conditions normales de rejet dans la nature. Les microorganismes peuvent être généralement plus susceptibles à l'inhibition lorsque les nutriments alternatifs ne sont pas disponibles, mais ceci ne signifie pas que le composé est non biodégradable. La concentration inhibitrice est liée à la saturation des sites actifs des enzymes disponibles. De plus, le mélange des composés chimiques faits par l'homme peut donner lieu à des effets synergiques qui réduisent ou augmentent leur biodégradabilité (KLECKA et LANDI, 1985).

d) Température.

La température a un effet très important sur l'activité microbienne. En règle générale, la vitesse d'une réaction biochimique est deux fois plus rapide pour chaque 10°C d'augmentation de la température.

e) pH du milieu.

Le pH doit rester proche de la neutralité, surtout lorsque la concentration du composé est élevée. Ceci reste valable dans le cas de traitement des eaux usées, où le pH reste stable entre 6,8 et 7,6 pendant le traitement. Le pH optimum de dégradation dans boues activées est compris entre 7 et 8. Dans les sols, les valeurs de pH sont variables d'un site à l'autre mais elles restent localement bien définies (KLECKA et LANDI, 1985).

2.6 Méthodes d'évaluation de la biodégradabilité des polymères

2.6.1 Considérations générales

Le taux réel de biodégradation d'un composé chimique est difficile à estimer. Les conditions physiques, chimiques et biologiques *in vitro* sont en général très différentes comparées à celles d'un environnement naturel. Toutefois, la mesure de la biodégradabilité d'un composé dans une simulation de laboratoire doit refléter le plus possible l'environnement réel (MEANS et ANDERSON, 1981).

Il s'avère difficile d'avoir une bonne reproductibilité des expériences puisque l'origine d'une population microbienne varie ainsi que sa densité, sa viabilité, et sa capacité à dégrader le produit en question. Cependant, quelques études ont démontré que l'utilisation de boues activées pour évaluer la biodégradation présente une variation expérimentale acceptable (6% environ) et une reproductibilité maximale de 22% pour différents composés (KLECKA et LANDI, 1985).

En principe, les microorganismes aérobies métabolisent les composés organiques par une réaction en deux étapes (BUTTRON et coll., 1991) :

(1) Composé carboné + microorganismes + O₂ -----> CO₂ + H₂O + énergie

(2) Composé carboné + microorganismes + O₂ + énergie -----> nouvelles cellules (biomasse)

En fait, les deux réactions se déroulent simultanément pendant la métabolisation du substrat. La réaction 1 représente l'activité catabolique des microorganismes, c'est-à-dire, l'oxydation d'un composé complexe avec libération d'énergie. La réaction 2 représente l'activité anabolique, à savoir, la partie constructive du métabolisme qui transforme la matière organique en nouvelles cellules en utilisant l'énergie produite en 1.

La plupart des méthodes de mesure de biodégradabilité sont basées sur ces deux réactions et utilisent un inoculum complexe, riche en microorganismes (boues activées, eaux usées,...). Plusieurs de ces méthodes ont été standardisées par quelques organismes (AFNOR, O.C.D.E., ASTM, USEPA) et sont couramment utilisés pour l'évaluation de la biodégradabilité des composés chimiques (BUTTRON et coll., 1991 ; LARSON, 1984 ; TABAK et coll., 1981 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1994, entre autres).

Dans ces méthodes, la dégradation est généralement suivie par l'analyse de l'évolution des gaz (CO_2 produit et O_2 consommé ; méthodes respirométriques), par la disparition du composé dans le milieu (carbone organique dissous, C.O.D.) grâce à des techniques spécifiques et/ou par la détermination de la biomasse produite.

La méthode la plus utilisée est celle de Sturm modifiée décrite selon la Ligne Directrice 301-B de l'O.C.D.E. pour les essais de produits chimiques (1981). Le principe de cette méthode consiste à mélanger la substance à examiner à un milieu liquide chimiquement défini, exempt d'autres sources de carbone organique, etensemencé de microorganismes provenant d'eau d'égout. Le CO_2 qui se dégage est piégé sous forme de BaCO_3 (Fig. 2.4). Après comparaison avec les résultats des contrôles (milieu avec une source de carbone facilement utilisable, tel l'acétate de sodium), la quantité totale de CO_2 produite pendant la durée de l'essai par le composé examiné est déterminée. Cette quantité est exprimée en pourcentage du CO_2 total que le composé aurait pu théoriquement produire sur la base de sa teneur en carbone.

D'après cette méthode, un composé est considéré comme biodégradable lorsqu'il est entièrement minéralisé en 28 jours, à une faible concentration et comme seule source de carbone et d'énergie.

Lorsque ce type de méthodes respirométriques est utilisé, il faut tenir compte de la respiration endogène car d'autres composés, y compris le carbone dissous, présents dans l'inoculum peuvent être consommés. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser également un témoin où l'inoculum se trouve sans le composé à étudier.

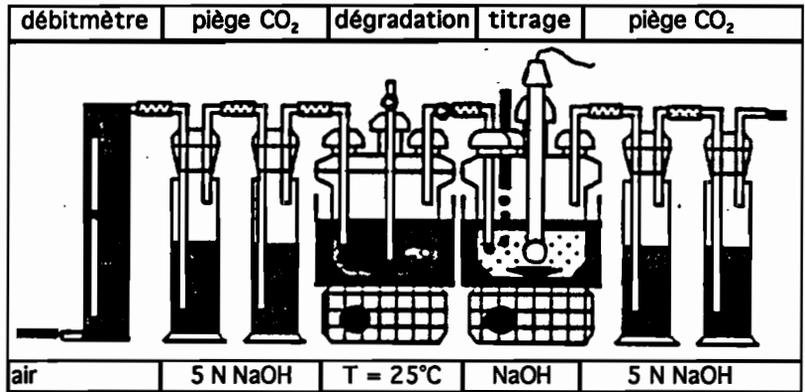


Fig. 2.4 Représentation schématique de la Méthode de Sturm pour l'évaluation de la biodégradabilité de composés chimiques (O.E.C.D., 1981).

Si le 100% de CO₂ du total est atteint, cela signifie qu'une minéralisation totale a eu lieu. Or, le cas le plus fréquent correspond à un pourcentage maximum de 70% du théorique en excluant la production de biomasse. Ce pourcentage correspondrait à la biodégradation ultime (GILBERT et WATSON, 1977).

Lorsque le carbone du composé à dégrader est utilisé comme unique source d'énergie et de nutriments pour la croissance et la reproduction de microorganismes, une augmentation de biomasse peut refléter la biodégradation. Toutefois, la correspondance biomasse / biodégradation n'est valable que pour une biodégradation primaire (GILBERT et WATSON, 1977).

Il faut noter que du matériel organique résiduel peut rester dans une culture, même si les composés étudiés sont considérés totalement métabolisables (acides organiques, monosaccharides simples...). Cette quantité résiduelle est considérée comme non-biodégradable car elle persiste dans le milieu en présence d'une population microbienne acclimatée (GAUDY et BLACHY, 1985).

Le bilan total de carbone dans un test de biodégradabilité est donc :

$$C_{\text{total}} = \text{CO}_2 + \text{C.O.D.} + C_{\text{biomasse}}$$

2.6.2 Cas des matériaux polymères

Pour la mesure de la biodégradabilité des matériaux polymères, beaucoup d'efforts ont été réalisés pour développer des méthodes standard (MÜLLER et coll., 1992 ; YAKABE et coll., 1992 ; WOOL et RAGHAVAN, 1993 ; RAGHAVAN et coll., 1992).

Citons comme exemple la méthode ASTM G21-70 (1980). Elle consiste à placer le polymère dans l'agar solide contenant tous les nutriments nécessaires, à l'exception du carbone, pour la croissance de champignons filamenteux. Une suspension de spores est inoculée à la surface du matériau et l'incubation se fait à 30°C et sous 85% d'humidité relative pendant 21 jours. L'évaluation de la croissance se fait par observation et est notée de 0 à 4 en fonction de l'abondance cellulaire. Par cette méthode, il a été confirmé que seuls les polyesters aliphatiques (PCL) et les polyuréthanes aliphatiques (dérivés d'esters diols aliphatiques) peuvent être attaqués dans les conditions du test. La présence d'une biomasse dans le cas d'autres polymères risque de provenir de la dégradation d'additifs traditionnels (KLEMCHUK, 1990).

MÜLLER et coll. (1992) et AUGUSTA et coll. (1992) ont vérifié la reproductibilité de la méthode de Sturm modifiée grâce au travail coordonné de huit laboratoires différents en Allemagne et en Angleterre. Ils ont choisi d'utiliser une poudre (1 µm) de polyester bactérien (PHB/HV avec 21% de HV) pour faciliter l'attaque microbienne et ont évalué le pourcentage de dégradation par la production de CO₂. Tous les laboratoires impliqués dans cette étude ont constaté que ce polymère a un pourcentage de dégradation de 60%, après 28 jours de culture mixte. L'écart type a été de 6,9. La bonne reproductibilité de l'utilisation d'une population complexe de microorganismes est donc confirmée.

RAGHAVAN et coll. (1993) proposent l'amélioration de la méthode ASTM D-5210 Sturm modifiée de la façon suivante :

- a) Récupération du CO₂ réellement produit par la dégradation du polymère, et non par les nutriments contenus dans l'inoculum des boues activées.
- b) Evaluation de la biomasse et des produits intermédiaires solubles dans le milieu.
- c) Optimisation de l'inoculum par acclimatation préliminaire au polymère.
- d) Formulation optimale du milieu de culture avec uniquement la source de C comme facteur limitant de la biodégradation.

L'évaluation la plus précise de la biodégradabilité des matériaux plastiques se réalise par la mesure du contenu total de carbone dans la biomasse (50-60%), du carbone organique dissous dans le milieu et du CO₂ dégagé. D'où le bilan de carbone suivant (MÜLLER et coll., 1992 ; AUGUSTA et coll., 1992 ; RAGHAVAN et coll., 1992) :

dissous dans le milieu et du CO₂ dégagé. D'où le bilan de carbone suivant (MÜLLER et coll., 1992 ; AUGUSTA et coll., 1992 ; RAGHAVAN et coll., 1992) :

$$C_{\text{total}} = C_{\text{polymère résiduel}} + C_{\text{polymère dégradé}}$$

avec :

$$C_{\text{polymère dégradé}} = C_{\text{gaz}} + C_{\text{soluble}} + C_{\text{biomasse}} + C_{\text{insoluble}}$$

Pour mesurer la biodégradabilité d'un polymère, il est donc nécessaire de vérifier que les conditions de dégradation sont telles que le composé ne sera pas rendu persistant, alors qu'il est vraiment biodégradable. La persistance d'un composé carboné dans un milieu à haute activité microbiologique (boues activées) peut être due soit à la toxicité de ce composé, soit aux conditions défavorables de dégradation (BUTTRON et coll., 1992).

Il faut souligner que les tests nommés ci-dessus ne constituent qu'un examen indirect de la biodégradation par l'intermédiaire d'un bilan plus ou moins global. Aucun ne fait appel à une étude du devenir du matériau, de ses intermédiaires et des produits finaux au niveau moléculaire.

2.7 Comparaison entre les dégradation chimique et enzymatique des PLA

Des analyses précédentes de l'état de la littérature, on peut conclure que des différences importantes existent entre les mécanismes de dégradation chimique et de dégradation enzymatique des PLA. Ces différences ont été résumées dans le Tableau 2.3.

Tableau 2.3 Comparaison entre les dégradations chimique et enzymatique des PLA

Caractéristiques	Hydrolyse chimique	Hydrolyse enzymatique
Mécanisme d'attaque	dans la masse	à la surface
Rupture des chaînes	aléatoire	- en fin de chaîne (exo) - aléatoire (endo)
Perte de masses molaires	importante dès le début	peu importante tout au long
Perte de matière	période d'induction	immédiate
Influence de l'aire superficielle	peu importante	importante

2.8 Conclusion

L'analyse bibliographique sur les polymères d'acide lactique nous a permis de constater les faits suivants :

- a) Les PLA sont dégradables dans les milieux aqueux par simple rupture hydrolytique des liaisons ester.
- b) Un phénomène de dégradation préférentiel à l'intérieur des matériaux massifs existe comme conséquence du mécanisme d'autocatalyse combiné à des phénomènes de diffusion.
- c) Les produits intermédiaires de l'hydrolyse sont des petites chaînes de faibles masses molaires dont la solubilité augmente avec la dégradation, le produit final étant l'acide lactique.
- d) La vitesse de la dégradation est étroitement liée aux caractéristiques physico-chimiques des PLA : composition énantiomère, morphologie, géométrie, masse molaire, dimensions.
- e) Il existe une confusion par rapport au rôle des enzymes sur la dégradation des PLA et les mécanismes de dégradation sont mal connus.
- f) En cas de biodégradation, il faut s'attendre à une attaque de surface, à une stéréospécificité et à une dégradation relativement rapide, en particulier pour des polymères amorphes, si l'on se base sur les polyesters bactériens.
- g) Aucune étude approfondie concernant l'action des microorganismes sur les PLA n'a été réalisée. Seule la protéinase K semble capable d'attaquer les chaînes de PLA en conditions modèles.

Nous avons également constaté que le caractère bioassimilable des PLA, c'est-à-dire, l'assimilation microbienne totale des résidus de la dégradation chimique, n'a jamais été démontré. Seule la dégradation globale dans un système de compost a été analysée. De plus, aucune méthodologie n'a été proposée pour évaluer la disparition totale des résidus.

En conséquence, nous avons entrepris de démontrer la bioassimilation des PLA, grâce à la stratégie suivante :

- a) Sélection des microorganismes capables d'utiliser les PLA ou les sous-produits de dégradation comme seule source de carbone et d'énergie.
- b) Mise au point d'une méthodologie analytique pour évaluer la consommation des résidus de la dégradation chimique : acide lactique, dimère, oligomères solubles et insolubles, par des cultures pures et des cultures mixtes des microorganismes.

- c) Mise en évidence de l'effet de la composition énantiomère des résidus sur la vitesse de la dégradation microbienne.
- d) Mise en évidence de la différence entre la dégradation chimique et la dégradation microbienne.

Dans un deuxième temps, et compte tenu du fait que les microorganismes sont capables d'assimiler les résidus de dégradation contrairement aux enzymes susceptibles de cliver les macromolécules, nous avons étudié le comportement des PLA de hautes masses molaires vis-à-vis des enzymes pures.

L'ensemble du travail sera présenté en 5 chapitres :

- A) Sélection de microorganismes.
- B) Dégradation microbienne des résidus de l'hydrolyse chimique.
- C) Dégradation des polymères.
- D) Dégradation enzymatique.
- E) Dégradation des polymères par des microorganismes isolés du sol.

SELECTION DES MICROORGANISMES

3.- SELECTION DES MICROORGANISMES

3.1 Introduction

Nous avons vu précédemment que la dégradation des polymères d'acide lactique par les microorganismes n'a pas encore été étudiée d'une manière systématique. Cependant, de nombreux éléments suggèrent qu'une telle dégradation est possible. La méthode habituelle de sélection de microorganismes actifs est fondée sur le développement préférentiel des souches à partir de sources de carbone spécifiques assimilables.

Afin de sélectionner des souches capables de dégrader les PLA, trois stratégies ont été suivies :

- le criblage de champignons filamenteux qui se développent sur un support solide,
- la sélection d'une bactérie ayant des potentialités biochimiques intéressantes,
- la sélection *in situ* de microorganismes mis au contact de plaques massives de PLA racémique (PLA50) enfouies dans le sol.

3.2 Sélection d'un champignon filamenteux

Les champignons filamenteux se développent de préférence sur des substrats solides humides. Pour cette raison, nous avons examiné l'activité de souches isolées susceptibles d'utiliser les PLA ou les résidus de leur dégradation hydrolytique comme unique source de carbone et d'énergie.

3.2.1 Conditions d'étude

Compte tenu de la possibilité de dégradation hydrolytique qui génère des résidus de faibles masses molaires assimilables par des champignons filamenteux, nous avons retenu trois substrats modèles :

- l'acide lactique racémique (solution Sigma à 85% d'acide DL-lactique) qui est le produit ultime de la dégradation hydrolytique du PLA50.
- des oligomères PLA50 (\bar{M}_p relatif < 1000) transparents, très visqueux à température ambiante et considérés comme modèles des fragments oligomères solubles dans l'eau et relargués par la dégradation des matériaux massifs.

- un copolymère PLA37,5GA25 ($\bar{M}_p = 150.000$) sous forme de grains de taille moyenne égale à 1 mm, pour examiner l'attaque de segments PLA50 et l'éventuel effet de la présence d'unités d'acide glycolique.

Les conditions et la composition du milieu de cultures sont résumées dans le Tableau 3.1.

Selon un mode opératoire standard, 50 ml du milieu de culture sont répartis dans des fioles Erlenmeyer de 250 ml et sont ensuite stérilisés pendant 15 mn à 121°C. L'acide lactique est additionné au milieu avant l'autoclavage et le pH est alors ajusté à 5,6 avec une solution de NaOH 5N. Les oligomères sont introduits aseptiquement après l'autoclavage pour éviter la dégradation liée au traitement thermique. Les grains de PLA37,5GA25 sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu agar stérile exempt de source de carbone.

Pour toutes les cultures, l'inoculation est faite pour chaque microorganisme à partir de suspensions de spores récupérées d'une préculture sur milieu gélosé à base d'amidon de pomme de terre (PDA) (après 7 jours d'incubation à 30°C).

3.2.2 Microorganismes

Les différentes souches de champignons filamenteux utilisées proviennent de la Collection du Laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM de Montpellier (Tableau 3.2).

Les critères suivants ont été retenus pour la sélection :

- a) Les genres *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* et *Trichoderma* se rencontrent fréquemment dans le sol.
- b) *Aspergillus niger* et *Fusarium moniliforme* ont été identifiés comme étant capables de dégrader d'autres polyesters aliphatiques : poly(*ε*-caprolactone) et poly(ester amide) (JARRET et coll., 1983 ; NISHIDA et TOKIWA, 1993 ; SEBASTIAO et coll., 1993 ; MARTINEZ et coll., 1992 ; CHEN et coll., 1993 ; GONSALVES et coll., 1992).
- c) *Aspergillus niger* est utilisé dans la méthode ASTM G21-70 (1980) pour l'évaluation de la biodégradabilité de matériaux plastiques.

Tableau 3.1 Conditions de culture des champignons filamenteux

Composition du milieu de culture (ROUSSOS, 1982)	
Composé	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 g
KH ₂ PO ₄	1,3 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,12 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,3 g
KCl	0,3 g
agar (milieu solide)	15 g
eau distillée	q.s.p. 1 l
solution de vitamines *	1 ml
solution d'oligoéléments *	1 ml
source de carbone	10 g
Taux d'inoculation : 2.10 ⁷ spores / g de source de carbone	
Conditions de culture :	
pH avant stérilisation	5,6 ± 0,1
Agitation	150 tpm
Température	28°C

* rajoutée au milieu stérile après filtration à 0,22 µm (composition donnée en Annexe no. 1)

Tableau 3.2. Liste des souches utilisées pour la sélection de microorganismes

Souche	Code	Clé
<i>Aspergillus awamori</i>	Aa 20	Aa
<i>A. awamori</i>	NRRL 3112	Aa
<i>A. foetidus</i>	NRRL 341	Af
<i>A. nidulans</i>	J1	Anid
<i>A. niger</i>	CH4	An
<i>A. niger</i>	An 10	An
<i>A. oryzae</i>	CCM F172	Ao
<i>Fusarium moniliforme</i>	Fmm	Fmm
<i>F. moniliforme</i>	Fml	Fml
<i>Penicillium roqueforti</i>	RE 10	Pr
<i>Penicillium</i> sp.	C16	Psp
<i>Rhizopus oligosporus</i>	196	Ro
<i>Trichoderma harzianum</i>	TH 31	Th
<i>Trichoderma</i> sp.	TH 15	T sp

3.2.3 Evaluation de paramètres

Les concentrations résiduelles en acide lactique, en ions ammonium (HPLC) ainsi que la production de biomasse (poids de matière sèche) et le pH sont considérés comme des paramètres importants pour l'appréciation de l'activité microbienne après un temps donné de mise en culture. Suivant ces paramètres, nous avons étudié la croissance de 14 souches de champignons filamenteux sur le milieu de culture contenant soit l'acide DL-lactique, soit les oligomères PLA50.

3.2.4 Consommation d'acide DL- lactique en milieu solide

La croissance des champignons filamenteux à la surface d'un milieu gélosé contenant de l'acide DL-lactique comme unique source de carbone et d'énergie est considérée comme un moyen efficace d'observer la capacité des souches pour consommer ce substrat.

Chaque boîte de Pétri contenant 20 ml de milieu gélosé à 1% d'acide DL-lactique est inoculée au centre par dépôt d'une suspension de spores des champignons choisis. Les boîtes sont placées dans une étuve à 28°C pendant 5 jours. La croissance des différentes souches est classée arbitrairement de 1 à 4, en fonction de l'abondance du mycélium développé.

Bien que nous ayons utilisé 5 espèces différentes d'*Aspergillus*, aucune n'a présenté une croissance importante. Par contre, les deux souches de *Fusarium moniliforme* et celle de *Penicillium roqueforti* sont celles qui ont montré la meilleure croissance (Tableau 3.3). Les *Trichoderma*, les *Aspergillus* et les *Rhizopus* ne se sont pas développés ou bien ont révélé une croissance extrêmement limitée.

Tableau 3.3. Classement des souches de microorganismes étudiés suivant l'observation visuelle de la croissance sur acide DL-lactique en milieu gélosé

Microorganisme	Clé	Croissance*
<i>A. foetidus</i>	Af	1
<i>A. niger</i>	An	1
<i>A. niger</i>	An	1
<i>A. awamori</i>	Aa	1
<i>A. awamori</i>	Aa	1
<i>A. nidulans</i>	Anid	1
<i>A. oryzae</i>	Ao	1
<i>T. harzianum</i>	Th	1
<i>Trichoderma</i> sp.	Tsp	1
<i>Penicillium</i> sp.	Psp	2
<i>R. oligosporus</i>	Ro	2
<i>P. roqueforti</i>	Pr	3
<i>F. moniliforme</i>	Fmm	4
<i>F. moniliforme</i>	Fml	4

*estimation de la croissance par observation visuelle (1: faible croissance, 4: croissance abondante)

3.2.5 Consommation d'acide DL- lactique en milieu liquide

Afin d'éliminer tout risque de croissance parasite liée à la dégradation de l'agar et de pouvoir analyser l'ammonium et l'acide DL-lactique résiduels, nous avons comparativement utilisé le milieu de culture liquide contenant 10 g.l^{-1} d'acide DL-lactique comme seule source de carbone et d'énergie.

Après 7 jours de culture agitée à 28°C , les résultats montrent que trois souches seulement sont capables de consommer totalement l'acide lactique : les deux souches de *Fusarium moniliforme* et celle de *Penicillium roqueforti* (Figure 3.2). Cette consommation s'accompagne d'un épuisement total de la source d'azote et d'une production importante de biomasse (3 g.l^{-1} maximum pour la souche *Fmm*).

Pour ces microorganismes, le pH final du milieu de culture est alcalin en raison de la faible capacité du tampon phosphate ($\text{pH} = 7,4$) à neutraliser les hydroxydes libérés après la consommation de l'acide DL-lactique (Figure 3.1).

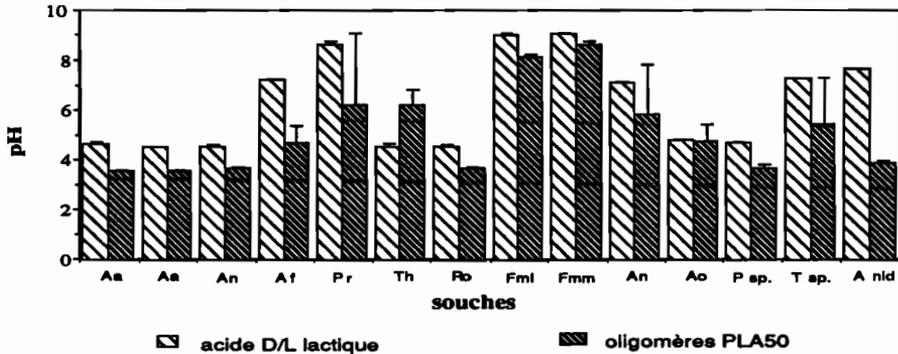


Figure 3.1 Valeurs finales de pH après 7 jours de cultures agitées à 28°C des champignons filamenteux dans des milieux à base d'acide DL- lactique ou d'oligomères de PLA50.

Les acides faibles peuvent pénétrer dans les cellules sous une forme non dissociée et ensuite se dissocier en acidifiant l'intérieur de ces cellules (GOTTSCHALK et KNACKMUSS, 1993). C'est pourquoi l'acide lactique est toxique pour plusieurs microorganismes. Cependant, il existe certains champignons filamenteux qui présentent une tolérance envers l'acide lactique, comme les souches des *F. moniliforme* et *P. roqueforti* testées dans cette étude.

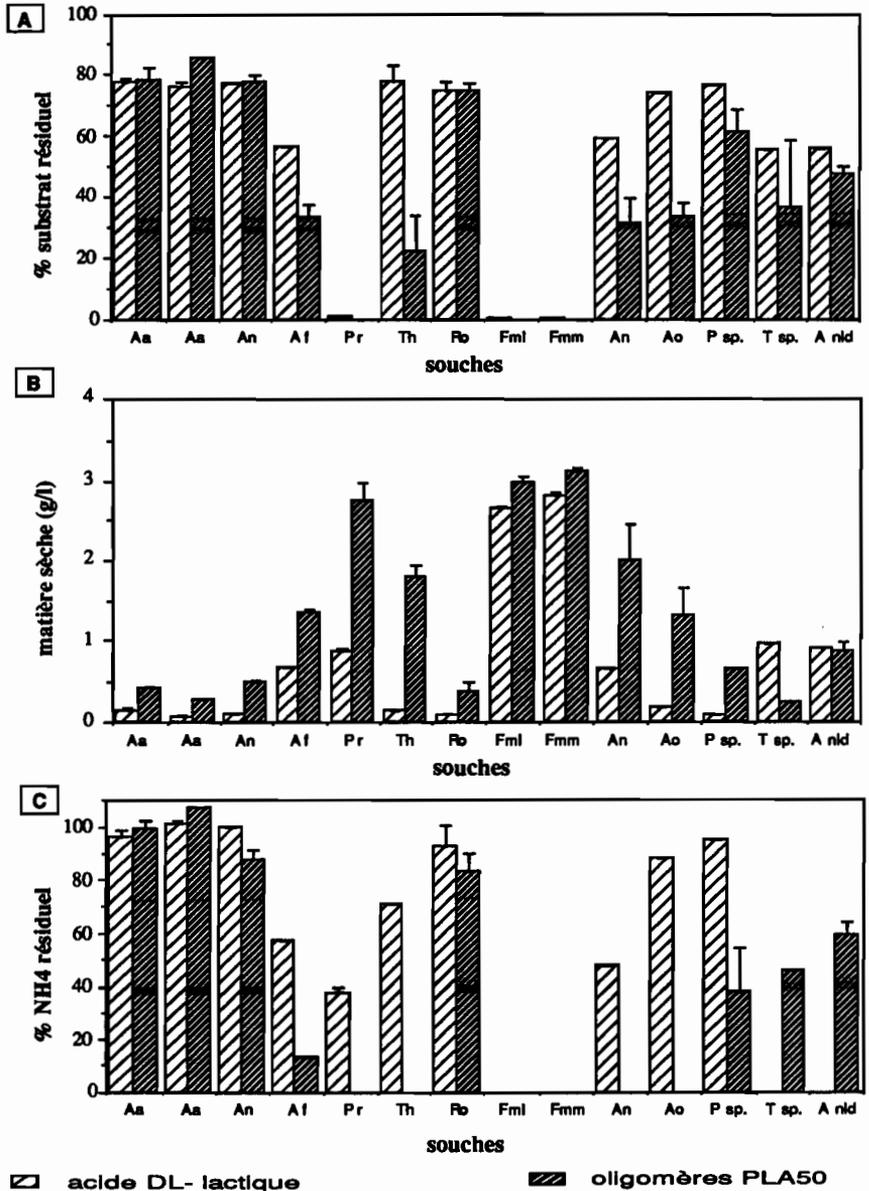


Figure 3.2 Criblage de champignons filamenteux dans des milieux à base d'acide DL-lactique ou d'oligomères PLA50 incubés à 28°C pendant 7 jours.
 A) Substrat résiduel. B) Matière sèche (biomasse). C) Source d'azote résiduelle.

3.2.6 Dégradation d'oligomères PLA50

L'activité microbienne des trois souches capables d'assimiler l'acide DL-lactique est confirmée par l'utilisation des oligomères PLA50. En effet, ces microorganismes ont consommé la totalité des oligomères et de la source d'azote après 7 jours de culture, en produisant une quantité de biomasse relativement plus importante que dans le milieu à base d'acide DL-lactique (Figure 3.2). La souche de *F. moniliforme* (Fmm) s'est présentée comme la plus performante.

La consommation totale d'oligomères PLA50 et de l'acide DL-lactique par les souches indiquées montre qu'elles sont capables d'assimiler les deux formes énantiomères D et L sans distinction.

3.2.7 Dégradation du copolymère PLAGA

Les grains de PLA37,5GA25, une fois déposés à la surface d'un milieu de culture gélosé, sont inoculés avec une suspension de spores des champignons sélectionnés. Après deux mois d'incubation à 28°C, la souche de *Fusarium moniliforme* (Fmm) s'est révélée la seule à présenter un développement important de mycélium à la surface du matériau.

Une analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)(Microscope JEOL J.S.M. 35), après fixation au glutaraldéhyde (cf. Annexe 2), nous a permis d'observer la présence de ce microorganisme à la surface du copolymère. Dans la Figure 3.3 (A), on remarque une déformation de la surface provoquée par l'invasion du copolymère PLA/GA par le mycélium de *F. moniliforme*, alors que le matériau qui a été incubé dans les mêmes conditions mais sans microorganisme présente une surface beaucoup plus régulière. La Figure 3.3 (B) montre que la croissance de *F. moniliforme* a lieu non seulement à la surface du matériau, mais également dans la masse : les hyphes semblent capables de pénétrer la masse du polymère en quête de nutriments. Il se peut que la libération dans le milieu de petites molécules produites lors de la dégradation hydrolytique du copolymère PLA/GA favorise le développement de *F. moniliforme*. Cependant, cette dégradation devrait être limitée puisque le taux d'humidité était réduit dans le milieu d'incubation.

Par conséquent, on peut considérer deux possibilités :

- soit *F. moniliforme* possède un système enzymatique capable d'attaquer le copolymère en libérant des acides lactique et glycolique ensuite utilisés comme source de carbone,
- soit le microenvironnement existant entre le matériau et les hyphes du champignon favorise une hydrolyse chimique du PLA/GA par la consommation rapide des acides libérés dans le milieu de culture.

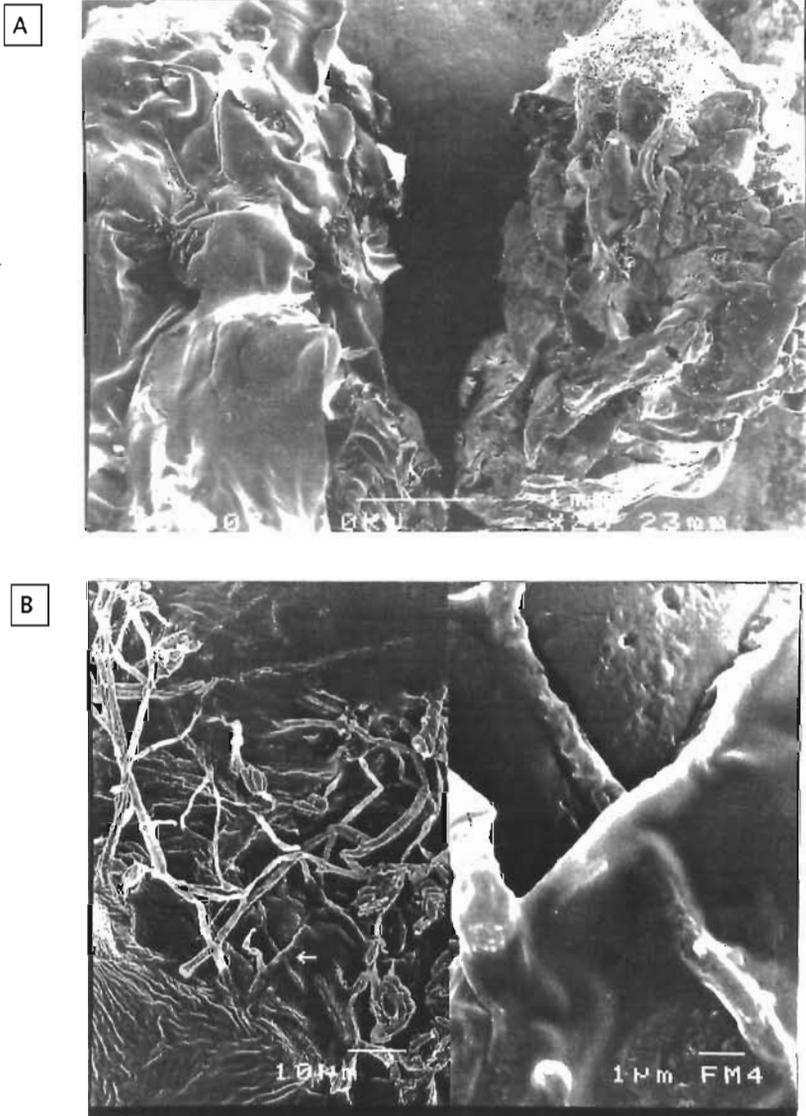


Figure 3.3 Développement du mycélium de *F. moniliforme* (Fmm) après 2 mois d'incubation à 28°C sur des grains de PLA37,5GA25

A) Comparaison entre le matériau inoculé (droite) et non inoculé (gauche)(X20).

B) Pénétration du mycélium dans le matériau copolymère (gauche : X1000; droite : X7500)

3.2.8 Description de *Fusarium moniliforme*

Le genre *Fusarium* regroupe des champignons filamenteux appartenant à la classe des Hyphomycètes qui produisent des conidies, formes de reproduction asexuée souvent portées par un filament différencié, le conidiophore. Les *Fusarium* sont des moisissures cosmopolites que l'on rencontre souvent sur les plantes. Ces espèces peuvent intervenir en tant que premier ou second colonisateur, selon la plante. L'espèce *moniliforme* est un parasite important d'un très grand nombre de monocotylédones et particulièrement de plusieurs graminées cultivées (BOTTON et coll., 1985).

Les conidies de *Fusarium moniliforme* apparaissent par "bourgeonnement" à partir de cellules spécialisées ou cellules mères, les monophialides qui peuvent être ou non ramifiées. Suivant les conditions de culture, les monophialides produisent deux types de conidies : les microconidies et les macroconidies.

- Les microconidies sont abondantes et initialement ovales ou sous forme de massue avec une base aplatie. Elles peuvent être également présentes sur des monophialides sous forme de fausses têtes (Figure 3.4 A).
- Les macroconidies sont des formes plus rares. Leur apparence est variable, plus ou moins linéaire avec des faces ventrale et dorsale parallèles, et des parois fines. La cellule basale est en forme de pied (Figure 3.4 B).

De plus, lorsque les conditions de vie sont défavorables, *F. moniliforme* peut produire des sclérotés qui se présentent sous forme de masses mycéliennes compactes, souvent dures et de couleur bleue foncée. Ce pigment est diffusé dans le milieu gélosé et donne une coloration violette propre à cette souche. Les sclérotés sont considérés comme des organes de conservation. Sur milieu PDA, *F. moniliforme* développe une partie aérienne blanche qui croît très rapidement et qui est généralement mouchetée de pourpre.

La forme parfaite (cycle biologique bien défini avec une reproduction sexuée) de cette espèce est appelée *Gibberella fujikuroi* qui est intéressante en biotechnologie, en particulier pour la production d'hormones végétales : les gibbérellines.

La température optimale de croissance de *F. moniliforme* est située entre 22,5 et 27,5 °C ; la température maximale tolérée étant de 37°C. Le lactate est l'une des sources de carbone utilisées par cette espèce. Une enzyme cellulolytique a été retrouvée dans du maïs infecté par ce champignon qui est également capable de provoquer une perte de résistance à la tension des tissus. Il utilise la cellulose du coton, du papier filtre et la cellulose bactérienne avec une

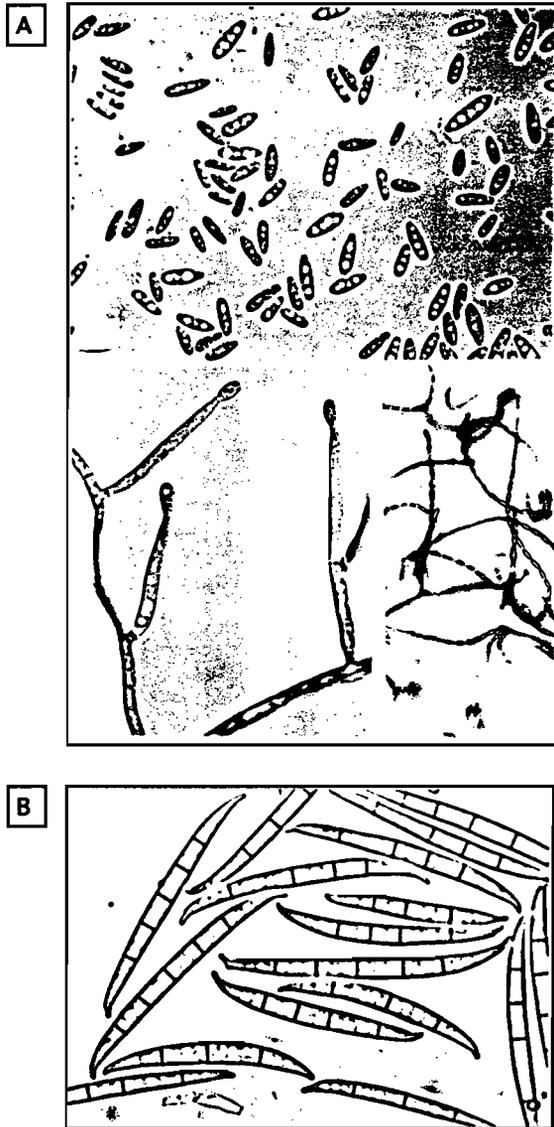


Figure 3.4 Aspects morphologiques de reproduction asexuée de *F. moniliforme* :
A) En haut : microconidies produites par du mycélium aérien.
En bas : microconidiophores (monophialides) et microconidies en chaînes.
B) Macroconidies (NELSON et coll., 1983).

activité cellulolytique maximale à pH 5,5. Des hydrocarbures tels que le décane, undécane, hexadécane et des paraffines sont oxydés par ce microorganisme (DOMSCH et coll., 1980).

Quelques espèces de *Fusarium* sont capables de se développer sur la cutine et de l'utiliser comme seule source de carbone. La cutine est le composant structural des plantes. C'est un mélange de polyesters insolubles dont les unités monomères sont des composés hydroxy-acides de 16 à 18 atomes de carbone. Les cutines ont été purifiées et caractérisées en détail par KOLATTUKUDY (1984). Les cutinases sont des carboxyl-estérases responsables de la dégradation de la cutine. Leur rôle est de faciliter la pénétration de ces champignons dans la plante pour l'infecter.

La présence de cutinases extracellulaires a été mise en évidence par électrophorèse (SEBASTIAO et coll., 1993). Il a été observé que ces enzymes ont une activité lipolytique qui augmente dans des interfaces lipides-eau et que leur vitesse de dégradation de la cutine est plus importante lorsque la chaîne $(CH_2)_n$ aliphatique est courte. Ces enzymes présentent une spécificité pour les esters d'alcools primaires et peuvent agir en tant qu'endo et exo enzymes à la fois. Leur pH optimum est de 10.

Les estérases et les cutinases ne sont pas dépendantes d'une activation d'interface (solvant organique/eau) car il n'y a pas de restriction d'accès au site catalytique, alors que pour les lipases cette restriction existe. Les cutinases diffèrent des lipases car elles sont actives tant dans des triglycérides solubles que dans des triglycérides émulsifiés. Ainsi, les cutinases établissent un lien entre les estérases et les lipases (MARTINEZ et coll., 1992).

L'action de *F. moniliforme* sur la poly(ϵ -caprolactone) (PCL) en particulier a été étudiée par plusieurs auteurs (NISHIDA et TOKIWA, 1993 ; SEBASTIAO et coll., 1993 ; MARTINEZ et coll., 1992 ; CHEN et coll., 1993). Ils affirment que ce polymère peut être considéré comme un analogue de la cutine, et que l'activité des enzymes de *F. moniliforme* est limitée par la présence d'un cofacteur qui pourrait être un surfactant. En effet, lorsque l'enzyme pure est utilisée, la dégradation est beaucoup plus lente.

En étudiant la dégradation des films de PCL par *Cryptococcus laurentii* et *F. moniliforme*, JARRET et coll. (1983) ont observé que la dégradation se réalise d'abord dans les parties amorphes par une enzyme extracellulaire et que cette dégradation provoque l'apparition de trous dans les films. De cette façon, le polymère se comporte comme une éponge : la surface interne disponible pour la dégradation augmente, même si l'échantillon conserve les mêmes dimensions. Dans le cas des cristaux, la dégradation enzymatique est limitée d'abord à la surface pour atteindre ensuite le centre.

GONSALVES et coll. (1992) ont observé que *F. moniliforme* est aussi capable de provoquer une érosion de la surface des films de poly(ester-amide)(PEA) après 33 jours d'incubation à 20°C, alors que la perte de masse molaire était très faible. Après 60 jours, ils ont récupéré un échantillon très poreux avec une perte de matière importante (35%) indiquant que la dégradation avait été faite non seulement à la surface mais aussi dans la masse. La dégradation hydrolytique, par contre, n'avait atteint que 7% de réduction de la masse molaire après 165 jours à 37°C.

CHEN et coll. (1993) ont observé qu'en plus de *F. moniliforme* deux autres microorganismes peuvent dégrader les PEA : *Aspergillus niger* et *Cryptococcus laurentii*. Ce dernier est capable de dégrader des films de 30 µm d'épaisseur en une semaine et de consommer les oligomères de faibles masses molaires comme unique source de carbone. Ces auteurs avaient également affirmé que la biodégradation des PEA se fait d'abord par rupture des liaisons ester, suivie par l'utilisation des sous-produits. Ce phénomène avait été confirmé par l'analyse des spectres infrarouges qui montrent que l'intensité de l'absorption ester diminue considérablement, alors que celle du groupement amide reste inchangée.

La capacité de *F. moniliforme* à se développer sur le copolymère PLA/GA pourrait être donc liée à la production des cutinases.

Conclusion

Des 14 souches de champignons filamenteux testées, trois seulement sont capables d'utiliser l'acide DL-lactique ou des oligomères comme seule source de carbone et d'énergie. Parmi ces trois souches, seul *Fusarium moniliforme* (Fmm) a été apte à se développer sur un copolymère d'acide lactique/acide glycolique (TORRES et coll., 1993; VERT et coll., 1994). Cette capacité pourrait être liée à la production d'enzymes extracellulaires qui dégradent d'autres polyesters aliphatiques naturels comme la cutine (cutinases). Néanmoins, l'activité de ces enzymes n'a pas été mise en évidence dans les expériences menées avec les oligomères. Il sera intéressant d'essayer par la suite de distinguer l'attaque enzymatique de la seule consommation des résidus provenant de l'hydrolyse chimique.

3.3 Sélection d'une bactérie

Parmi la grande variété de bactéries aérobies qui existent dans la nature, les espèces du genre *Pseudomonas* sont les plus répandues, en particulier dans le sol et dans les milieux aquatiques. Ces bactéries appartiennent à la famille des *Pseudomonadaceae* : bacilles (courts ou longs) de taille variable comprise entre 0,5 - 1 par 1,5 - 4 μm , Gram négatif, mobiles au moyen de flagelles polaires, aérobies et hétérotrophes. Beaucoup d'espèces produisent des pigments et quelques-unes peuvent être pathogènes. La température optimale de leur croissance varie entre 4 et 41°C (PALLERONI, 1977).

Une étude détaillée de plusieurs espèces de *Pseudomonas* a été réalisée par LIZARRAGA-PARTIDA (1979). A partir des différentes sources marines, cet auteur a isolé près de 90 espèces qu'il a testées sur 146 composés organiques différents parmi lesquels se trouvent sucres et dérivés sucrés, acides gras, acides dicarboxyliques, hydroxy acides, acides organiques, alcools et polyalcools, composés aromatiques et cycliques non azotés, acides aminés et amines. Il a été trouvé que pour toutes les espèces, il existe une capacité métabolique moyenne de plus de 50 % pour chaque type de composé. Par ailleurs, les *Pseudomonas* sont capables d'assimiler des sources particulières de carbone : les hydrocarbures paraffiniques, des composés à un seul atome de carbone ou des composés à plusieurs atomes de carbone non reliés entre eux directement (diméthylamine).

La plupart des espèces de *Pseudomonas* sont capables de produire des estérases (MCKAY, 1993 ; DONAHY et MCKAY, 1992). Ces bactéries dégradent également des copolymères poly(sodium acrylate-co-alcool vinylique) et les sous-produits de la dégradation ne sont pas accumulés en présence de microorganismes spécifiques (MATSUMARA et YOSHIKAWA, 1990).

Il existe trois groupes à l'intérieur de ce genre : a) *P. fluorescens*; b) *P. acidovorans* et c) *P. alcaligènes*. *Pseudomonas putida* appartient au premier groupe (LIZARRAGA-PARTIDA, 1979).

Pseudomonas putida a particulièrement été étudiée pour sa croissance sur les hydrocarbures aromatiques. En effet, cette bactérie possède l'information génétique nécessaire pour dégrader des hydrocarbures aromatiques, des polynucléaires aromatiques (xylène, toluène) ainsi que l'acide 2,4-D monochlorophénoxyacétique (GRADY, 1985). D'après GOTTSCHALK et KNACKMUSS (1993), elle est également capable de dégrader un nombre important de composés xénobiotiques. Toutes les espèces de *P. putida* sont capables d'utiliser l'acide lactique comme source de carbone et d'énergie, ainsi que d'autres hydroxy-acides (LIZARRAGA-PARTIDA, 1979 ; PALLERONI, 1977).

Pseudomonas putida est une bactérie aérobie hétérotrophe appartenant à la microflore naturelle du sol et de l'eau. Elle se présente sous forme de bacilles droits, Gram négatif, multiflagellés (flagelles polaires). Sa morphologie est comparable à celle des Entérobactéries desquelles elle se distingue par le caractère oxydase +. Son comportement est de type aérobie strict. Cette bactérie est en plus capable d'oxyder les sucres, mais elle ne peut pas les fermenter.

Sur la base de cette importante aptitude biochimique, nous avons sélectionné comme micro-organisme de référence une souche de *Pseudomonas putida* provenant de la Collection Tchèque de Microorganismes (CCM No. 3423).

3.4 Criblage naturel de souches

Il est possible qu'il existe dans l'environnement des microorganismes ayant un système enzymatique capable de dégrader les polymères d'acide lactique. La probabilité de rencontre de ces microorganismes avec des substrats aussi nouveaux que les polyesters aliphatiques de synthèse est restée extrêmement faible jusqu'à présent. Selon une approche classique, nous avons cherché à sélectionner des souches sauvages dans des conditions naturelles pour obtenir des espèces plus performantes que celles choisies précédemment.

Nous avons décidé de travailler directement avec des plaques massives de PLA50 d'une masse molaire moyenne de 40.000 (cf. §5.2.2).

Deux plaques ont été enfouies dans un bois de la région d'Agropolis à Montpellier pendant une période automnale pluvieuse (septembre-octobre 1993).

Après deux mois d'enfouissement, les plaques ont été récupérées, secouées et mises en culture sur boîte de Pétri contenant le milieu gélosé décrit dans le § 3.2.1. Après deux mois d'incubation à 28°C, les microorganismes développés à la périphérie des plaques ont été isolés et repiqués sur du PDA. Après 7 jours d'incubation à 28°C, les spores ont été recueillies à l'aide d'une solution détergente à base de Tween 80 (0,01%). Pour des raisons de temps d'expérience, la capacité des différentes souches à dégrader un PLA50 a été testée sur des oligomères.

3.4.1 Isolement de microorganismes

La méthode d'enfouissement dans le sol nous a permis d'isoler 5 groupes de microorganismes différents dont la plupart sont des champignons filamenteux (Tableau 3.4).

Seuls les isolats P1, P3 et P5 se sont révélés purs, alors que les P2 et P4 correspondaient à des mélanges de microorganismes (champignons et bactéries).

Tableau 3.4. Description des différents champignons filamenteux isolés dans des conditions naturelles

Code	Description
P1	Spores brunâtres. Une seule souche.
P2	Spores noires. Présence de quelques bactéries.
P3	Spores vertes. Une seule souche.
P4	Spores noires. Présence de quelques bactéries.
P5	Spores jaunes/brunâtres. Une seule souche.

3.4.2 Dégradation d'oligomères PLA50

La capacité des microorganismes naturels à dégrader les oligomères PLA50 a été testée dans les mêmes conditions que pour le criblage des champignons filamenteux (cf. § 3.2). La concentration résiduelle en acide lactique ainsi que la production de biomasse ont été évaluées par HPLC et par pesée, respectivement. Des oligomères PLA50 de masse molaire moyenne (2000) ont été utilisés et le temps de culture a été de 5 jours.

D'après la Figure 3.5, seule la souche P5 est capable de dégrader les oligomères de PLA50 au-delà de 40% en 5 jours. Pour les autres souches, le pourcentage de dégradation reste compris entre 20 et 30%. La production de biomasse (matière sèche) est moins importante que dans le cas des souches de *F. moniliforme*.

Les taux de dégradation d'oligomères et de production de biomasse par les microorganismes isolés du sol apparaissent inférieurs aux valeurs observées pour *F. moniliforme* et *P. roqueforti* sur des oligomères plus petits (1000). Cette lenteur est probablement due aux masses molaires plus importantes et au temps de culture plus court (5 jours contre 7). De toute façon, on peut d'ores et déjà conclure que les microorganismes des écosystèmes sélectionnés sont capables d'assimiler les oligomères PLA50, soit par l'intermédiaire des résidus de la dégradation hydrolytique, soit par une attaque directe des liaisons ester.

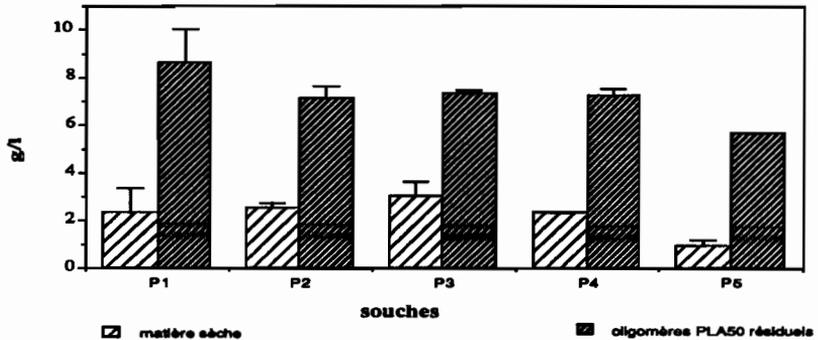


Figure 3.5 Matière sèche finale et oligomères résiduels après 5 jours de culture sur un milieu à base d'oligomères de PLA50 des microorganismes isolés du sol.

3.5 Conclusion

Les deux méthodes utilisées pour le criblage de microorganismes capables d'utiliser les résidus de la dégradation hydrolytique du PLA50 comme unique source de carbone et d'énergie ont permis de sélectionner des souches de champignons filamenteux pouvant se développer dans les conditions prédéterminées.

La première méthode, appliquée à partir de souches de collection cultivées *in vitro* avec des substrats différents (acide DL-lactique, oligomères PLA50 et copolymère PLA37,5GA25), a permis la sélection d'une souche de *F. moniliforme*. La deuxième méthode, utilisée tout d'abord dans des conditions *in situ* dans le sol, puis en laboratoire avec des plaques massives de PLA50, a permis d'isoler cinq groupes de microorganismes différents. Ces souches n'ont pas été identifiées plus précisément dans le cadre de cette thèse.

Il faut noter que les essais ont été réalisés à basse température (28°C) par rapport aux travaux *in vitro* généralement effectués à 37°C. Dans les conditions choisies, les contributions de la dégradation purement chimique suivie d'une bioassimilation et de la biodégradation par ces microorganismes se sont révélées difficiles à quantifier.

Afin de mettre en évidence la bioassimilation des produits de la dégradation chimique et l'aptitude des microorganismes sélectionnés à dégrader les PLA, nous nous sommes proposés d'étudier, d'une part, la consommation des résidus de la dégradation hydrolytique par *F. moniliforme* et par *P. putida* et, d'autre part, de mettre en évidence l'activité enzymatique liée à cette consommation.

BIODEGRADATION MICROBIENNE DES RESIDUS DE L'HYDROLYSE CHIMIQUE

4.-BIODEGRADATION MICROBIENNE DES RESIDUS DE L'HYDROLYSE CHIMIQUE DES PLA

4.1 Introduction

Les résidus de la dégradation chimique des plaques massives de PLA sont des molécules d'acide D- et L-lactique ainsi que des oligomères de faibles masses molaires qui peuvent diffuser hors de la matière lorsqu'ils deviennent suffisamment petits pour être solubles dans le milieu aqueux extérieur (LI et coll., 1990).

Le premier objectif du travail présenté dans ce chapitre a été d'étudier l'aptitude des micro-organismes sélectionnés à utiliser comme seule source de carbone et d'énergie des composés ultimes de dégradation : l'acide lactique, l'acide lactoyl lactique (dimère) et des oligomères insolubles. Ensuite, nous avons étudié l'effet de la présence de ces microorganismes sur la dégradation hydrolytique des oligomères par comparaison avec un témoin où les micro-organismes étaient absents. Enfin, il nous a paru intéressant de comparer les dégradations des composés racémiques amorphes, PLA50, et des composés semicristallins, PLA100.

Dans un premier temps, nous décrivons la méthode expérimentale utilisée pour évaluer la dégradation des composés : conditions de dégradation, caractéristiques des matériaux analysés, paramètres évalués ainsi que les techniques analytiques employées. Nous présenterons ensuite les résultats de la dégradation des composés racémiques et des composés à 100% d'unités L-lactique. Finalement, nous établirons une comparaison entre les cultures pures et les cultures mixtes de *F. moniliforme* et de *P. putida* vis-à-vis des oligomères.

4.2 Matériels et Méthodes

4.2.1 Mise au point des conditions de dégradation

Les conditions d'attaque microbiologique des résidus de l'hydrolyse chimique des plaques massives de PLA ont été fixées afin de comparer la dégradation par les champignons filamenteux à celle réalisée par les bactéries.

Selon le protocole retenu, nous avons utilisé comme source de carbone et d'énergie l'acide lactique, l'acide lactyl lactique ou des oligomères à une concentration de 10 g.l⁻¹. Il faut noter

cependant que cette concentration ne correspond pas à la même quantité d'acide lactique fournie par chaque composé. En effet, 10 g.l⁻¹ d'acide lactique représentent 0,11 mol.l⁻¹, alors que pour la même concentration pondérale, il y a 0,12 mol.l⁻¹ dans le cas du dimère et 0,13 mol.l⁻¹ dans le cas des oligomères. Ces différences n'ont pas été prises en compte tout au long de cette étude.

Une très faible quantité de glucose (0,5 g.l⁻¹) a été ajoutée à tous les milieux de culture afin de faciliter le démarrage de la croissance microbienne. Comme source d'azote, nous avons sélectionné un mélange : phosphate d'ammonium + urée. La concentration de ces composés a été calculée de façon à obtenir un rapport massique initial C/N de 10. Cette valeur est souvent employée en microbiologie pour assurer une non-limitation de la source d'azote quand une production d'enzymes ou de biomasse est recherchée.

Pour faciliter la solubilisation des oligomères dans le milieu, du méthanol a été inclus dans la composition du milieu à raison de 7,9 g.l⁻¹. Par ailleurs, nous avons fixé la concentration du tampon phosphate à 20 mM afin de limiter le pouvoir tampon et suivre indirectement la dégradation des PLA par l'évolution du pH.

Les champignons ont en général un optimum de croissance situé entre 28-30°C et les bactéries préfèrent 28-37°C. La plupart de bactéries qui dégradent les composés organiques complexes, telles *Pseudomonas* spp., ont un optimum de croissance à 30°C (SATYANARAYANA et CHATTERJI, 1993 ; HUANG et coll., 1990). Nous avons fixé la température à 30°C d'après ces critères.

Pour leur développement, les champignons filamenteux et les bactéries se comportent différemment vis-à-vis des variations du pH des milieux de cultures. En général, les champignons sont souvent acido-tolérants alors que les bactéries requièrent un pH plutôt proche de la neutralité. Afin de choisir une valeur de pH acceptable pour les deux types de microorganismes, nous avons cultivé *F. moniliforme* sur acide DL-lactique à différentes valeurs initiales de pH, en faisant varier la concentration des composés tampon phosphate pour obtenir la gamme : 3,5 - 5,6 - 6,6 - 7,4 en ajustant le pH avec une solution de NaOH 5 N après addition de 10 g.l⁻¹ d'acide DL-lactique.

Les cultures ont été réalisées en milieu liquide agité à une température de 30°C pendant 5 jours. Le comportement de *F. moniliforme* a été suivi par la production de biomasse et par l'évolution du pH (cf. § 4.2.5). Les résultats montrent que pour des valeurs initiales de pH comprises entre 5,6 et 7,4, la production de biomasse par *F. moniliforme* ne présente pas de différence significative (Figure 4.1 A). Dans ce cas, il y a une phase de latence d'un jour. La phase stationnaire est atteinte entre 3 et 4 jours, avec une production de biomasse de 4 g.l⁻¹

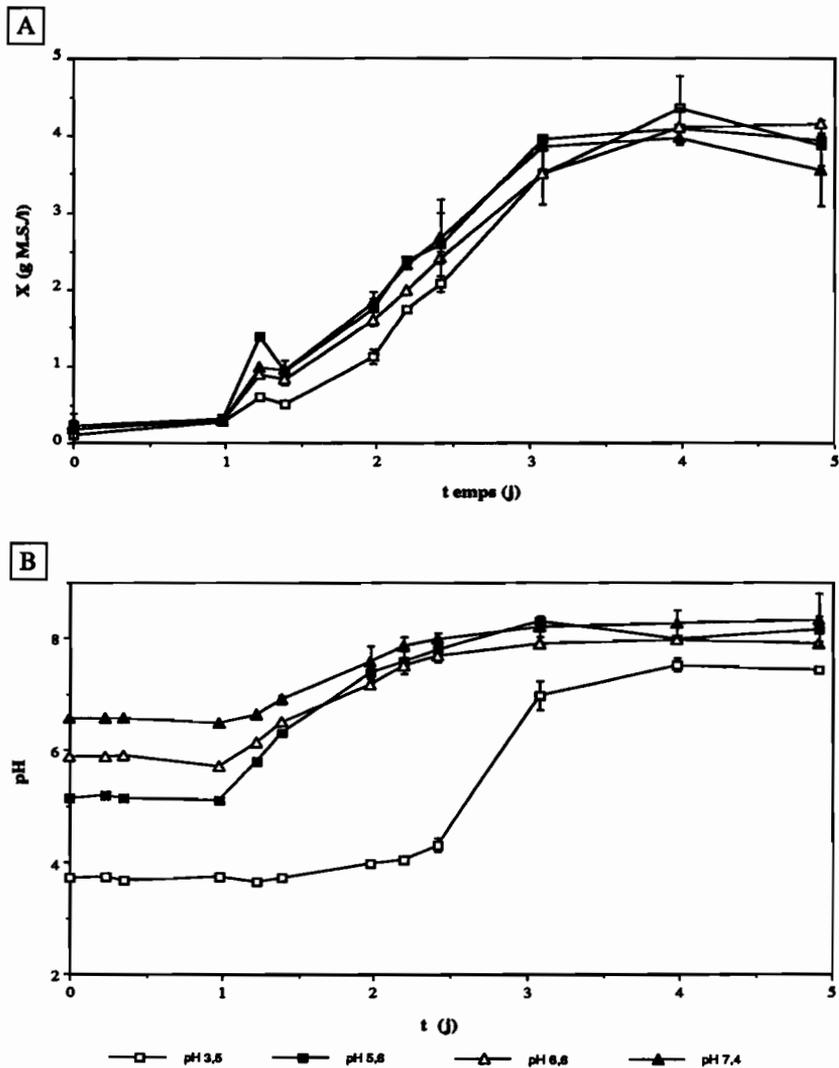


Figure 4.1 Effet du pH initial sur la croissance de *Fusarium moniliforme* dans un milieu de culture liquide à base d'acide DL-lactique :
 A) Production de biomasse (matière sèche).
 B) Evolution du pH.

en moyenne. Le pH maximum atteint dans la phase stationnaire est de 8 (Figure 4.1 B). Par contre, lorsque le pH initial est de 3,5, la phase de latence est plus longue et le pH n'augmente qu'après 2,5 jours de culture en ayant un maximum aux environs de 7 après 3 jours. Le retard dans l'augmentation du pH est dû à l'effet tampon de l'acide lactique en conditions acides.

Etant donné que le pH initial est apparu sans effet sur le développement de *F. moniliforme* dans la gamme comprise entre 5,6 et 7,4, nous avons fixé le pH à $6,6 \pm 0,1$, valeur qui est un bon compromis pour tous les microorganismes utilisés par la suite, notamment pour les cultures mixtes (Tableau 4.1).

Tableau 4.1 Conditions de dégradation microbiologique des résidus de dégradation hydrolytique du PLA.

Composition du milieu de culture	
Composé	
urée	0,80 g
(NH ₄)H ₂ PO ₄	0,52 g
glucose	0,50 g
NaH ₂ PO ₄	1,27 g
K ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	1,63 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,30 g
KCl	0,30 g
méthanol	7,90 g
eau distillée	q.s.p. 1 l
pH avant stérilisation	6,6 ± 0,1
Solution de vitamines *	1 ml
Solution d'oligoéléments *	1 ml
source de carbone	10,0 g
Taux d'inoculation	2.10⁷ spores ou bactéries par g de source de carbone
Conditions d'incubation	
Agitation	150 tpm
Température	30°C

* rajoutées au milieu stérile après filtration à 0,22 µm. Compositions en Annexe 1

4.2.2 Matériaux étudiés

Des PLA de masses molaires différentes ont été considérés :

Acide lactique

- solution à 85% d'acide DL-lactique (Sigma L-1250).
- solution à 88% d'acide L-lactique (Carlo Erba 304652).

Dimère cyclique

- L-lactide (Purac Biochem).
- DL-lactide (Purac Biochem).

Les dimères cycliques ont été recristallisés dans l'acétone avant utilisation afin d'éliminer les traces d'acide lactique éventuellement présentes.

Oligomères

Deux types d'oligomères ont été étudiés : PLA50 et PLA100. Les oligomères ont été synthétisés par polycondensation directe des solutions d'acide lactique présentées ci-dessus.

Le contrôle de la masse molaire moyenne (\bar{M}_p) et de la polymolécularité ($I = \bar{M}_p/\bar{M}_n$) des oligomères a été réalisé par chromatographie par exclusion de taille (SEC). Les conditions d'opération sont les suivantes :

Phase stationnaire : gel de polystyrène PL GEL MIXED
Phase mobile: dioxanne à 1 ml/mn.
Chromatographe : pompe Waters 600 A, injecteur U6K
DéTECTEUR : réfractomètre différentiel Waters R 401
Volume d'injection : 20 μ l (solution à 1 % dans du dioxanne)
Température : ambiante (18 - 25°C)
Etalonnage : solutions étalon de polystyrène Waters

- Oligomères PLA50.

Le lot d'oligomères utilisé avait un \bar{M}_p de 2000 et une I de 1,3. Ces oligomères étaient transparents et rigides à température ambiante pour devenir visqueux sous l'effet de la chaleur. Pour faciliter leur manipulation, ils ont été chauffés avant utilisation. Afin de réduire au maximum la dégradation par ce traitement, ce lot a été réparti dans plusieurs récipients de façon à ne pas avoir à réchauffer le même récipient plusieurs fois.

- Oligomères PLA100.

Deux lots d'oligomères PLA100 ont été employés. Le premier lot (PLA100 No. 1) avait un \bar{M}_p de 1500 et une I de 1,4. Il s'est avéré nécessaire d'éliminer les fractions de faibles masses molaires solubles dans le milieu de culture en les dissolvant dans l'acétone avant de les précipiter par le milieu lui-même. Le précipité obtenu a été séché sous vide laissant une poudre blanche facilement manipulable. Cette poudre a été broyée et tamisée. La fraction comprise entre 0,3 et 0,8 mm a été retenue pour notre étude (PLA100 No. 2).

Le deuxième lot d'oligomères de PLA100 avait un \bar{M}_p de 4000 et une I de 1,4. Ces oligomères ont été dissous dans le chloroforme puis précipités par le milieu de culture. Le produit obtenu après séchage sous vide a également été broyé et tamisé pour récupérer la fraction 0,3-0,8 mm (PLA100 No. 3).

4.2.3 Préparation des milieux de dégradation

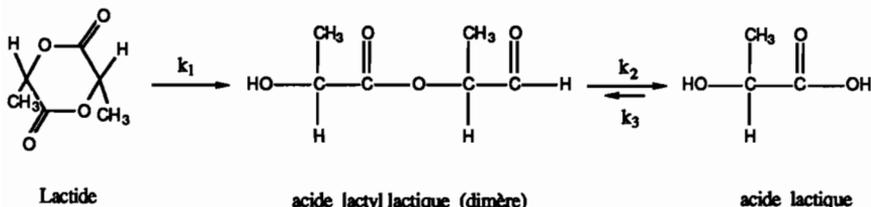
Le milieu de culture est stérilisé à 121°C pendant 20 mn. Les solutions de vitamines et d'oligoéléments sont ensuite rajoutées par filtration stérile à 0,22 µm.

A) Milieu à base d'acide lactique

L'acide lactique est introduit dans le milieu avant autoclavage, le pH étant ajusté à 6,6 à l'aide d'une solution de NaOH 5N. La quantité d'acide L- et DL-lactique a été ajoutée en considérant les concentrations des solutions commerciales (88 et 85% respectivement). Les concentrations ont été vérifiées par titration au retour avec NaOH 1N.

B) Milieu à base de dimère

Le lactide est un cycle lactonique qui, ouvert en milieu aqueux, donne l'acide lactyl lactique : le dimère, pouvant conduire par équilibre à l'acide lactique. La série des réactions est la suivante :



Les cristaux de lactide sont insolubles dans l'eau. Après leur addition au milieu de culture stérile, il a fallu attendre 1 heure avant que tout le lactide se soit transformé en dimère (vérification par HPLC). Ensuite, un volume de 0,6 ml d'une solution de NaOH 10 N a été ajouté pour remonter le pH à 6,6. L'addition a été retardée par rapport au temps zéro afin d'éviter l'hydrolyse chimique immédiate et totale de l'acide lactyl lactique. L'inoculation du milieu a été réalisée après l'addition de la soude.

C) Milieu à base d'oligomères

Les oligomères de PLA sont rajoutés au milieu après la stérilisation afin d'éviter l'hydrolyse chimique consécutive à un traitement thermique en milieu aqueux. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire d'ajuster le pH.

4.2.4 Inoculation des milieux de culture

Dans le cas de *F. moniliforme*, l'inoculation a été faite avec une suspension de spores comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Les spores ont été récupérées d'un milieu de préculture sur PDA (7 jours d'incubation à 30°C) dans l'eau distillée contenant du Tween 80 à 0,01%.

Dans le cas de *P. putida*, il a été nécessaire d'établir une relation entre la Densité Optique (D.O.) et les Unités Formant Colonies (U.F.C.) qui sont directement liées à la quantité de bactéries. La méthode consiste à étaler sur des boîtes de Pétri 0,1 ml de plusieurs dilutions (1/10, 1/100....etc) d'un milieu ayant différentes valeurs d'absorbance. La numérotation se fait par comptage des U.F.C. produites après 24h d'incubation à 30°C. Le résultat est ramené en U.F.C./ml après prise en compte des différentes dilutions et les valeurs sont corrélées avec l'absorbance.

Nous avons utilisé un milieu de préculture à base de glucose (RHEE et coll., 1992), additionné de 15 g/l d'agar pour l'étalement (Tableau 4.2). L'absorbance a été mesurée à 540 nm avec un spectrophotomètre Milton Roy Spectronic 401. Les lectures ont été réalisées pour des valeurs de D.O. inférieures à 0,5. Le blanc correspondait au milieu initial dilué au 1/10e et les échantillons étaient également dilués au 1/10e.

La relation entre les U.F.C. et la D.O. permet de calculer le volume qu'il est nécessaire d'inoculer dans le milieu de culture afin d'obtenir la quantité de cellules souhaitée (Figure 4.2).

Pour les cultures mixtes, nous avons utilisé le même taux d'inoculation pour chaque micro-organisme ($2 \cdot 10^7$ spores de champignons et $2 \cdot 10^7$ bactéries par g de source de carbone).

Tableau 4.2 Composition du milieu de préculture de *P. putida*

Composé	Quantité
glucose	20,0 g
extrait de levure	4,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0 g
Na ₂ HPO ₄	1,7 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,02 g
Fe SO ₄ . 7H ₂ O	0,01 g
eau distillée	q.s.p. 1 l
pH avant stérilisation	6,8 ± 0,1
Solution de vitamines *	1 ml
Solution d'oligoéléments *	1 ml

* rajoutées au milieu stérile après filtration à 0,22 µm. Compositions en Annexe 1

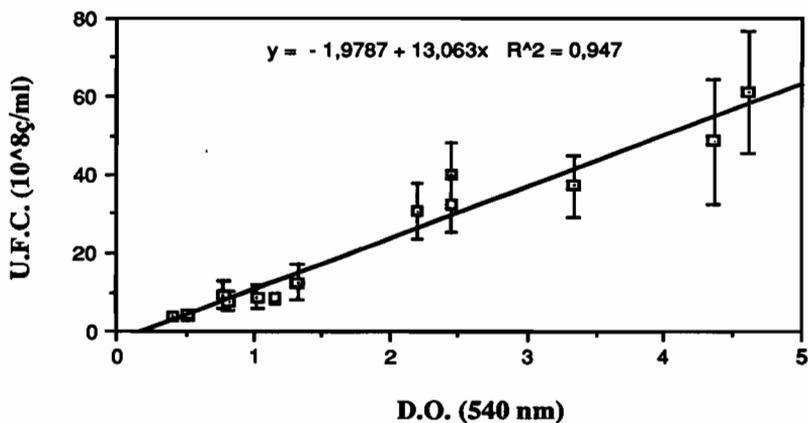


Figure 4.2 Relation entre la densité optique (D.O.) à 540 nm et les unités formant colonies (U.F.C.) d'une culture de *P. putida* sur un milieu de préculture à base de glucose.

4.2.5 Traitement des échantillons et paramètres évalués

A) Dégradation du monomère et du dimère

Les paramètres suivants ont été évalués : production de biomasse (matière sèche), évolution du pH et consommation du substrat (HPLC). Ces évaluations ont été réalisées sur des prélèvements de 3 ml pour chaque point du suivi de l'évolution des cinétiques, à partir d'un volume total de 100 ml.

B) Dégradation des oligomères

La mesure de la dégradation d'oligomères pose des problèmes similaires à ceux rencontrés pour les milieux biphasiques tels que huile-eau. Il s'agit en effet de milieux hétérogènes où l'échantillonnage par aliquot est particulièrement difficile à réaliser.

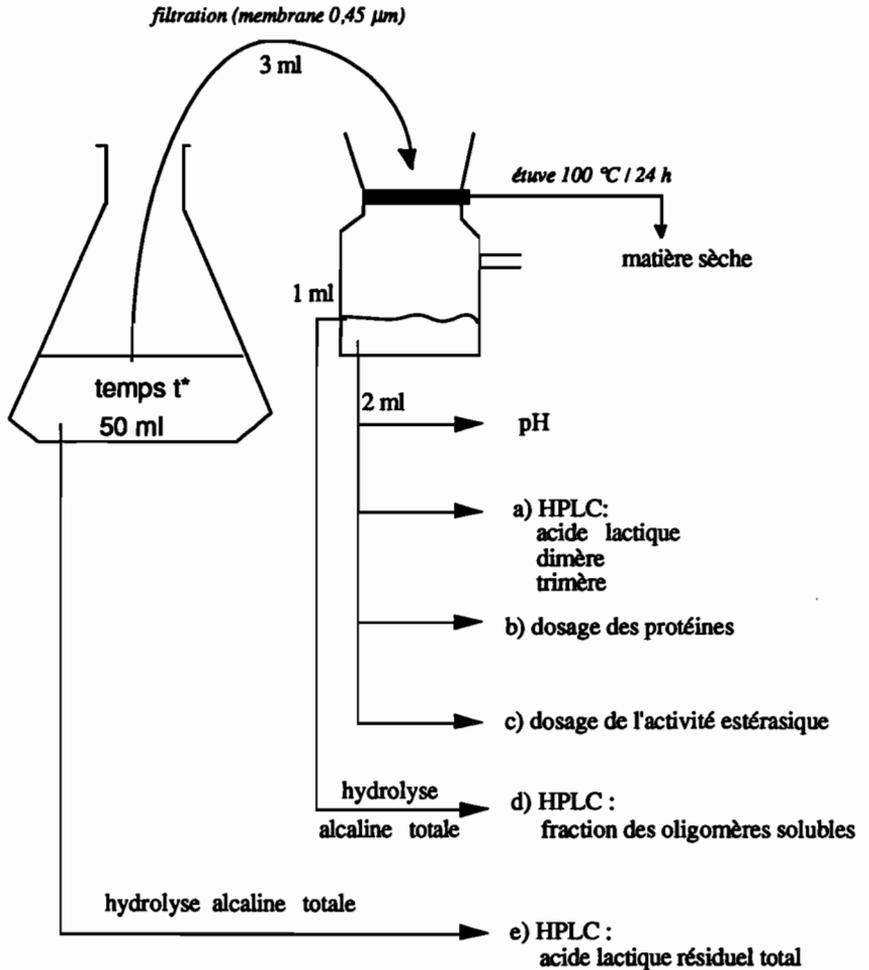
Afin d'évaluer la consommation des oligomères par les microorganismes, il s'est avéré indispensable d'utiliser le contenu total des fioles Erlenmeyer (50 ml) pour chaque point des cinétiques. Selon une procédure standard, ce volume est divisé en deux parties (Figure 4.3) :

- 6 ml sont filtrés et les surnageants obtenus sont utilisés pour l'évaluation de :

- a) la présence d'acide lactique, de dimère et de trimère en solution ;
- b) la concentration en protéines solubles ;
- c) l'activité estérasique ;
- d) la fraction totale des oligomères solubles, après hydrolyse alcaline totale.

- Le volume restant (environ 44 ml) est hydrolysé par addition de 3 ml de NaOH 10 N suivie d'un réchauffement jusqu'à ébullition pendant 2 mn. Afin de neutraliser les échantillons avant leur analyse par HPLC, 3 ml de H₂SO₄ 10N sont ajoutés. Après prise en compte des dilutions, nous avons pu évaluer la concentration en acide lactique résiduel total, comprenant tous les composés à des degrés différents de polymérisation (acide lactique, dimère... oligomères solubles et oligomères insolubles).

Les moyennes et les écarts-types ont été calculés à partir de mesures dupliquées ou tripliquées ; certains points ont été répétés jusqu'à 5 fois pour affiner les écarts-types.



* le contenu total d'une fiole Erlenmeyer est utilisé pour chaque temps de prélèvement

Figure 4.3 Schéma du traitement des échantillons pour suivre la dégradation microbologique des oligomères d'acide lactique.

C) Mesure de pH

La mesure du pH a été effectuée directement sur les échantillons à l'aide d'un pH-mètre muni d'une électrode combinée Ingold. L'étalonnage de l'appareil a été réalisé au moyen de deux solutions tampons (pH 4,01 et 6,87 à 25°C).

D) Matière sèche

Des filtres MILLIPORE HA 0,45 µm, placés dans des coupelles en aluminium, sont séchés dans le four à 100°C pendant 24 heures. L'ensemble coupelle+filtre est pesé après refroidissement au dessiccateur (P1). Le filtre est ensuite déposé sur le système de filtration. Après mise en marche de la trompe à vide, un volume (V) de la suspension microbienne est filtré et la membrane est rincée abondamment à l'eau distillée. Le vide est ensuite cassé, le filtre remis sur la coupelle et l'ensemble replacé au four à 100°C pendant 24 heures. La coupelle et le filtre sont pesés après refroidissement au dessiccateur (P2). La teneur en matière sèche est obtenue par l'équation :

$$\text{Matière sèche (g/l)} = \frac{P2 \text{ (g)} - P1 \text{ (g)}}{V \text{ (l)}}$$

E) Mise au point d'une méthode de dosage des résidus de dégradation du PLA

Pour l'analyse de l'acide lactique, nous avons utilisé une technique de chromatographie ionique HPLC. Une colonne d'exclusion ionique a permis de détecter trois résidus d'hydrolyse des oligomères de PLA : l'acide lactique, le dimère (l'acide lactyl lactique) et le trimère (l'acide lactyl lactyl lactique). Afin d'avoir la meilleure résolution possible par cette colonne, nous avons fixé la concentration de la phase mobile, H₃PO₄, à 0,02%. Cette concentration donne une valeur de pH supérieure au pKa de l'acide lactique qui facilite l'échange d'ions avec la résine sans réchauffement de la colonne pour empêcher la dégradation des composés pendant l'analyse.

Les conditions d'utilisation sont les suivantes :

Phase stationnaire : Colonne Shodex Ionpak KC-811 remplie avec une résine échangeuse d'ions du type copolymère styrène-divinylbenzène sulfaté (300 X 8 mm).

Phase mobile: H₃PO₄ à 0,02% et à 0,5 ml/min.

Chromatographe : Waters Millipore

Détecteur UV à 210 nm.

Volume d'injection : 20 µl

Température : ambiante

Pour bien vérifier les temps de rétention des résidus, nous avons étudié la solution d'acide DL-lactique Sigma à 10 g.l^{-1} en sachant qu'il existe un équilibre chimique entre les trois formes mentionnées. D'après la Figure 4.4, on observe clairement 3 pics correspondant à chacun des composés : le trimère à un temps de rétention de 15,5 mn ; le dimère à 16,3 mn et l'acide lactique à 18,0 mn. Par ailleurs, ces valeurs ont été confirmées grâce à l'utilisation des formes pures (acide lactique : solution à partir des cristaux à 98% de pureté de la forme L, Sigma No. 6402; dimère : solution à partir des cristaux de DL-lactide) qui ont également permis d'étalonner les concentrations en acide lactique et en dimère.

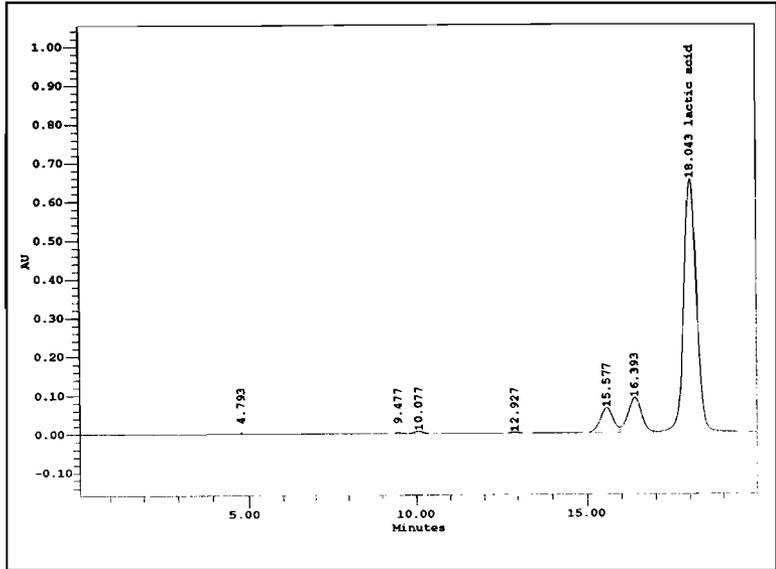


Figure 4.4 Chromatogramme de la solution à 10 g.l^{-1} d'acide DL- lactique Sigma.

Etant donné que la séparation des pics n'est pas complète, il a semblé préférable de prendre en compte la hauteur et non l'aire pour la quantification. Pour ce faire, nous avons vérifié la linéarité entre les hauteurs et les différentes concentrations des étalons (Figure 4.5).

Le trimère a été étaloné en utilisant des concentrations variables de la solution Sigma et en calculant la concentration après élimination du dimère et du monomère (Figure 4.6).

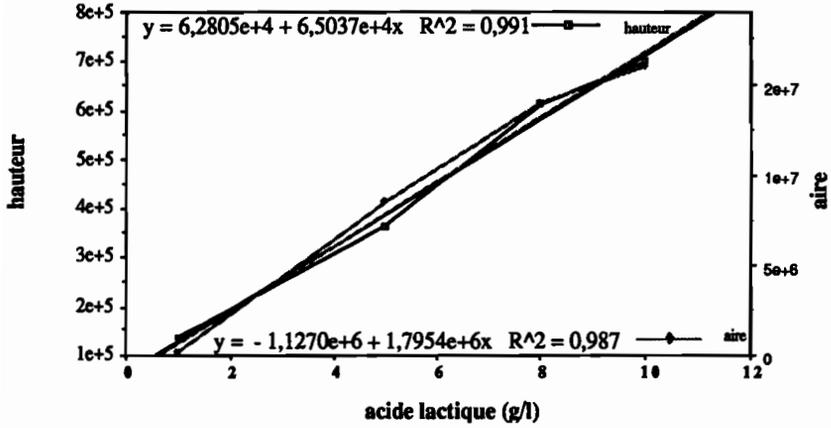


Figure 4.5 Relation linéaire entre la hauteur et l'aire des pics chromatographiques par rapport à la concentration d'acide lactique.

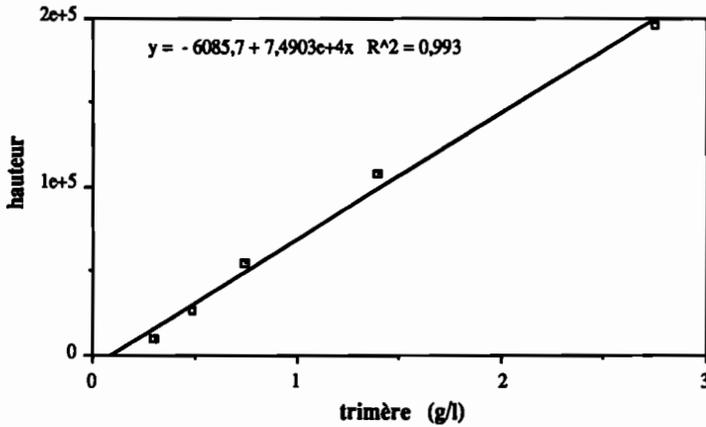


Figure 4.6 Courbe d'étalonnage du trimère d'acide lactique par rapport à la hauteur des pics chromatographiques.

F) Electrophorèse capillaire (HPCE)

Une technique d'électrophorèse capillaire a été utilisée afin de la comparer avec la méthode de chromatographie ionique choisie. Les conditions d'utilisation sont les suivantes :

Appareil : P/ACE 5000, Beckman instruments Inc.

Solution tampon : Borate 100 mM, pH = 8,9

Voltage constant : 30 kV

Détecteur UV : 200 nm

Capillaire : DI = 75µm; LT = 57 cm

Température : 25°C

G) Mise au point d'une méthode de dosage des protéines par spectrofluorescence

La méthode de dosage des protéines par spectrofluorescence est fondée sur le fait qu'elles contiennent des composés fluorophores naturels dans leur structure : tyrosine, tryptophane et phénylalanine (KRONMAN et HOLMES, 1971).

Afin de fixer les conditions opératoires (Spectrofluorimètre SPF-500C, SLM Instruments Inc.), nous avons utilisé comme protéine modèle l'albumine de sérum de bœuf (BSA) dans le milieu de culture pour prendre en compte des possibles interférences. L'excitation à 280 nm d'une solution à 0,3 g.l⁻¹ de cette protéine a donné le maximum d'émission à 347 nm (Figure 4.7).

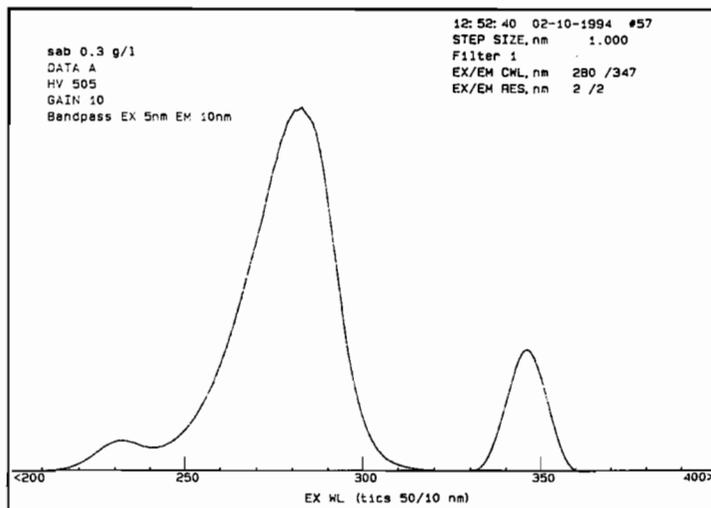


Figure 4.7 Spectre d'excitation et d'émission de fluorescence d'une solution d'albumine bovine sérique (BSA)

Ces conditions ont permis d'établir une courbe d'étalonnage à des concentrations différentes d'albumine avec une bonne corrélation (Figure 4.8). Des dilutions des surnageants des cultures ont été réalisées dans le cas où la concentration en protéines était supérieure à $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nous avons utilisé comme blanc le milieu de culture sans protéines.

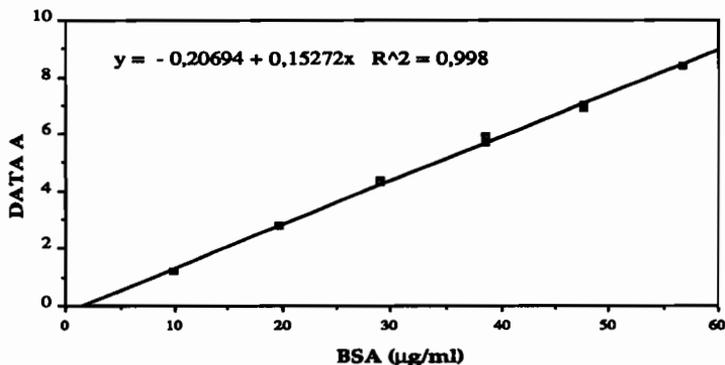


Figure 4.8 Courbe d'étalonnage par spectrofluorescence de l'albumine de sérum de boeuf (BSA)

H) Mise au point d'une méthode de dosage de l'activité estérasique

Pour mesurer l'activité estérasique, nous avons choisi la méthode à la fluorescéine. Le principe consiste à suivre l'augmentation d'absorbance à 490 nm consécutive à l'apparition dans le milieu de ce composé, libéré par l'action de l'estérase sur le diacétate de fluorescéine (FDA) (OBST et coll., 1988 ; TORSLOV, 1993).

La méthode a été modifiée de façon à diminuer le temps de l'activité de l'enzyme (3 heures). Les proportions utilisées sont les suivantes :

- 0,01 ml de FDA à 1 mg/ml dans l'acétone
- 4 ml de tampon phosphate
- 1 ml de surnageant de culture

Le facteur de dilution est de 0,2. Le contrôle correspond à une solution acétone/eau 1/1 (v/v). Pour déterminer le coefficient d'extinction molaire de la fluorescéine, le surnageant a été remplacé par une solution à 10 % d'estérase (Boehringer Mannheim GmbH). Plusieurs essais ont été réalisés avec des concentrations en FDA variables.

4.3 Résultats

4.3.1 Comparaison entre l'HPLC et l'HPCE

Bien que la méthode de dosage par HPLC des résidus de la dégradation du PLA se soit révélée efficace, il nous a semblé nécessaire de la comparer à la technique d'électrophorèse capillaire (HPCE). Cette dernière technique avait déjà été utilisée par BRAUD et VERT (1992) pour détecter les résidus de la dégradation hydrolytique du poly (acide β malique) en milieu aqueux.

L'analyse de la solution d'acide DL-lactique Sigma à 1 g.l^{-1} montre la présence de trois pics observés par la méthode de HPLC. Cependant, nous avons remarqué que, dans le cas de la solution d'acide L-lactique, il y a une limite dans la détection par HPLC du pic correspondant au trimère, alors que par HPCE ce pic est parfaitement séparé et détecté (Figure 4.9).

Par ailleurs, il a été observé que l'HPCE permet la détection des résidus jusqu'à l'hexamère d'acide lactique en milieu aqueux (Figure 4.10). Néanmoins, l'utilisation de cette technique pose de sérieux problèmes lorsqu'on veut analyser des milieux aussi complexes que les milieux biologiques où il y a une grande quantité de composés qui peuvent adhérer facilement au capillaire (cas des protéines). Pour cette raison, la technique chromatographique nous a semblé plus avantageuse.

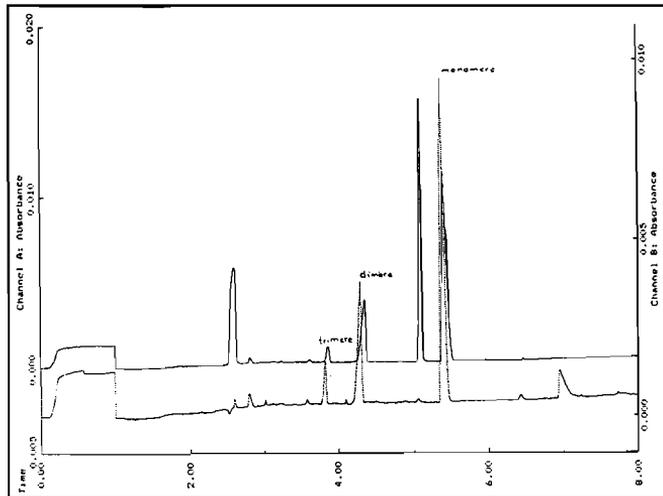


Figure 4.9 Comparaison entre la solution d'acide DL-lactique (en haut) et la solution d'acide L-lactique (en bas) à 1 g.l^{-1} par électrophorèse capillaire.

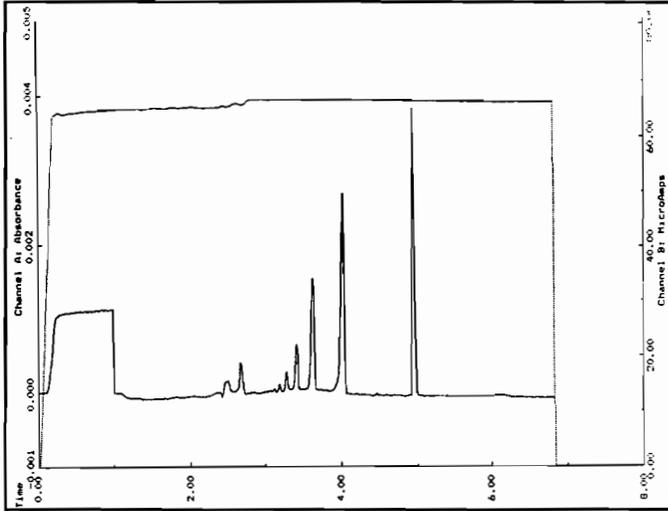


Figure 4.10 Electrophorégramme d'une solution aqueuse (tampon phosphate) d'oligomères de PLA50 après 11 h de polycondensation de la solution Sigma d'acide DL-lactique.

4.3.2 Production de biomasse dans le milieu sans source de carbone

Nous avons vérifié la production de biomasse, en termes de matière sèche, par *P. putida* et par *F. moniliforme* dans le milieu de culture appauvri. Ceci était nécessaire car le milieu dépourvu des dérivés de PLA contient d'autres composés pouvant être utilisés comme source de carbone par les microorganismes (méthanol, glucose, urée). D'après la Figure 4.11, la quantité de biomasse produite par les deux microorganismes est très faible : $0,4 \text{ g.l}^{-1}$ pour le champignon et $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ pour la bactérie.

4.3.3 Dégradation des composés du type DL-lactique

A) Dégradation de l'acide DL-lactique

La Figure 4.12 montre que *F. moniliforme* et *P. putida* sont capables d'assimiler totalement l'acide DL-lactique après 4 jours de culture aérobie à 30°C . Du fait d'une adaptation rapide de la bactérie à ce substrat, elle commence à le dégrader beaucoup plus vite que le champignon, pour lequel il y a une phase de latence de 24 heures. Au-delà, la vitesse de disparition est comparable pour les deux microorganismes : $3,8 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour la bactérie et $3,7 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour le champignon.

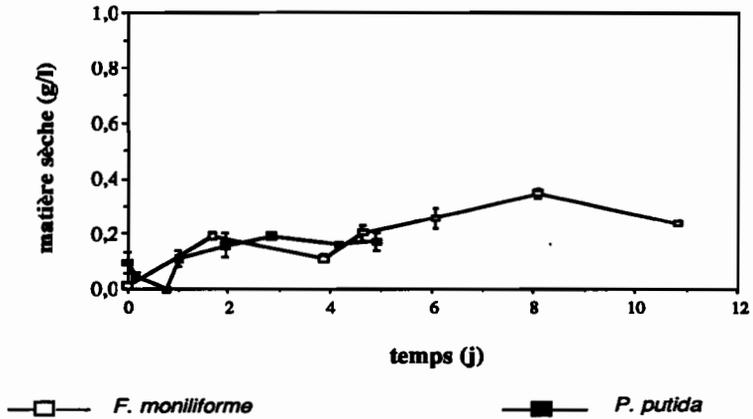


Figure 4.11 Production de biomasse par *P. putida* et par *F. moniliforme* dans le milieu de culture dépourvu de la source de carbone.

La consommation de l'acide DL-lactique est accompagnée d'une production de matière sèche. Elle est de 4 g.l^{-1} pour le champignon et de 3 g.l^{-1} pour la bactérie (Figure 4.12). On note que la matière sèche mesurée correspond à la production de biomasse.

L'évolution du pH reflète également la consommation d'acide DL-lactique. Des valeurs de pH supérieures à 9 sont atteintes plus rapidement dans le cas de la bactérie (après 2 jours), alors que pour le champignon le pH ne monte qu'aux environs de 8 (après 2,5 jours).

Pour cette expérience, nous n'avons pas jugé nécessaire d'analyser le comportement d'un témoin sans microorganismes étant donné que le substrat se trouve essentiellement sous forme d'acide lactique et qu'il n'y a donc pas possibilité d'hydrolyse chimique.

B) Dégradation du dimère DL-lactyl lactique

La disparition du dimère DL-lactyl lactique suit un comportement plus complexe que dans le cas de l'acide lactique. On observe que les deux microorganismes présentent deux phases de consommation (Figure 4.13). *F. moniliforme*, après une latence d'un jour, consomme 50% du dimère à une vitesse de $2,2 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Après 3 jours de culture, il y a un ralentissement important de la consommation ($0,2 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Par contre, *P. putida* présente une vitesse de consommation très faible pendant les 5 premiers jours de culture ($0,17 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$), suivie d'une vitesse plus importante ($0,86 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$) qui devrait permettre la disparition totale du substrat en une quinzaine de jours. Par ailleurs, nous avons vérifié que l'hydrolyse chimique du dimère présente une vitesse proche de zéro.

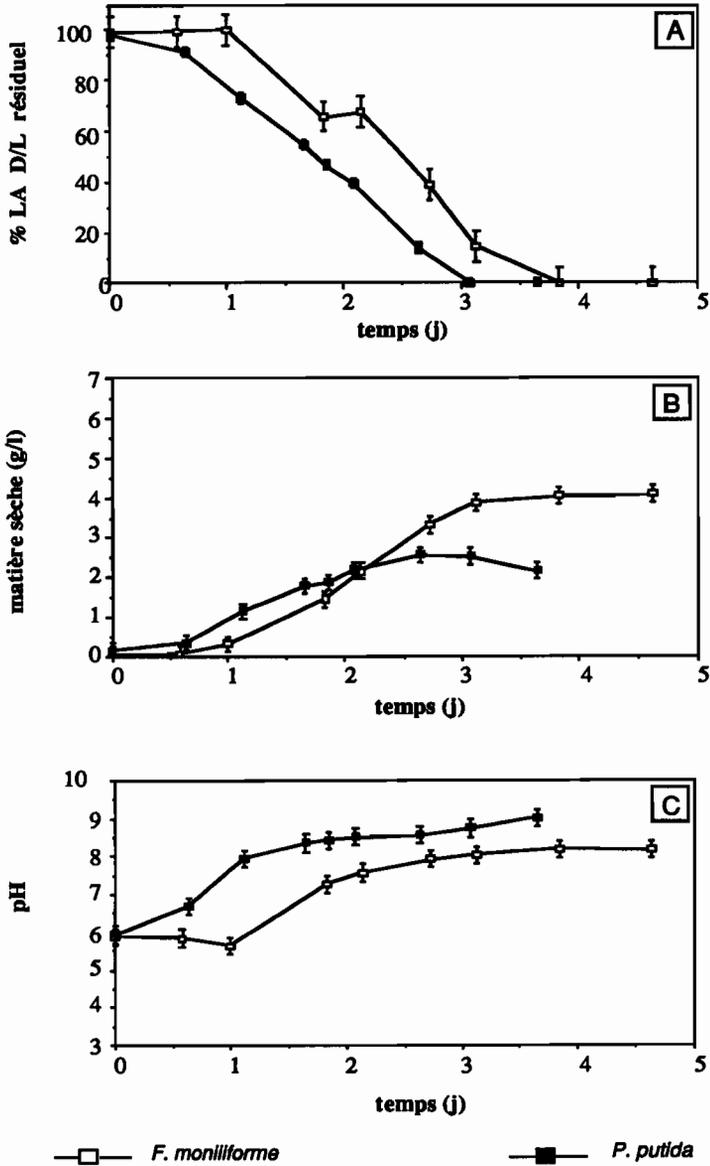


Figure 4.12 Dégradation de l'acide DL- lactique par *F. moniliforme* et *P. putida*.
 A) Consommation d'acide DL- lactique. B) Production de biomasse. C) Evolution du pH.

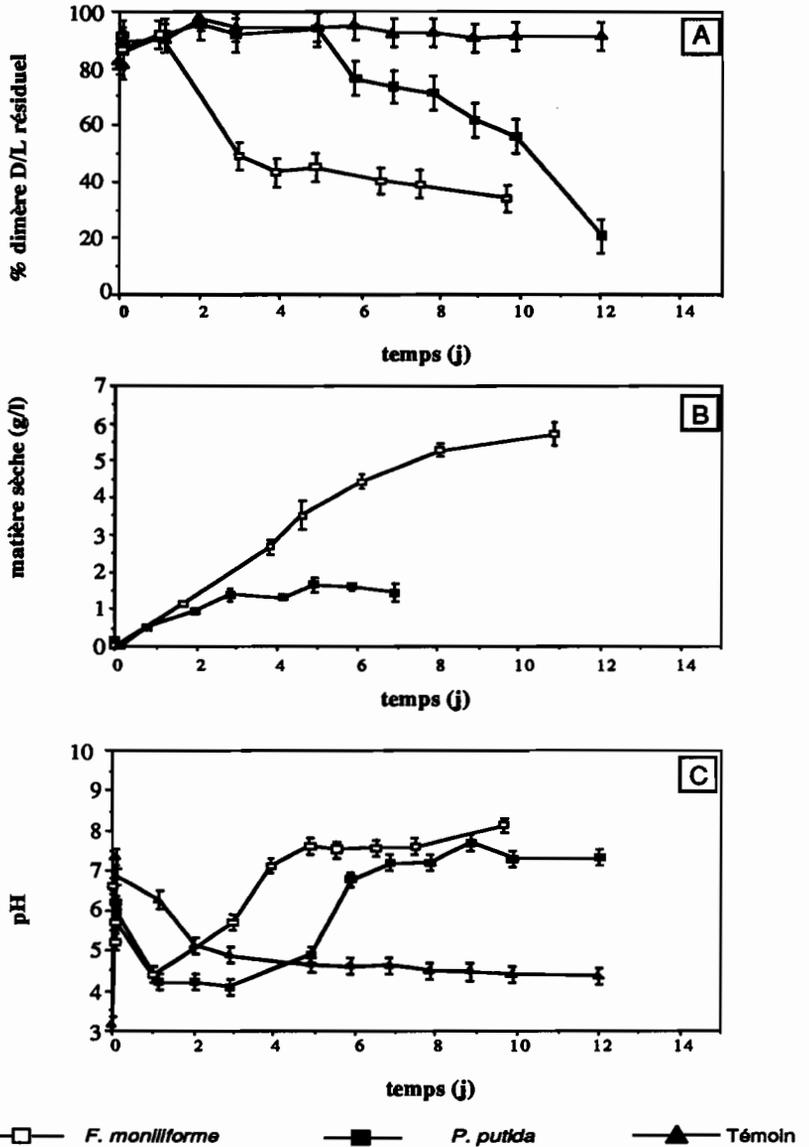


Figure 4.13 Dégradation du dimère DL-lactique par *F. moniliforme* et *P. putida* :
 A) Consommation du dimère. B) Production de biomasse. C) Evolution du pH.

Comme pour l'acide lactique, la consommation du dimère par les microorganismes s'accompagne d'une augmentation de la matière sèche qui reflète aussi la production de biomasse. Elle atteint une valeur maximale plus importante que pour la consommation d'acide lactique chez le champignon (5 g.l⁻¹ contre 4 g.l⁻¹). Par contre, la production maximale de biomasse de la bactérie est plus faible dans le milieu à base de dimère que dans celui à base d'acide lactique (1,5 g.l⁻¹ contre 3 g.l⁻¹ respectivement).

La consommation du dimère provoque de même une augmentation du pH. Or, cette augmentation n'est pas immédiate. En effet, la dégradation du dimère est plus complexe car le composé de départ, le lactide, n'est transformé que progressivement en acide lactyl lactique. C'est pourquoi le pH n'est pas stable au tout début des cinétiques et la concentration en dimère n'est pas de 100% au temps zéro.

Pour le champignon, le pH diminue à des valeurs proches de 4,5 après le premier jour de culture et monte par la suite jusqu'à atteindre des valeurs stables aux environs de 8, après 5 jours. Pour la bactérie, le pH diminue également au début puis remonte au-delà de 3 jours pour atteindre 7,5 au bout de 7 jours et s'y stabilise. Dans le cas de l'hydrolyse chimique, le pH descend plus lentement qu'en présence des microorganismes et atteint un minimum de 4,5 après 5 jours.

L'accumulation d'acide lactique dans le milieu de culture n'est pas très importante en présence des microorganismes par rapport à la dégradation hydrolytique (Figure 4.14). La culture de *F. moniliforme* présente une concentration maximale de 1,5 g.l⁻¹ après 3 jours suivie d'une disparition rapide. Dans le cas de *P. putida*, l'accumulation d'acide lactique est très faible tout au long de la cinétique (maximum 0,4 g.l⁻¹). Par contre, la dégradation hydrolytique du dimère produit une accumulation quasi constante d'acide lactique de 0,13 g.l⁻¹.j⁻¹.

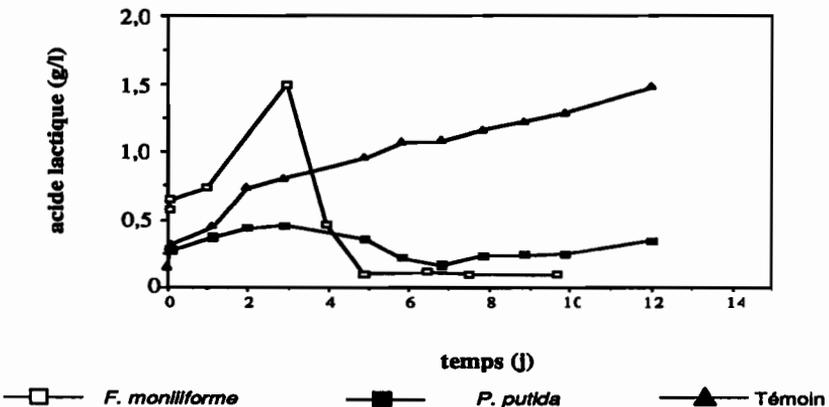


Figure 4.14 Accumulation d'acide lactique pendant la dégradation du dimère racémique.

C) Dégénération des oligomères PLA50

L'hydrolyse alcaline totale des oligomères est apparue comme une méthode efficace d'évaluation de la disparition de ce substrat (Figure 4.15). Elle nous a permis d'observer une différence très nette de la vitesse de disparition des oligomères : au bout de 23 jours, seulement 50% des oligomères sont consommés par le champignon ($0,2 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$), alors que la bactérie consomme 75% du substrat après 25 jours de culture ($0,3 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$). La culture mixte des deux microorganismes accélère considérablement la disparition des oligomères : après seulement 9 jours de culture, 80% sont consommés (vitesse globale de $0,9 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Dans le cas du témoin libre de microorganismes, il n'y a pas de disparition du substrat.

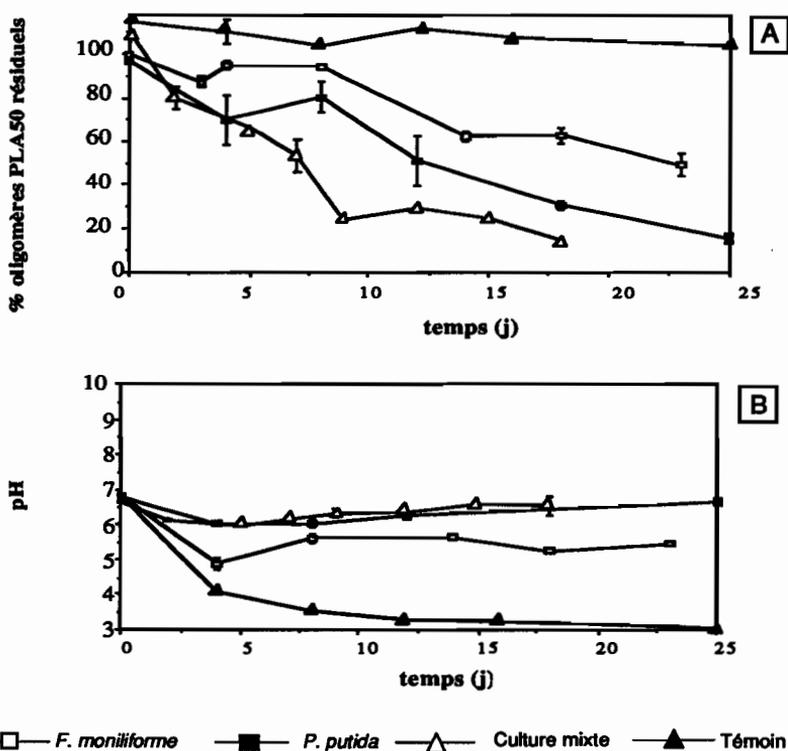


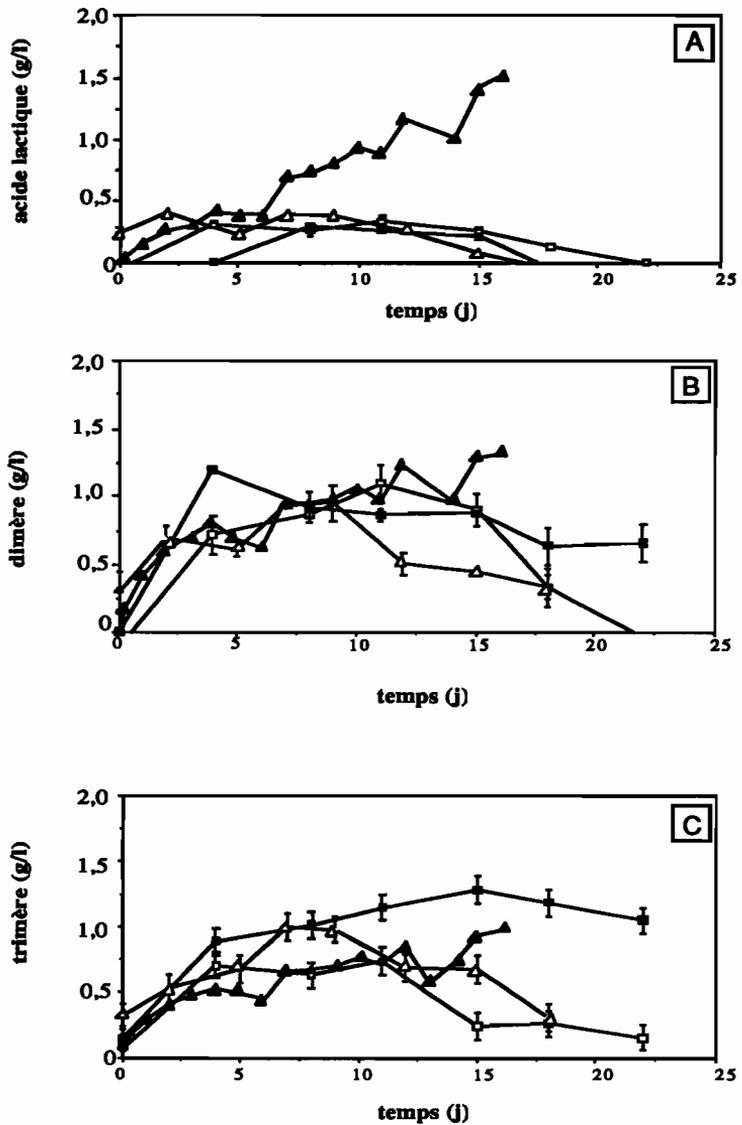
Figure 4.15 Dégénération des oligomères PLA50 par *F. moniliforme* et *P. putida*:
A) Consommation d'oligomères. B) Évolution du pH.

La vitesse relativement faible de disparition des oligomères dans le cas du champignon correspond bien à l'évolution du pH. L'acidification est plus importante (pH = 5) qu'en présence de la bactérie et de la culture mixte, mais plus faible que pour la dégradation hydrolytique où le pH atteint des valeurs proches de 3. Dans le cas de la culture mixte et de *P. putida*, le pH reste constant aux environs de 6.

Par l'analyse de la libération des résidus de la dégradation (acide lactique, dimère et trimère) dans le surnageant des cultures (Figure 4.16), on observe qu'en absence de micro-organismes se produit une accumulation linéaire d'acide lactique avec une vitesse constante de $0,08 \text{ g.l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. En présence de microorganismes, l'acide lactique libéré est consommé rapidement. La vitesse initiale d'accumulation donnée par le champignon est plus importante que celle obtenue pour la bactérie ($0,08$ contre $0,04 \text{ g.l}^{-1} \text{ j}^{-1}$ respectivement) car le champignon consomme l'acide lactique plus lentement. Dans le cas de la culture mixte, l'acide lactique est détecté dès le départ et sa consommation est très rapide, ce qui démontre une activité microbienne synergique importante.

L'accumulation du dimère lactyl lactique par la dégradation hydrolytique suit un comportement asymptotique avec une vitesse initiale de $0,3 \text{ g.l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Au-delà de 2 jours, cette vitesse devient pratiquement nulle. *F. moniliforme* provoque une libération initiale plus faible ($0,1 \text{ g.l}^{-1} \text{ j}^{-1}$) avec une accumulation maximale de 1 g.l^{-1} après 11 jours, suivie d'une disparition plus rapide que pour la bactérie. En présence de *P. putida*, il y a une libération initiale similaire à celle observée pour la dégradation chimique ($0,3 \text{ g.l}^{-1} \text{ j}^{-1}$ jusqu'au 4^e jour) suivie d'une très lente disparition ($0,02 \text{ g.l}^{-1} \text{ j}^{-1}$). Le champignon provoque un épuisement total du dimère après 21 jours, alors que la bactérie présente une concentration de $0,7 \text{ g.l}^{-1}$ dans la même période. Cette différence de comportement entre les deux microorganismes confirme les observations réalisées lors de la dégradation du dimère. Dans le cas de la culture mixte, il y a une libération initiale ($0,2 \text{ g.l}^{-1} \text{ j}^{-1}$) dès le départ et une disparition plus rapide que dans les cultures pures.

Comme pour le dimère, le trimère est libéré par dégradation hydrolytique de façon asymptotique, la vitesse initiale étant de $0,2 \text{ g.l}^{-1} \text{ j}^{-1}$ jusqu'au 4^e jour. Le champignon provoque une libération initiale similaire ($0,16 \text{ g.l}^{-1} \text{ j}^{-1}$) mais avec une disparition presque totale après 22 jours. Dans la culture pure de la bactérie, la libération initiale du trimère est la plus importante ($0,9 \text{ g.l}^{-1} \text{ j}^{-1}$) et atteint une valeur maximale de $1,2 \text{ g.l}^{-1}$ après 15 jours, avec une accumulation de 1 g.l^{-1} après 22 jours. La culture mixte, comme pour l'acide lactique et pour le dimère, présente une libération et une consommation rapides du trimère.



—□— *F. moniliforme* —■— *P. putida* —△— Culture mixte —▲— Témoin
 Figure 4.16 Libération des résidus de la dégradation des oligomères PLA50 par *F. moniliforme* et *P. putida* : A) Acide lactique. B) Dimère. C) Trimère.

L'analyse du surnageant libre de cellules et d'oligomères insolubles a permis de constater l'existence de protéines extracellulaires ayant une faible activité estérasique (Figure 4.17.A).

La faible capacité de consommation du dimère et du trimère par la bactérie est reflétée par l'activité enzymatique du surnageant de culture, les valeurs restant pratiquement nulles. Au contraire, le champignon présente une activité faible mais constante à partir du 4^e jour (Fig. 4.17.B).

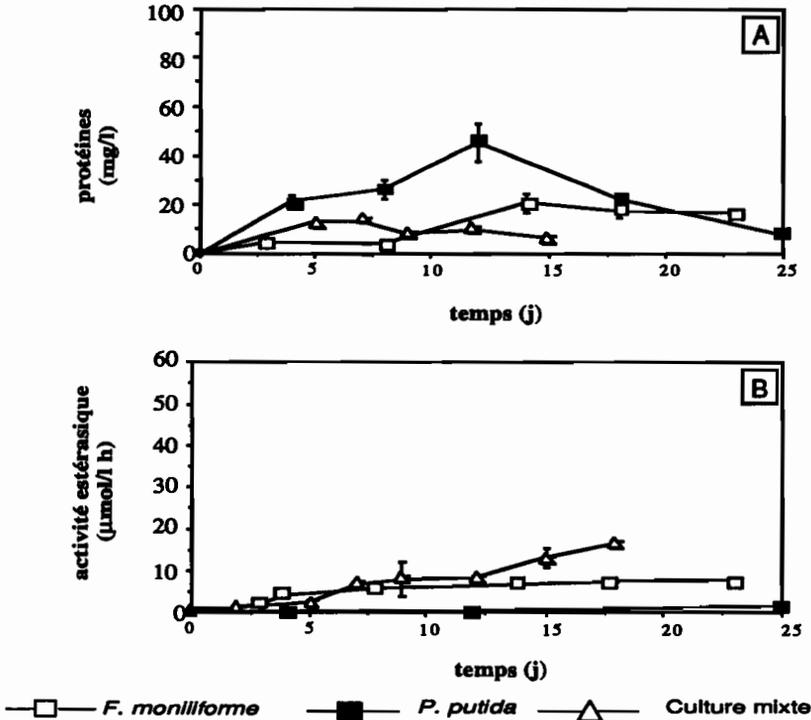


Figure 4.17 Analyse du surnageant de culture de *F. moniliforme* et *P. putida* dans un milieu à base d'oligomères PLASO : A) Protéines solubles. B) Activité estérasique.

La Figure 4.18 montre que la fraction d'oligomères solubles libérés dans le milieu de culture est plus importante pour *P. putida* (70% à 5 jours) que pour le témoin (35%) ou que le mélange de microorganismes (60%) sur la même période d'incubation. Au-delà, la disparition des oligomères solubles est plus rapide dans le cas de la culture mixte en accord avec l'assimilation préférentielle des oligomères solubles. En présence de *F. moniliforme*, la fraction d'oligomères solubles s'accroît également au cours des 5 premiers jours mais devient pratiquement constante par la suite.

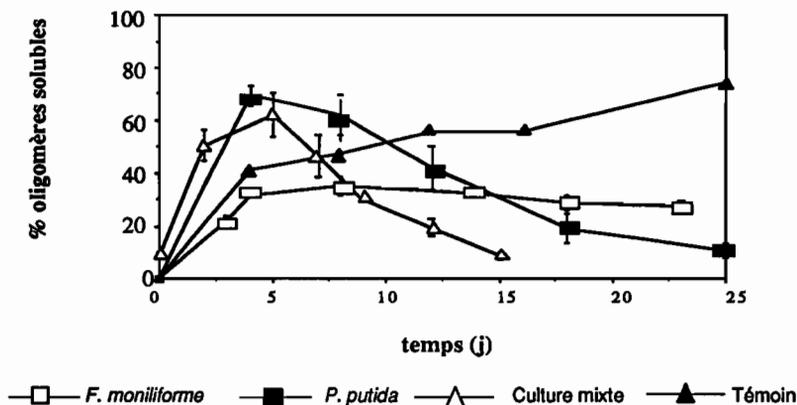


Figure 4.18 Fraction d'oligomères PLA50 solubles dans le surnageant des cultures de *F. moniliforme* et *P. putida*.

L'assimilation de PLA de faibles masses molaires dépend du degré de polymérisation et du microorganisme (Figure 4.19). La vitesse de disparition d'acide lactique est la même pour les deux microorganismes, mais le dimère et les oligomères sont dégradés de façon différente. Pour *F. moniliforme*, la vitesse initiale de consommation du dimère est analogue à celle de l'acide lactique, alors que les oligomères sont consommés plus lentement. *P. putida* a une vitesse faible de consommation du dimère et des oligomères, par rapport à la consommation de l'acide lactique.

D) Conclusion

Les résidus de la dégradation hydrolytique du PLA50 sont assimilés par les microorganismes testés. Les vitesses de consommation de l'acide lactique sont similaires pour les deux microorganismes. Le dimère et les oligomères sont dégradés différemment. Le champignon a une meilleure efficacité pour la dégradation initiale du dimère et des oligomères par rapport à la bactérie. Celle-ci a besoin d'une phase d'adaptation plus longue mais, au-delà, elle présente une meilleure capacité globale d'assimilation des oligomères. La culture mixte des deux microorganismes montre la plus grande capacité de consommation.

Les résultats présentés dans cette partie démontrent que la biodégradation des résidus du PLA50 est plus rapide que la dégradation purement chimique dans les conditions utilisées.

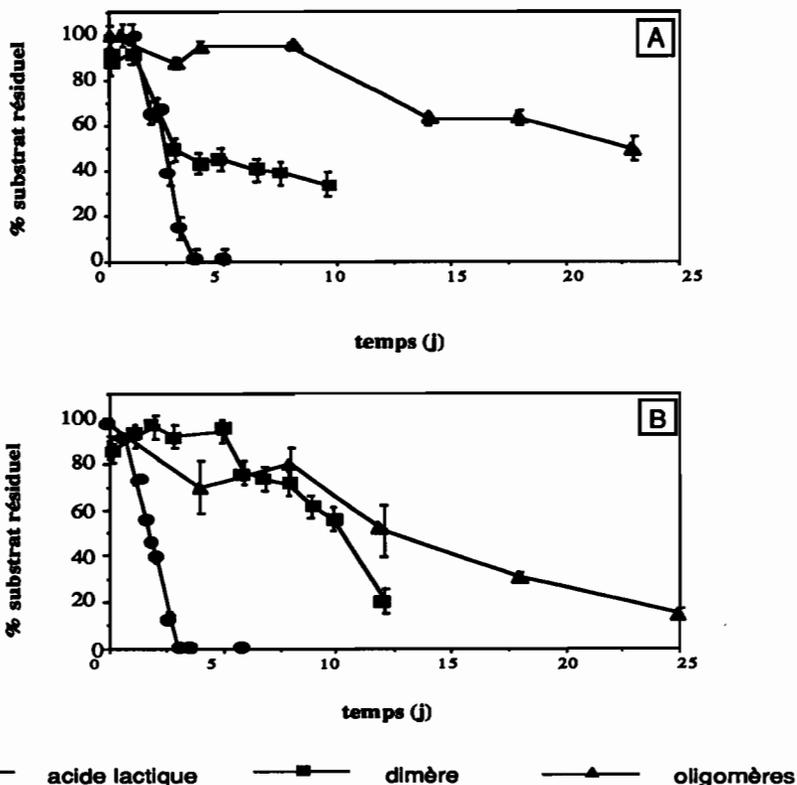


Figure 4.19 Dégradation des composés racémiques par : A) *F. moniliforme* et B) *P. putida*.

4.3.4 Dégradation des composés du type L-lactique

A) Dégradation de l'acide L-lactique

Comme pour l'acide lactique racémique, *F. moniliforme* et *P. putida* sont capables d'assimiler la totalité de l'acide L-lactique en 4 jours maximum (Figure 4.20). Le champignon a une phase de latence de 24 h, et la vitesse de consommation du substrat est légèrement différente pour les deux microorganismes : $3,7 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour le champignon et $3,2 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour la bactérie ; ces valeurs étant comparables à celles obtenues pour le composé racémique. De plus, la production de biomasse atteint les mêmes valeurs maximales que dans le cas du composé racémique : 4 g.l^{-1} pour le champignon et 3 g.l^{-1} pour la bactérie. Enfin, l'évolution du pH traduit une alcalinisation plus rapide pour la bactérie que pour le champignon.

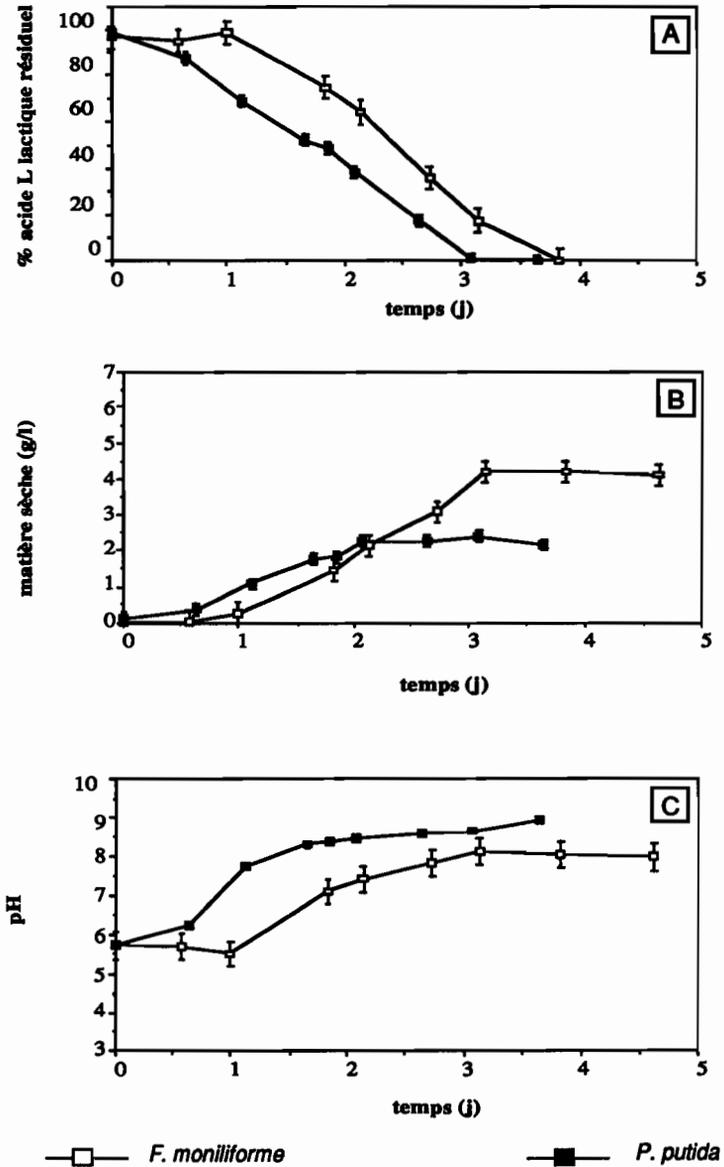


Figure 4.20 Dégradation de l'acide L lactique par *F. moniliforme* et *P. putida*:
 A) Consommation d'acide L-lactique. B) Production de biomasse. C) Evolution du pH.

B) Dégradation du dimère L-lactyl L-lactique

Le dimère L-lactyl L-lactique est complètement dégradé après 9 jours maximum par les deux microorganismes (Figure 4.21). La consommation se fait en une seule phase avec des vitesses similaires : $1,3 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour le champignon et $1,1 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour la bactérie qui présente néanmoins une phase de latence légèrement plus longue que le champignon. La dégradation hydrolytique a une vitesse proche de zéro. Il faut noter que ces courbes de consommation diffèrent considérablement de celles du dimère racémique (page 78, Figure 4.13). En particulier, le champignon ne consomme que 50% du mélange dimère racémique. Pour sa part, *P. putida* semble capable d'utiliser le diastéréoisomère D-lactyl D-lactique mais après un temps de latence de 5 jours.

La production maximale de biomasse est du même ordre que pour le dimère racémique : 5 g.l^{-1} pour le champignon et moins de 2 g.l^{-1} pour la bactérie.

Le pH présente des évolutions analogues à celles observées pour le composé racémique : il y a d'abord une acidification des milieux inoculés mais jusqu'à des valeurs moins faibles (5 contre 4,5 pour le composé racémique). Ensuite, les deux microorganismes provoquent l'augmentation de pH de façon semblable et la phase de latence bactérienne observée pour le composé racémique est ici absente. En fin de croissance, les valeurs de pH sont alcalines et plus élevées que pour le composé racémique (aux environs de 9) en accord avec une activité microbienne plus intense. L'acidification produite par le témoin est plus lente qu'en présence de microorganismes et atteint une valeur minimale de 4,5 après 4 jours qui reste stable.

L'accumulation maximale d'acide lactique issu de la dégradation microbiologique du dimère ne dépasse pas $0,5 \text{ g.l}^{-1}$, alors que la dégradation chimique produit une accumulation constante à une vitesse de $0,13 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$. La présence des microorganismes empêche l'accumulation d'acide lactique (Figure 4.22).

En résumé, la bactérie et le champignon sont capables de dégrader totalement le dimère L-lactyl L-lactique, avec une période de latence et une vitesse similaires. Les phénomènes d'induction ou d'inhibition observés pour le dimère racémique n'ont pas été constatés ici.

Par ailleurs, la dégradation chimique du dimère L-lactyl L-lactique est, de la même façon que pour le composé racémique, plus lente que la dégradation en présence de microorganismes.

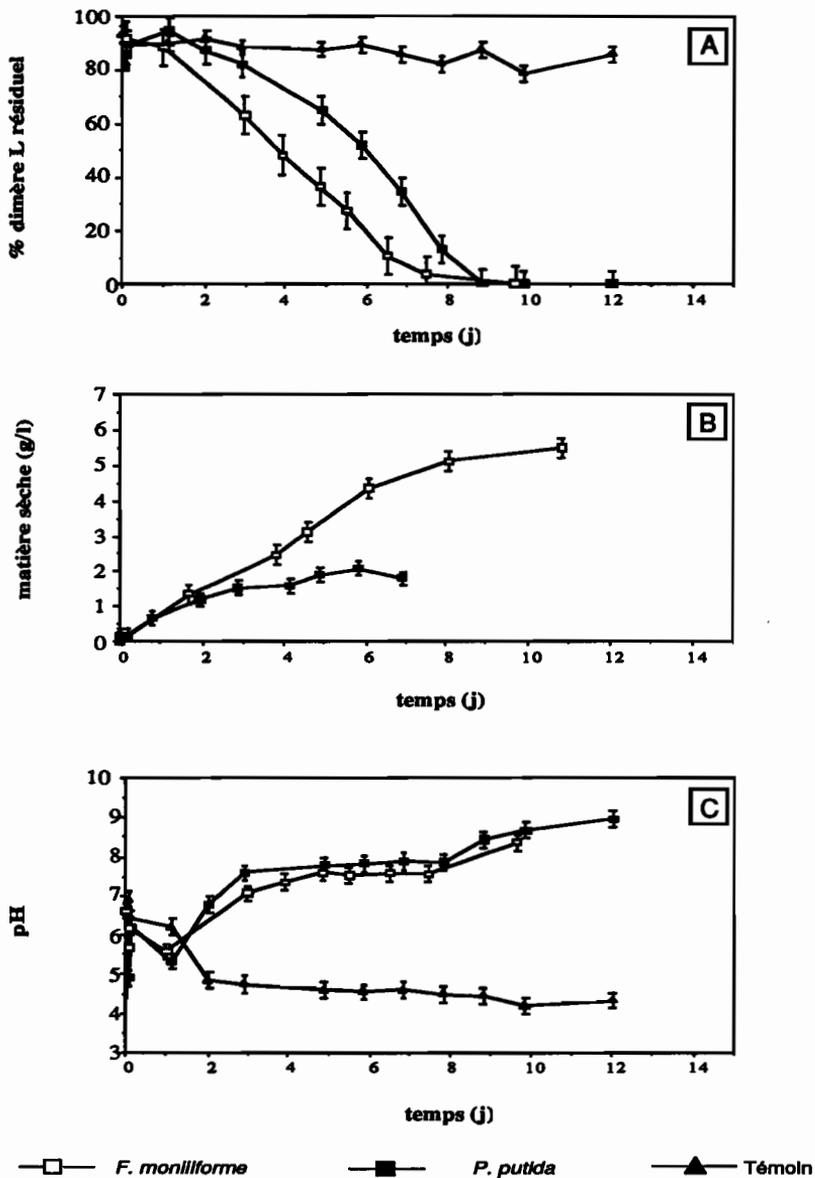


Figure 4.21 Dégradation du dimère L lactique par *F. moniliforme* et *P. putida*:
 A) Consommation du dimère. B) Production de biomasse. C) Evolution du pH.

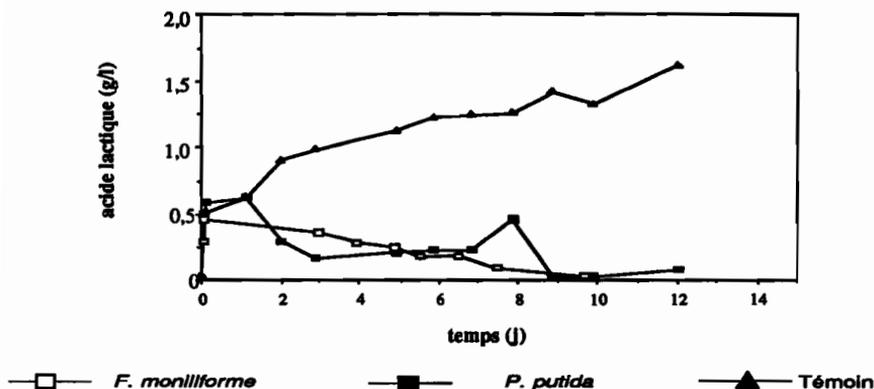


Figure 4.22 Accumulation d'acide lactique pendant la dégradation du dimère L-lactique.

C) Dégradation d'oligomères PLA100

Rappelons que nous avons étudié trois types différents d'oligomères de PLA100 (cf. 4.2.2) : a) les PLA 100 No. 1 avec une fraction de 10% d'oligomères solubles dans le milieu de culture ; b) les PLA100 No. 2 qui proviennent des oligomères No. 1 après extraction de la partie soluble par dissolution dans l'acétone suivie d'une précipitation par le milieu de culture ; c) les PLA100 No. 3 qui sont des oligomères de masse molaire moyenne plus élevée que les deux autres.

Les oligomères de PLA100 sont dégradés plus rapidement par le champignon que par la bactérie (Figure 4.23). Après 5 jours de culture, ce microorganisme a consommé 40% des oligomères No 1 et No. 2, (vitesse initiale de $1 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$), alors que la bactérie n'a dégradé que 20% des oligomères No. 1 et moins de 5% des oligomères No. 2 dans la même période ($0,4 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$).

Au-delà de 10 jours de culture à 30°C , la consommation s'arrête pour les deux microorganismes, le maximum étant de 60% dans le cas des oligomères No.1 dégradés par le champignon. La consommation d'oligomères de plus hautes masses molaires (No. 3) est encore plus limitée. On constate que la dégradation de ces oligomères ne dépasse pas 40% après 45 jours d'incubation, et que le degré de disparition est pratiquement le même pour les deux microorganismes ($0,2 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$ dans les premiers 15 jours), le champignon étant le premier à commencer la dégradation.

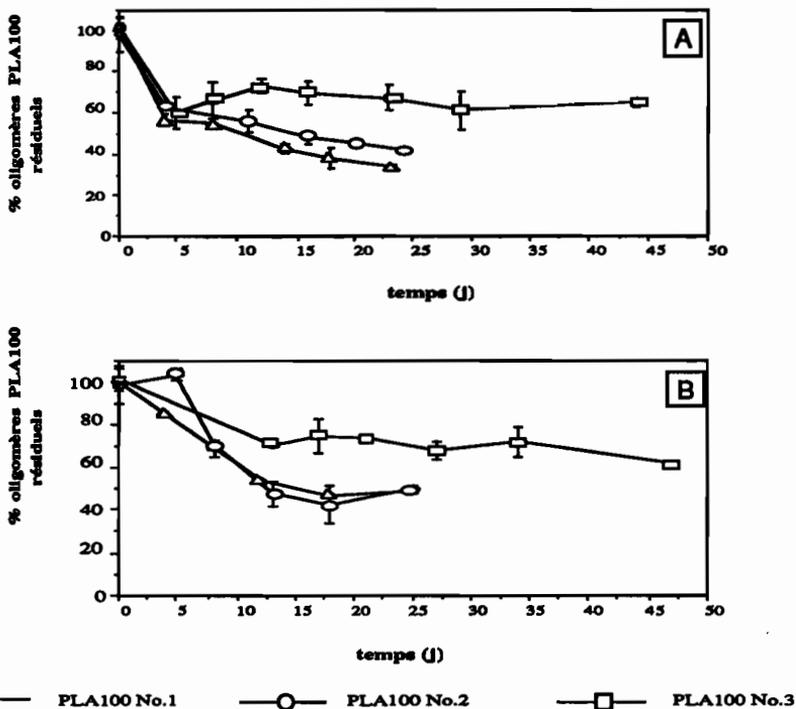


Figure 4.23 Dégradation des oligomères PLA100 par A) *F. moniliforme* et B) *P. putida*.

Le pH augmente de façon similaire pour toutes les cultures (7,5 maximum), alors qu'il diminue dans le cas de la dégradation chimique (jusqu'à 3 dans le cas des oligomères No. 1 et 5,5 après 10 jours, dans le cas des oligomères No. 3; aucun témoin n'a été réalisé pour le cas de PLA100 No.2)(Figure 4.24).

Le pH augmente quand on passe de PLA100 No.1 à No. 3. Les valeurs les plus élevées sont observées dans le cas des oligomères de plus hautes masses molaires. Il faut noter également que le pH devient alcalin même s'il y a en moyenne 60% d'oligomères encore présents dans les milieux après plus de 40 jours d'incubation. Ceci implique que ces oligomères résiduels sont insolubles.

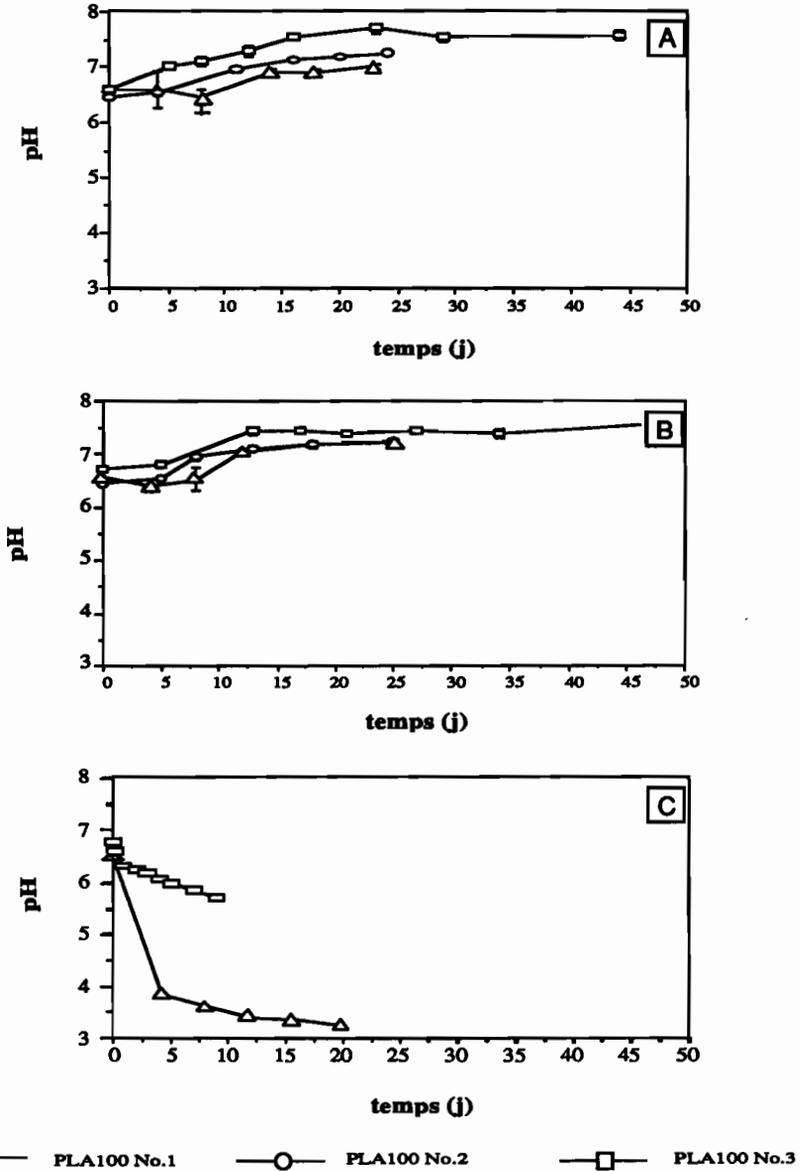


Figure 4.24 Dégradation des oligomères PLA100 ; évolution du pH. A) *F. moniliforme*. B) *P. putida*. C) Témoin.

L'activité estérasiqne la moins faible est observée pour *P. putida* dans le cas des oligomères No. 3. (maximum 25 $\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$) (Figure 4.25). *F. moniliforme* montre en général une activité enzymatique qui reste plus ou moins constante pendant la culture, alors que *P. putida* présente des périodes d'adaptation de plus en plus courtes en passant de PLA100 No. 1 à No. 3 (la période maximale est de 12 jours dans le cas des oligomères No. 1).

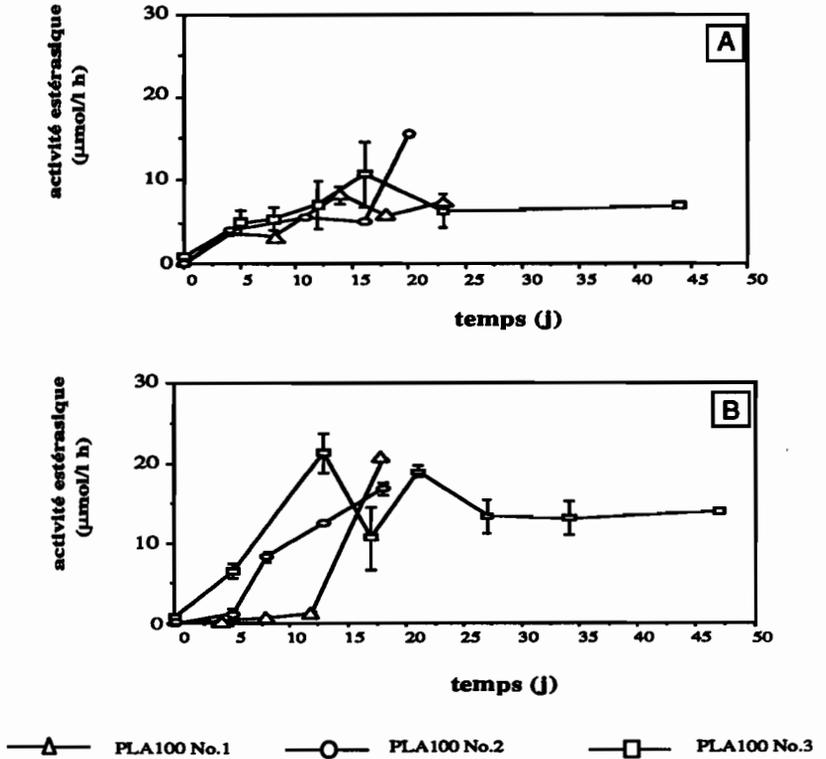


Figure 4.25 Activité estérasiqne du surnageant des milieux à base d'oligomères PLA100. A) *F. moniliforme* . B) *P. putida*.

Des concentrations importantes en protéine ont été détectées dans les surnageants des cultures de *P. putida* en présence des oligomères de PLA100 No. 1 (40 mg/l maximum) (Figure 4.26). Pour les deux microorganismes, la concentration des protéines est faible tout au long de la dégradation des oligomères No. 3. Des protéines correspondent aux estérases, au moins en partie.

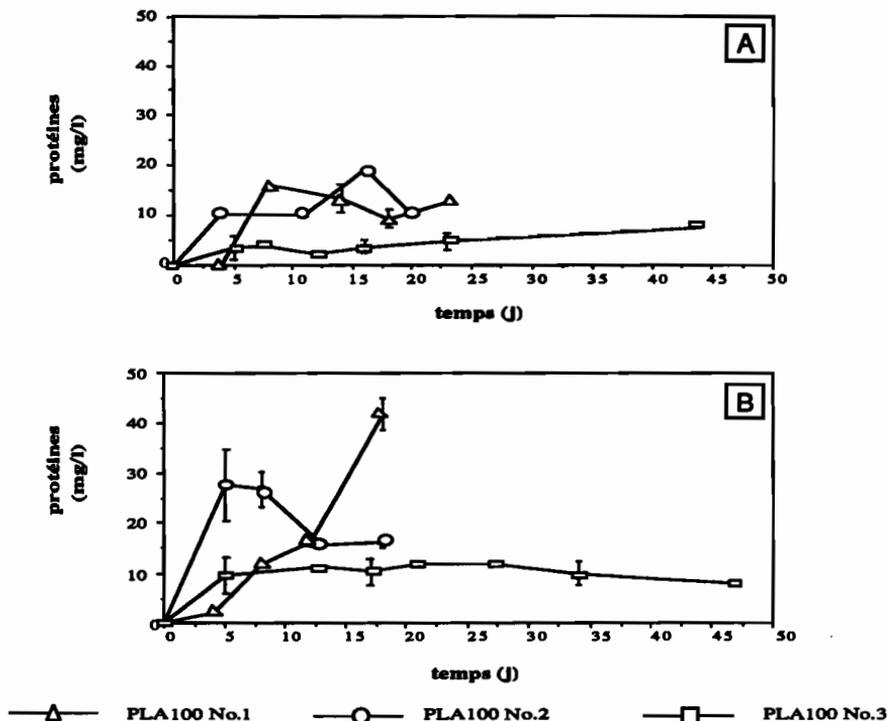
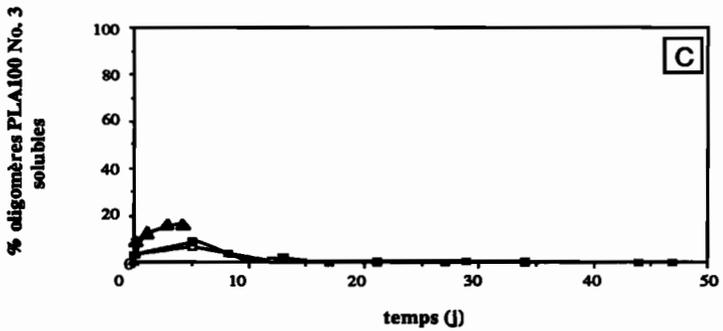
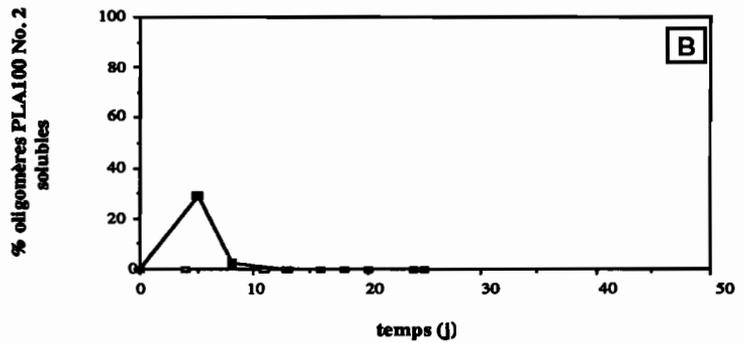
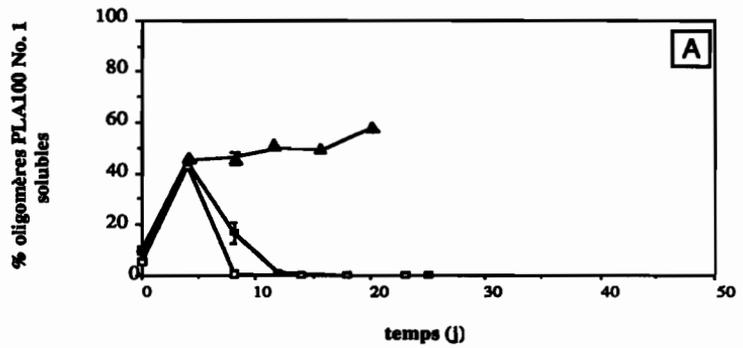


Figure 4.26 Protéines solubles dans le surnageant des milieux à base d'oligomères PLA100. A) *F. moniliforme*. B) *P. putida*.

L'analyse du contenu en oligomères solubles de PLA100 No. 1 dans le surnageant de culture montre que pour le champignon, la bactérie et le témoin, la fraction soluble est de 40% au 4^e jour d'incubation (Figure 4.27). Cette fraction diminue plus rapidement avec le champignon qu'avec la bactérie, alors qu'elle monte lentement dans le cas du témoin. Dans le cas des oligomères No. 2, on détecte une quantité d'oligomères solubles (maximum 30% en accord avec l'élimination effectuée avant l'expérience) en présence de *P. putida*, tandis que les valeurs sont nulles en présence de *F. moniliforme*. Toutefois, la quantité d'oligomères solubles ne correspond pas à la consommation globale des oligomères par la bactérie.

La solubilisation obtenue par la dégradation chimique est de 15% au bout de 5 jours dans le cas des oligomères de PLA100 No. 3. Il a été difficile de poursuivre l'analyse du témoin au-delà de cette période car il y a eu des contaminations par d'autres microorganismes. Pour les cultures microbiennes, la fraction d'oligomères solubles est plus faible que pour le témoin car il y a consommation des composés solubles. Cette fraction devient nulle au bout de 10 jours.



□ *F. moniliforme* ■ *P. putida* ▲ Témoin

Figure 4.27 Fraction d'oligomères solubles dans les surnageants des milieux de culture à base d'oligomères de PLA100. A) PLA100 No. 1. B) PLA100 No. 2. C) PLA100 No. 3.

Cultures mixtes des oligomères PLA100 No. 3

Les cultures mixtes de *F. moniliforme* et *P. putida* présentent le même pourcentage de dégradation de PLA100 No. 3 que les cultures pures : maximum 40% après 45 jours d'incubation (Figure 4.28).

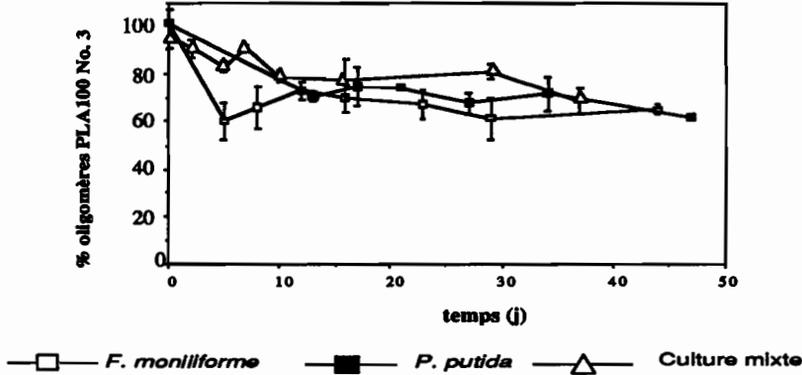
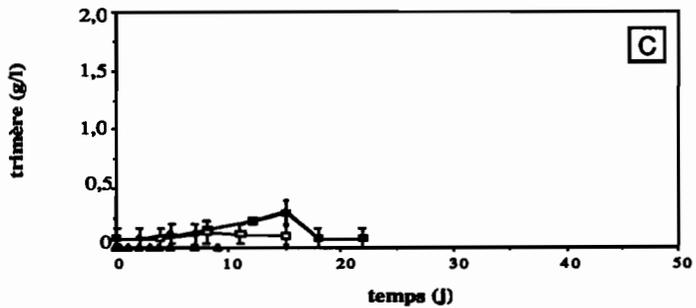
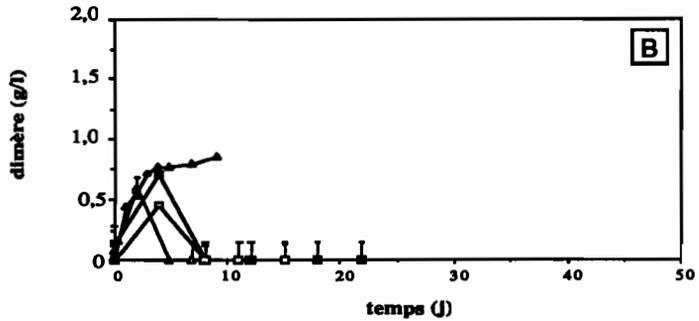
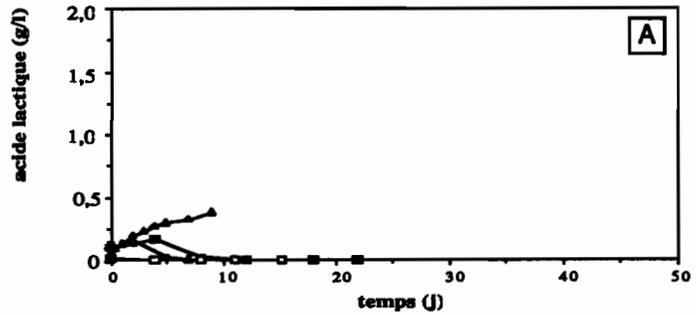


Figure 4.28 Dégradation des oligomères PLA100 No. 3 par *F. moniliforme* et *P. putida* en cultures pures et en cultures mixtes.

L'analyse des résidus de la dégradation chimique (acide lactique, dimère et trimère) dans le surnageant (Figure 4.29) montre que les concentrations de ces composés sont très faibles. Il y a moins de 5% d'acide lactique libéré après 10 jours et sa vitesse d'apparition, comme dans le cas des oligomères PLA50, est linéaire mais beaucoup plus faible ($0,03 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Dans la culture mixte, la vitesse initiale est du même ordre de grandeur que pour la dégradation chimique, alors qu'elle est plus faible dans les cultures pures (moins de $0,02 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$) et est suivie d'une consommation rapide.

L'apparition du dimère par dégradation chimique suit un comportement asymptotique avec une vitesse initiale de $0,2 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et atteint un plateau à 8% après 4 jours. La culture mixte produit une libération similaire, alors que le champignon et la bactérie présentent une vitesse initiale moins importante ($0,1 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$) en accord avec une utilisation partielle du substrat.

La concentration en trimère libéré par dégradation chimique est tellement faible qu'elle n'a pas pu être détectée par HPLC (cf. § 4.3.1). En revanche, on observe une certaine libération dans les cultures mixtes et pures des microorganismes ($0,1 \text{ g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Comme pour les oligomères PLA50, il y a une accumulation plus importante du trimère dans la culture de *P. putida*.



—□— *F. moniliforme* —■— *P. putida* —△— Culture mixte —▲— Témoin

Figure 4.29 Libération des résidus de la dégradation des oligomères PLA100 No. 3.
A) Acide lactique. B) Dimère. C) Trimère.

On observe que même s'il y a une activité estérasique maximale de $60 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans le surnageant de la culture mixte après 8 jours, cette activité ne se traduit pas par une meilleure consommation des oligomères (Figure 4.30).

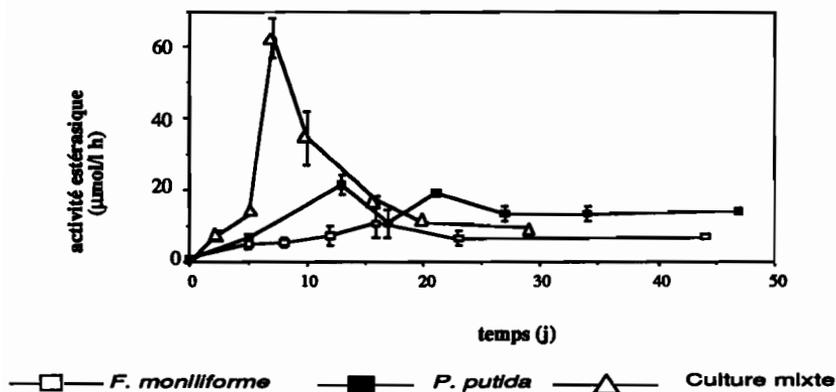


Fig. 4.30 Activité estérasique des cultures pures et mixtes sur PLA100 No. 3.

D) Conclusion

L'acide L-lactique est consommé aussi rapidement que le mélange racémique, mais nos résultats suggèrent que l'assimilation du dimère D-lactyl D-lactique n'a pas lieu ou est très défavorisée par rapport à la forme L-lactyl L-lactique. En revanche, la capacité des microorganismes à dégrader des oligomères PLA100 est plus limitée que pour les oligomères PLA50, même pour des valeurs de masses molaires similaires. Contrairement aux observations réalisées lors de la dégradation des résidus racémiques, c'est le champignon qui présente la meilleure capacité globale d'assimilation des résidus de PLA100. Aucun phénomène synergique n'a été détecté. La dégradation chimique ne semble pas être accélérée par les microorganismes.

4.3.5 Comparaison entre la dégradation du PLA50 et du PLA100

Il est maintenant bien connu que les caractéristiques stéréochimiques des polymères d'acide lactique déterminent en grande partie leur dégradation hydrolytique. Il était donc intéressant de comparer le comportement des microorganismes par rapport aux substrats racémiques et 100% L.

Afin de faciliter cette comparaison, nous présenterons un tableau récapitulatif des vitesses initiales de disparition des différents substrats : acide lactique, dimère et oligomères, et des vitesses initiales d'apparition des différents résidus résultant de la dégradation des oligomères : acide lactique, dimère et trimère. Parallèlement, nous comparerons les cultures pures et les cultures mixtes de *F. moniliforme* et *P. putida*.

A) Vitesses initiales de disparition des substrats

Cultures pures

La vitesse de dégradation de l'acide lactique ne présente pas de différence pour les microorganismes utilisés, qu'il s'agisse de la forme racémique ou de la forme L-pure (Tableau 4.3). Toutefois, des écarts importants sont détectés lorsque le dimère racémique est utilisé, la vitesse initiale de disparition étant 10 fois plus importante pour le champignon que pour la bactérie. Cette différence n'est pas observée en présence du dimère L, où les vitesses sont similaires pour les deux microorganismes. Rappelons que la bactérie comme le champignon semblent pratiquement incapables d'utiliser le dimère D-lactyl D-lactique.

Tableau 4.3. Vitesses initiales de disparition des substrats*

Microorganisme	Acide LA		Dimère		Oligomères			
	DL-	L-	DL-	L-	50	100 - 1	100 - 2	100 - 3
<i>F. moniliforme</i>	3,7	3,7	2,2	1,3	0,2	0,4	0,3	0,2
<i>P. putida</i>	3,8	3,2	0,2	1,1	0,3	0,3	0,3	0,1
<i>F. m. + P. p.</i>	--	--	--	--	0,5	--	--	0,3

* unités : $g\ l^{-1}\ j^{-1}$

Dans le cas des oligomères, le champignon a une préférence pour la forme L-pure : les PLA100 de plus faibles masses molaires (No. 1 et No. 2) sont initialement dégradés entre 1,5 et 2 fois plus rapidement que le PLA50. Ce dernier se dégrade à la même vitesse initiale que le PLA100 No. 3. Cependant, la vitesse de dégradation des oligomères PLA50 est maintenue constante au-delà de 20 jours, alors que pour les PLA100, la dégradation est quasiment arrêtée après 15 jours, faute de résidus solubles.

La bactérie a les mêmes vitesses initiales de dégradation des oligomères PLA50 et PLA100 de masses molaires similaires (No. 1 et No. 2). Néanmoins, pour les PLA100 la consommation est arrêtée après 18 jours tandis que la vitesse de dégradation du PLA50 est constante pendant 25 jours. La dégradation des oligomères PLA100 No.3 est la plus lente.

En résumé, *F. moniliforme* dégrade plus rapidement les oligomères PLA100 que *P. putida*, au moins pendant les 5 premiers jours de culture, et sa capacité globale à dégrader ces composés est plus importante. En revanche, *P. putida* dégrade plus facilement les oligomères PLA50 par rapport au champignon.

Cultures mixtes

Les cultures mixtes du champignon et de la bactérie accélèrent de façon importante la dégradation des oligomères PLA50. (Figure 4.31). Par contre, pour les oligomères PLA100 No.3, la synergie des cultures mixtes n'est pas très significative. En effet, bien que les vitesses initiales de dégradation soient plus importantes que dans les cas des cultures pures, la consommation est arrêtée après 5 jours.

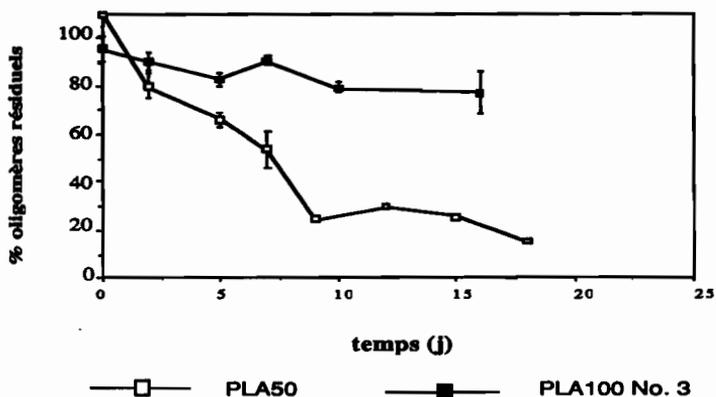


Fig. 4.31 Dégradation des oligomères de PLA50 et de PLA100 No. 3 par les cultures mixtes de *F. moniliforme* et *P. putida*.

B) Vitesses initiales de l'apparition des résidus de la dégradation des oligomères

En règle générale, les vitesses initiales d'apparition de l'acide lactique et du dimère sont plus importantes pendant l'hydrolyse chimique qu'en présence de microorganismes (Tableau 4.4). Seulement *F. moniliforme* permet une libération initiale plus rapide d'acide lactique à partir

de la dégradation des oligomères PLA50, ce qui confirme sa performance pour l'assimilation initiale de ce substrat. Dans le cas du trimère, la libération en présence de microorganismes est plus importante que par l'hydrolyse chimique, surtout lorsque *P. putida* est présente dans le milieu.

Tableau 4.4 Vitesses initiales d'apparition des résidus par la dégradation des oligomères*

Dégradation	Acide LA		Dimère		Trimère	
	50	100 - 3	50	100 - 3	50	100 - 3
<i>F. moniliforme</i>	0,10	0	0,10	0,11	0,20	0,01
<i>P. putida</i>	0,04	0,02	0,30	0,14	0,09	0,01
<i>F. m. + P. p.</i>	0	0,03	0,20	0,30	0,07	0,01
Chimique	0,08	0,03	0,30	0,20	0,20	0

* unités : g l⁻¹. j⁻¹

Les vitesses d'apparition des résidus sont supérieures dans le cas des oligomères PLA50, par rapport aux oligomères PLA100 qui se dégradent plus lentement quelque soit le milieu.

En présence des microorganismes, il y a d'abord une apparition des résidus suivie d'une consommation. Une accumulation du trimère plus importante que celle produite par hydrolyse chimique a été constatée uniquement dans le cas de *P. putida*. Par ailleurs, il a été observé que pendant la dégradation hydrolytique des oligomères PLA50 et PLA100-3, la libération d'acide lactique se fait de façon linéaire, alors qu'il y a un comportement asymptotique dans les cas du dimère et du trimère.

C) Conclusion

F. moniliforme et *P. putida* ne présentent pas de préférence par rapport aux énantiomères de l'acide lactique. La configuration a une influence dans la dégradation à partir des dimères d'acide lactique, la forme L étant plus facilement assimilable.

Dans tous les cas (cultures pures et cultures mixtes), la dégradation des oligomères PLA100 est arrêtée, alors que les oligomères PLA50 peuvent être totalement assimilés pendant la période de temps étudiée (sauf dans le cas de la culture pure du champignon).

La présence de microorganismes limite l'accumulation des petits résidus de la dégradation des oligomères de PLA dans le milieu de culture grâce à leur utilisation comme source de carbone et d'énergie. Dans le cas où la libération de ces composés est plus importante que leur assimilation, une accumulation a lieu dans le surnageant.

4.3.6 Croissance de *Pseudomonas putida* sur les oligomères de PLA

Etant donné que les milieux de culture à base d'oligomères de PLA ne sont pas homogènes, et que la matière sèche ne peut pas être liée seulement à l'évolution de la biomasse, nous avons fait appel à une technique spéciale d'évaluation de la croissance de bactéries par dénombrement. Cette technique nous a permis d'étudier plus en détail l'évolution de la microflore de *P. putida* sur des oligomères de PLA50 et de PLA100.

Classiquement, le dénombrement des bactéries, dans un milieu donné, est réalisé par la méthode du nombre le plus probable (NPP ou MPN) avec 3 ou 5 tubes par dilution. Cette technique, malgré son ancienneté, n'a pas évolué et reste très utilisée car elle est simple et donne des résultats fiables. Cependant, lors d'un suivi de population bactérienne sur des temps relativement courts, le MPN peut être lourd à utiliser. D'autre part, l'intervalle de confiance qu'il offre reste néanmoins relativement important par l'utilisation d'un nombre faible de tubes par dilution. C'est pourquoi une technique originale de numération sur microplaque utilisée pour dénombrer des Entérocoques fécaux dans l'eau de mer et dans les eaux de piscine a été adaptée à d'autres bactéries (HERNANDEZ et coll., 1993).

Dans un milieu contenant un substrat carboné, les *Pseudomonas*, par leur métabolisme, provoquent une acidification. L'idée de base du dénombrement est la détection colorimétrique de cette acidification.

Le milieu de référence est le milieu de préculture utilisé habituellement pour la croissance de *Pseudomonas* (cf. § 4.2.5). La source de carbone est donc directement contenue dans ce milieu. L'indicateur coloré est le bromocrésol pourpre (ajouté à une quantité de 0,17 g/l) qui passe d'une couleur pourpre (pH > 6,8) à jaune (pH < 5,2).

Ce milieu est alors réparti dans des tubes à fond conique (9 ml de milieu/tube) avant d'être stérilisé. Les plaques de microtitration utilisées (Poly Labo) sont stériles. Elles contiennent 96 cupules à fond plat d'une contenance de 300 µl chacune. La répartition dans les puits se fait à l'aide d'une pipette Eppendorf (Poly Labo). L'exploitation des résultats est réalisée grâce à un programme informatique en GW Basic donnant le MPN et ses limites inférieure et supérieure.

On part de la solution mère (milieu de préculture inoculé avec une suspension de *Pseudomonas*) dont on veut déterminer le MPN. Il faut alors réaliser une cascade de dilutions de 10 en 10 (dans notre cas, de la dilution 10^{-1} à 10^{-10}) dans des tubes stériles contenant 9 ml de milieu de préculture + bromocrésol pourpre (0,17 g.l⁻¹). Puis, à l'aide de la pipette, on

répartit 200 µl de chaque tube de dilution dans les puits de la microplaque en utilisant 8 puits par dilution (Figure 4.32).

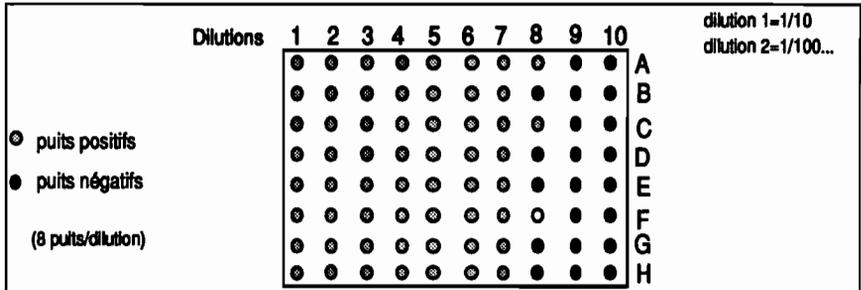


Figure 4.32 Schéma typique d'une plaque de microtitration.

Les plaques de microtitration sont incubées 48h à 30°C. Les puits jaunes sont alors comptés comme étant positifs (il y a eu croissance de *Pseudomonas* et le pH a varié). Les puits pourpres sont comptés négatifs (pas de croissance, donc pas de bactérie viable et pas de variation de pH). Le premier chiffre du nombre caractéristique est donné par la première dilution où tous les puits sont positifs. Le second par le nombre de puits positifs de la dilution immédiatement supérieure. Le troisième par le nombre de puits positifs de la dilution suivante. On y ajoute les éventuels puits jaunes de toutes les dilutions qui suivent (exemple : la Figure 4.32 donne un nombre caractéristique de 830).

Le MPN est donné par le programme informatique qui tient compte des modalités d'ensemencement et du nombre de puits positifs. Dans notre cas, le volume de la solution mère utilisée lors de la première dilution était de $(0,2/10)=0,02$ ml.

Les résultats ainsi obtenus (Figure 4.33) montrent que la population de *P. putida* ne se maintient pas au delà de 5 jours dans le milieu de culture à base d'oligomères PLA100 No. 3, alors qu'elle présente une bonne viabilité jusqu'à plus de 15 jours dans le milieu à base d'oligomères PLA50. Ce fait confirme l'incapacité de cette bactérie à dégrader les oligomères PLA100 insolubles.

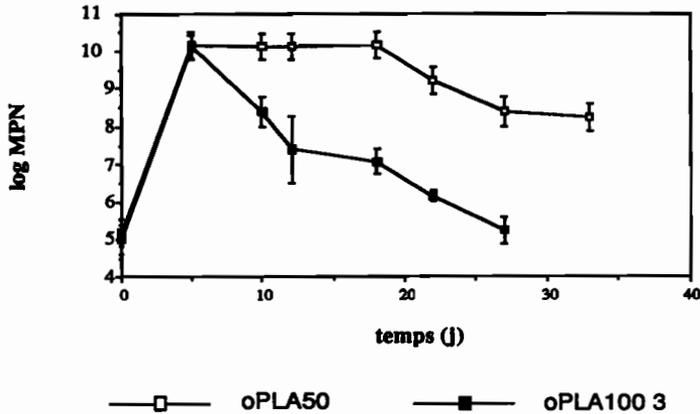


Figure 4.33 Croissance de *P. putida* dans un milieu de culture à base des oligomères PLA50 et un milieu à base de PLA100 No. 3.

4.4 Discussion

4.4.1 Cas général des polymères biodégradables

Dans les milieux vivants, le procédé de transformation d'un polymère insoluble, d'abord en fragments solubles, ensuite en monomères facilement assimilables, est couramment observé. Des mécanismes de dégradation très semblables entre eux ont été proposés pour la biodégradation de différents polymères (cellulose, PHB et analogues, PCL...), généralement sur la base de schémas simplifiés.

Un exemple est celui de la dégradation de la chitine, poly(N-acetyl glucosamine) (P-NAGA) (YOUNG, 1985). Lorsque ce polymère est utilisé comme seule source de carbone par une bactérie (*Serratia marcescens*), l'hydrolyse totale se réalise en deux étapes. Le polymère insoluble est premièrement transformé en dimère qui est ensuite transformé en monomère, la NAGA. L'hydrolyse du substrat insoluble est l'étape limitante du procédé. Le monomère est assimilé par le microorganisme. La biosynthèse des enzymes est inhibée par le monomère.

D'autres exemples sont ceux de la dégradation de l'amidon, la cellulose, etc... cités dans l'Etude Bibliographique (cf. §2.4.3).

4.4.2 Dégradation des composés racémiques

Lors de la dégradation des composés racémiques, plusieurs phénomènes ont été observés :

- a) L'acide DL-lactique est assimilé à la même vitesse par le champignon et par la bactérie.
- b) Pour le dimère, des différences de comportement sont observées. Le champignon est capable de commencer rapidement la dégradation alors que la bactérie a d'abord besoin d'une période d'adaptation relativement longue pour ensuite biodégrader au moins partiellement le dimère.
- c) Dans le cas de la dégradation des oligomères, il se produit une accumulation de petits résidus (dimère, trimère) et d'une fraction importante d'oligomères solubles dans le milieu en présence de la bactérie. Néanmoins, les composés hydrosolubles sont finalement assimilés. En présence du champignon, il y a aussi accumulation mais dans une moindre mesure que pour la bactérie et sans consommation totale.
- d) La bactérie semble capable de solubiliser les oligomères, contrairement au champignon. En effet, nous avons remarqué que les cultures de *P. putida* présentaient une meilleure homogénéité, alors que dans les cultures de *F. moniliforme*, les oligomères constituaient un amas couvert de mycélium au fond des fioles Erlenmeyer.

Etant donné la difficulté de *P. putida* pour consommer les petits résidus, il est possible que cette bactérie ne possède que des endo-estérases. Ceci expliquerait l'augmentation de la concentration en oligomères solubles dans le milieu.

En effet, les endo-estérases couperaient les liaisons ester à l'intérieur des chaînes en libérant des oligomères solubles, notamment des dimères et des trimères. L'attaque estérasiatique répétitive diminuerait plus rapidement la masse molaire en augmentant ainsi la solubilité des oligomères (en accord avec la Fig. 4.18, page 84). Il est en plus possible que *P. putida* soit capable de produire un composé lui permettant d'homogénéiser le milieu, selon la solubilisation rapide observée. Il est connu que certaines bactéries sont capables de synthétiser des composés émulsifiants (tels la glycine bétaïne) pour assimiler des substrats huileux en milieux aqueux (cas du pétrole dans la mer)(AL-MALLAH et coll. 1990).

L'activité estérasiatique très faible détectée dans les cultures de *P. putida* (Fig. 4.25, page 92) peut s'expliquer par le fait que la méthode de la fluorescéine serait plutôt adaptée à la détermination de l'activité des exo-estérases pour l'hydrolyse d'esters non macromoléculaires. L'ensemble est schématisé sur la Figure 4.34.

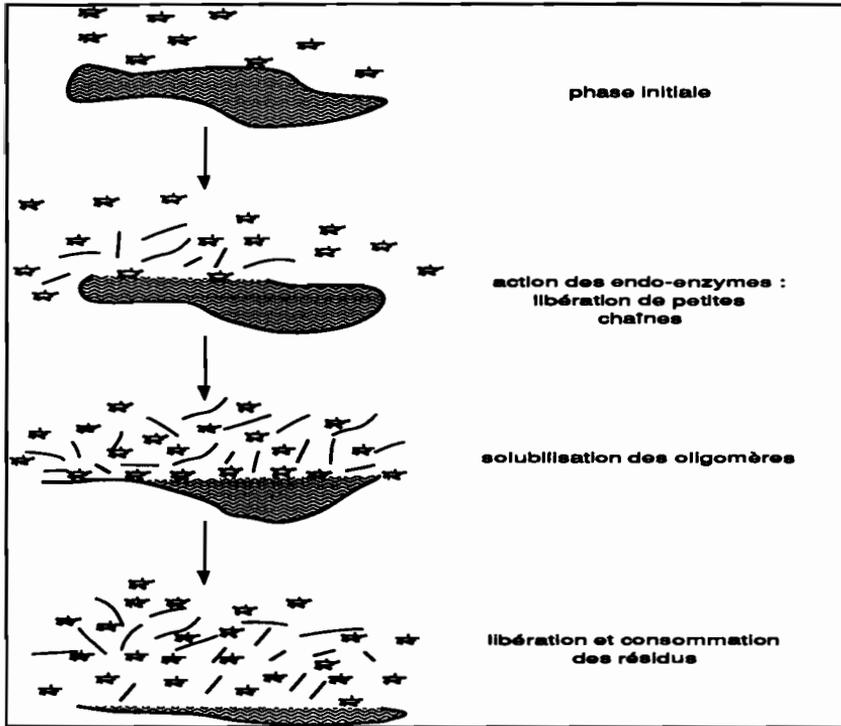


Fig. 4.34 Mécanisme proposé de la dégradation des oligomères PLA50 par *P. putida*.

En revanche, *F. moniliforme* produirait des exo-estérases. La répétition de l'attaque exoenzymatique provoquerait une production d'acide lactique sans modifier la masse molaire au cœur de l'échantillon de façon significative, ce qui est en accord avec le fait que les oligomères restent insolubles et leur dégradation est limitée.

De plus, il est possible que le champignon, en envahissant la surface des oligomères, empêche leur dégradation chimique (Figure 4.35). De ce fait, le champignon semble défavoriser la solubilisation des oligomères diffusant de la matrice probablement par limitation des échanges entre la phase solide et la phase liquide (Fig. 4.36).

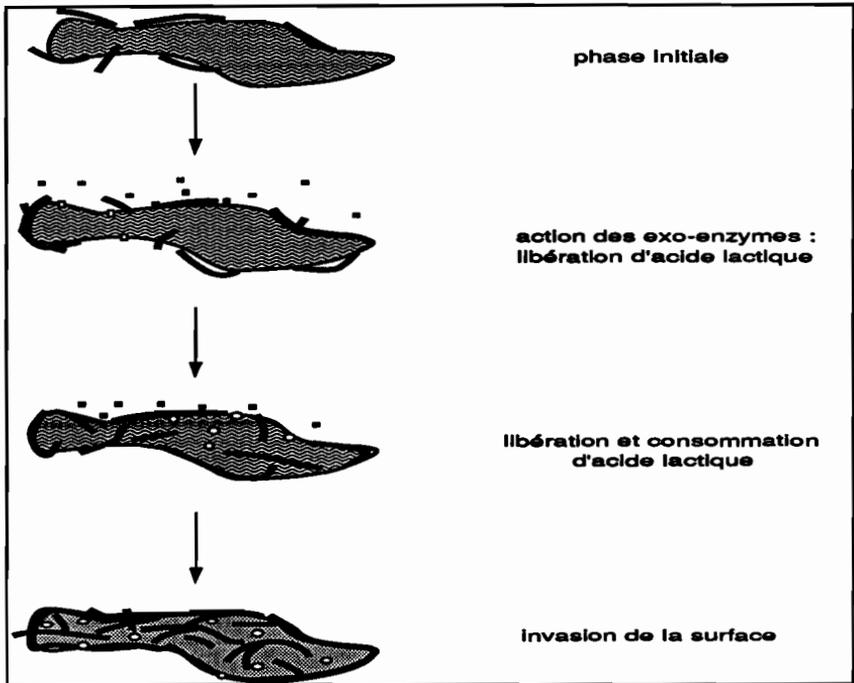


Fig. 4.35 Mécanisme proposé de la dégradation des oligomères PLA50 par *F. moniliforme*.

Ces différents commentaires nous ont amené à supposer que le mécanisme de biodégradation des oligomères se ferait d'une manière analogue à celle des polymères naturels, c'est-à-dire, par deux types d'enzymes :

- des exo-enzymes qui hydrolysent strictement l'extrémité des chaînes, le sous-produit est alors l'acide lactique (unité ultime).
- des endo-enzymes qui attaquent un site quelconque des chaînes et les produits qui en résultent constituent un mélange d'oligomères de faibles masses molaires qui ne peuvent migrer dans le milieu aqueux que lorsqu'ils deviennent solubles.

L'action concomitante de ces enzymes produit un effet synergique qui permet une dégradation plus rapide des oligomères. Cette synergie se traduit par une activité estérasiqque plus importante dans le surageant des cultures.

Le temps nécessaire à l'activation du mécanisme complexe de dégradation expliquerait la phase d'adaptation d'autant plus longue que le degré de polymérisation est plus élevé.

Enfin, nous pouvons affirmer que la dégradation microbienne des oligomères racémiques est plus rapide que la dégradation chimique. Cette remarque est issue des observations suivantes :

- a) Le dimère est hydrolysé très lentement en absence de microorganismes.
- b) La libération des résidus de la dégradation (acide lactique, dimère, trimère, oligomères solubles) est plus faible par simple hydrolyse chimique que par l'action des microorganismes.

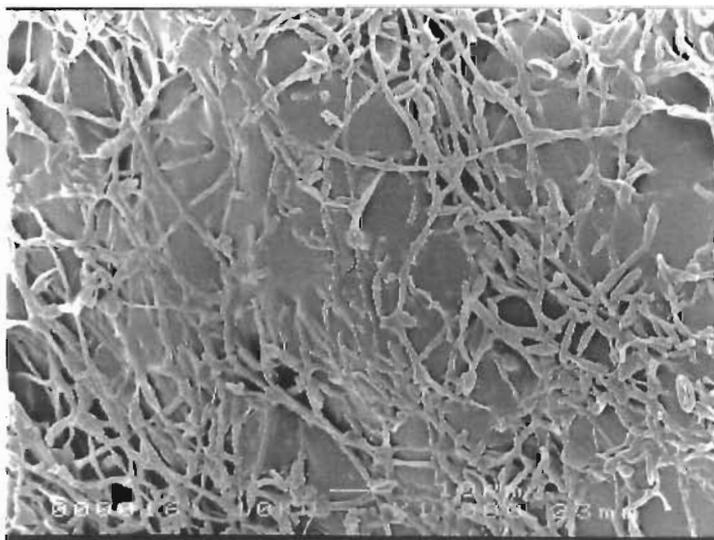


Fig. 4.36 Développement du mycélium de *F. moniliforme* sur les oligomères PLA50 après 27 jours de culture en milieu liquide agité à 30°C.

4.4.3 Dégradation des composés à 100% d'unités L lactique.

Dans le cas de la dégradation des composés contenant 100% d'unités d'acide L-lactique, les observations suivantes ont été réalisées :

- a) Les vitesses de dégradation de l'acide lactique et du dimère sont similaires pour le champignon et pour la bactérie, mais celle-ci a une période d'adaptation plus longue pour la dégradation du dimère que le champignon.

- b) La dégradation des oligomères est limitée d'autant plus que la masse molaire est élevée. Globalement, le champignon présente un degré plus important de dégradation que la bactérie.
- c) Le pH et l'activité estérasiqque du surmageant augmentent lorsque les oligomères sont moins biodisponibles (masse molaire croissante, élimination des oligomères solubles).
- d) La libération des résidus de la dégradation (acide lactique, dimère, trimère, oligomères solubles) en présence des microorganismes est du même ordre que la dégradation chimique.

Bien que le dimère ait été consommé facilement par la bactérie et par le champignon, les oligomères de PLA100 n'ont pas été attaqués par ces microorganismes. Il semble évident que leur caractère cristallin limite l'action des enzymes du fait de l'ordonnement des chaînes isotactiques. Ainsi, les microorganismes ne seraient capables d'attaquer que la fraction des oligomères qui ont été solubilisés par voie chimique et cette solubilisation serait défavorisée en termes de longueur de chaînes par rapport aux dérivés racémiques. La dégradation microbienne est donc plus rapide que la dégradation chimique seulement dans le cas du dimère L-lactyl L-lactique.

Par ailleurs, il a été constaté que lorsque la biodisponibilité des oligomères PLA100 est diminuée, l'alcalinisation du milieu de culture est plus importante. Ce phénomène peut être lié à la dégradation de l'urée. En effet, l'hydrolyse de l'urée alcalinise le milieu et, du fait d'une limitation de la source de carbone, la vitesse d'hydrolyse est plus rapide que la consommation de l'ammoniaque libéré.

Dans le cas des cultures de *P. putida*, il est intéressant de noter une activité estérasiqque croissante lorsque la quantité d'oligomères solubles décroît. Il est à nouveau possible que l'absence des chaînes facilement assimilables induise la synthèse d'enzymes qui s'avèrent incapables d'attaquer les oligomères insolubles. Les enzymes produites seraient plutôt des exo-estérases ou du moins des enzymes pouvant agir seulement sur des chaînes solubles. Tout se passe à ce niveau comme si *P. putida* se mobilisait pour attaquer les chaînes de PLA100 mais n'y arrivait pas, les enzymes détectées apparaissant en fait inactives (Fig. 4.30, page 97).

Enfin, étant donnée l'incapacité des enzymes des microorganismes testés à dégrader les oligomères de PLA100, un effet synergique ne se produit pas en culture mixte, même si une forte activité estérasiqque est détectée dans le surmageant.

4.4.4 Comparaison entre la dégradation du PLA50 et celle du PLA100

La composition énantiomérique n'a pas d'influence sur la vitesse de consommation de l'acide lactique par les deux microorganismes. Par contre, une influence est observée à partir de deux molécules estérifiées d'acide lactique. Dans ce cas, une préférence par la forme L est détectée, surtout en présence du champignon. La dégradation du dimère racémique est complexe. Il semblerait que les microorganismes aient des enzymes ayant une spécificité plus importante envers les formes polymères solubles L qu'envers les formes racémiques.

Cependant, lorsque le degré de polymérisation est plus important (cas des oligomères insolubles), ce sont les composés racémiques qui sont dégradés plus facilement. La dégradation des oligomères de PLA100 par les microorganismes serait limitée simplement aux petites chaînes solubles.

4.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré la complexité de la dégradation des oligomères PLA et notamment les particularités liées aux deux microorganismes comparées à l'hydrolyse chimique, celles liées aux polymères (masses molaires, polymolécularité, structure configurationnelle).

Il nous est alors apparu nécessaire d'examiner le cas des polymères de hautes masses.

DEGRADATION DES POLYMERES

5.- Dégradation des polymères

5.1 Introduction

Il a été observé précédemment que les microorganismes sélectionnés étaient capables d'assimiler les oligomères de PLA50. Il aurait donc nécessaire de vérifier par la suite si ces microorganismes étaient également capables d'accélérer la dégradation des polymères de hautes masses.

Pour cette étude, nous avons utilisé un polymère de PLA50 de hautes masses molaires sous forme de plaques massives. Le premier objectif était de comparer les résultats obtenus par LI et coll.(1990) pour la dégradation hydrolytique des plaques massives avec les résultats d'une éventuelle biodégradation.

Deuxièmement, nous avons souhaité comparer la dégradation du PLA50 avec celle d'autres polyesters (PHB/HV, PCL, Bionolle[®]) afin de valider notre étude sur la base des comportements des polymères réputés biodégradables.

5.2 Matériels et Méthodes

5.2.1 Conditions de dégradation

Les conditions de dégradation du PLA50 sont les mêmes que celles utilisées précédemment pour les oligomères (30°C et agitation à 150 tpm) mais en absence de glucose (*cf.* §4.2.1).

Afin d'accélérer la dégradation hydrolytique, les plaques de PLA50 et des autres polyesters ont été maintenues dans les milieux de culture à 40°C pendant 1 mois avant inoculation par des microorganismes. Des témoins sans inoculation ont été étudiés à chaque fois.

5.2.2 Matériaux étudiés

A) PLA50

Synthèse du polymère

Le polymère d'acide lactique racémique de hautes masses a été synthétisé par ouverture du cycle lactide en utilisant du Zinc comme amorceur. La réaction a été réalisée sous vide à 140°C pendant 10 jours. Le polymère a été récupéré par dissolution dans l'acétone suivie d'une précipitation avec du méthanol. Le produit obtenu a été séché sous vide.

Le PLA50 s'est révélé amorphe selon une analyse par Rx (Fig. 5.1) avec une masse molaire moyenne \bar{M}_p de 40.000, une polymolécularité de 1,6 déterminées par SEC (cf. §4.2.2) et une T_v de 57°C, déterminée par analyse thermique (DTA).

Les thermogrammes DTA ont été tracés sur un analyseur thermique Dupont série 99, équipé d'une cellule de mesure DSC 910 (Fig. 5.2).

Obtention des plaques massives

Le moulage de PLA50 a été réalisé à l'aide d'une presse à plateaux chauffants. Le plateau inférieur et le moule ont été chauffés à 110° C. Le polymère a été pesé (11,5 g pour une épaisseur de 2 mm) et ajouté dans le moule puis mis sous pression (200 bars) pendant 5 minutes. Un refroidissement rapide a été effectué par circulation d'eau pendant 10 minutes environ avant démoulage.

Le découpage a été réalisé à l'aide d'une scie mécanique de manière à obtenir des plaques transparentes carrées de 1 cm de côté. Une rectification au scalpel a été nécessaire pour affiner les bords.

B) Autres polyesters

Trois autres polymères ont été étudiés : un copolymère PHB/HV avec 20,1% de PHV (Marlborough Biopolymers, Angleterre), un polymère PCL (Aldrich-Chemie, Allemagne) et un poly (succinate d'éthylène glycol), le Bionolle[®] 3000 (Showa highpolymer Co. Ltd., Japon). Des plaques massives de chacun de ces polymères ont été obtenues de la même façon que les plaques de PLA50.

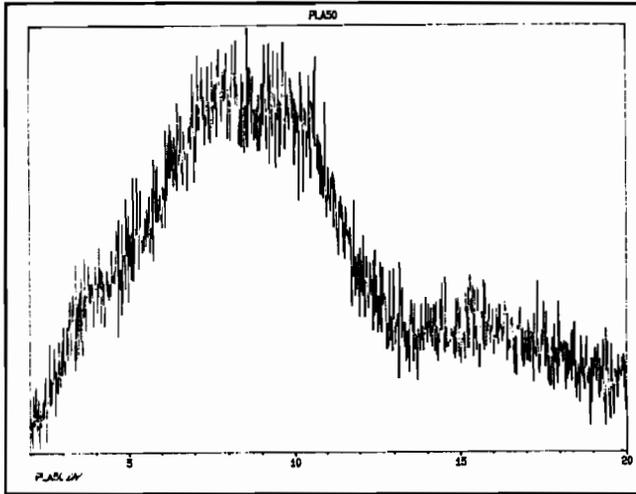


Fig. 5.1 Spectre de diffraction aux rayons-X d'une plaque massive à base de PLA50 fraîchement moulée.

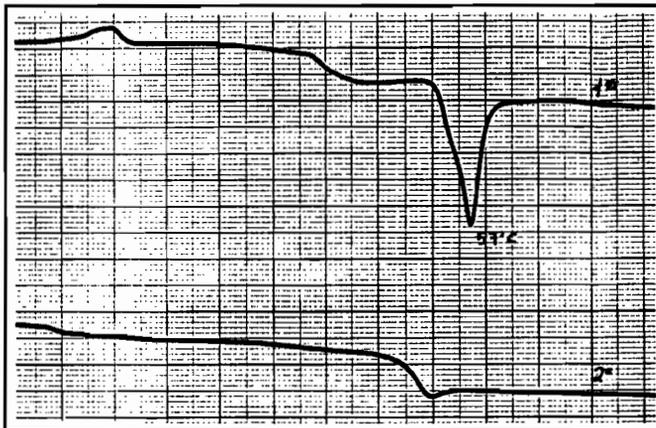


Fig. 5.2 Thermogrammes du PLA50. En haut : 1^{er} passage (vitesse de chauffage et température extrêmes); en bas, 2^e passage.

5.2.3 Préparation des milieux de dégradation

Le milieu de culture est stérilisé à 121°C pendant 20 mn. Les solutions de vitamines et d'oligoéléments sont ensuite rajoutées par filtration stérile à 0,22 µm. Toutes les expériences ont été réalisées en double.

A) Milieu à base de plaques massives de PLA50

400 ml de milieu de culture stérile sont répartis dans des fioles d'Erlenmeyer de 1 litre. 14 plaques y sont ajoutées après rinçage à l'alcool.

C) Milieu à base de plaques massives d'autres polyesters

Comme pour le PLA50, 400 ml de milieu de culture stérile sont répartis dans des fioles d'Erlenmeyer d'1 l. 12 plaques y sont ajoutées après rinçage à l'alcool.

5.2.4 Inoculation des milieux de culture

Dans tous les cas, la dégradation des polymères a été réalisée par des cultures mixtes.

Pour les plaques de PLA50, un inoculum mixte de *F. moniliforme* et de *P. putida* a été utilisé ($2 \cdot 10^7$ spores ou cellules/g de source de carbone, respectivement) (cf. §4.2.4).

Pour les autres polyesters, une culture mixte de tous les microorganismes disponibles a été réalisée : *F. moniliforme*, *P. putida* et les microorganismes isolés par criblage naturel à un taux de $2 \cdot 10^7$ spores ou cellules/g de source de carbone pour chaque microorganisme.

5.2.5 Traitement des échantillons et paramètres évalués

2 ou 3 plaques et 5 ml du milieu de culture sont prélevées de chaque fiole d'Erlenmeyer à des intervalles réguliers de dégradation.

A) Analyse du milieu

Les paramètres suivants ont été évalués : évolution du pH, activité estérasique et contenu en résidus de la dégradation, par les méthodes décrites dans le §4.2.5.

B) Analyse des plaques

La dégradation des plaques a été évaluée par la quantité d'eau absorbée et par la perte de masses molaires (SEC)(cf. §4.2.2). La perte de matière n'a pas été évaluée étant donné l'impossibilité de marquer les plaques contenues dans les fioles d'Erlenmeyer sans affecter leur dégradation par les microorganismes.

Absorption d'eau

Les plaques fraîchement prélevées ont été pesées à des temps différents de dégradation. Les échantillons ont été ensuite séchés dans un dessiccateur maintenu sous vide pendant une semaine, à température ambiante, avant d'être pesés à nouveau. L'absorption d'eau est calculée d'après l'équation suivante :

$$\text{Absorption d'eau} = \frac{M_m - M_s}{M_s} \times 100$$

où M_m et M_s représentent respectivement les masses de l'échantillon mouillé et séché.

Après séchage, la masse molaire moyenne est déterminée par SEC.

5.3 Résultats

5.3.1 Dégradation de PLA50 sous forme de plaques massives

D'après la Figure 5.3.A, le pH du milieu augmente sensiblement après une semaine d'inoculation en se stabilisant jusqu'à des valeurs proches de 8 après 12 semaines. Dans le milieu témoin sans microorganismes, le pH est resté pratiquement constant.

La quantité d'eau absorbée par les plaques témoins augmente avec une vitesse d'absorption constante de 2,4 % d'eau par semaine. En revanche, il existe deux phases pour le milieu inoculé. La première phase correspond à la cinétique observée pour le témoin. La deuxième phase présente une vitesse d'absorption beaucoup plus importante après 17 semaines (50,5 %/sem). Ainsi, après 32 semaines de dégradation chimique, il y a eu 75% d'eau absorbée, alors qu'une absorption d'eau dix fois plus importante pour la culture mixte a été observée (Fig. 5.3.B).

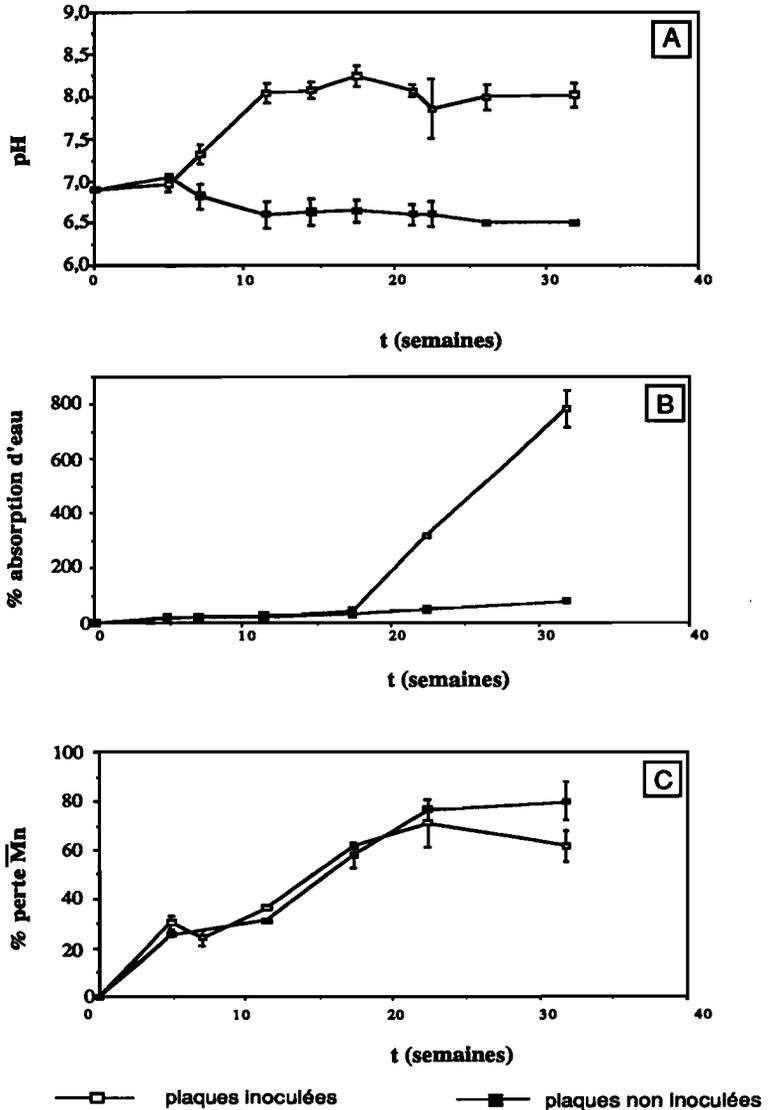


Fig. 5.3 Dégradation de plaques massives de PLA50 par des microorganismes (inoculées) et par hydrolyse chimique (non inoculées). A) Evolution du pH du milieu aqueux. B) Absorption d'eau. C) Perte de masses molaires moyennes.

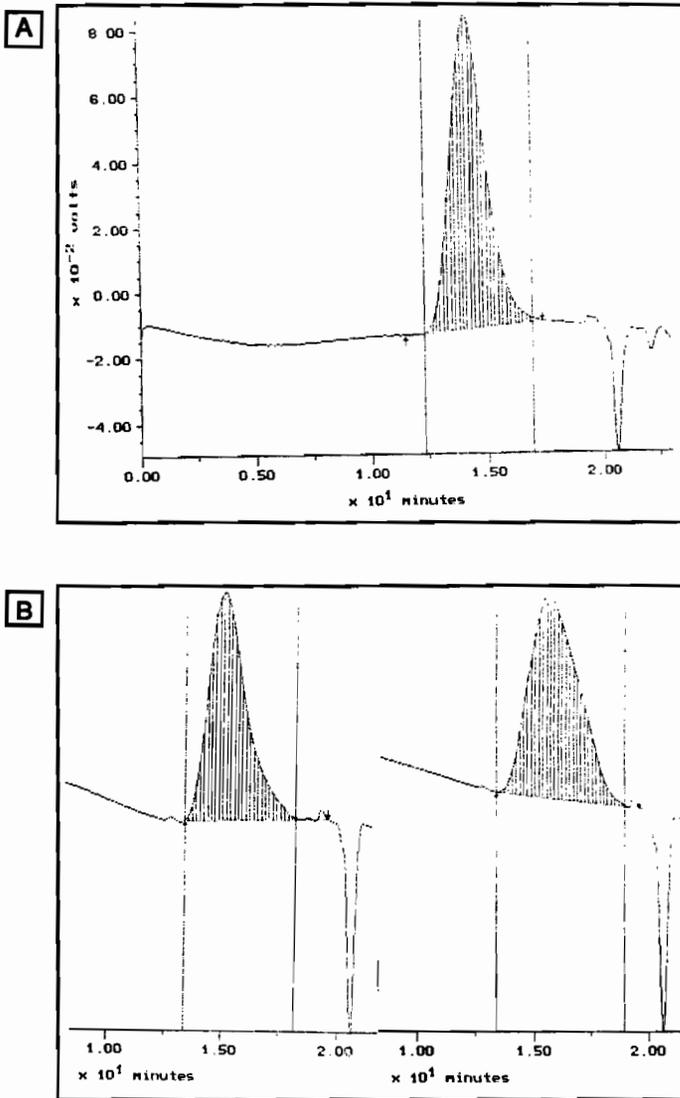


Fig. 5.4 Courbes de distribution normale des masses molaires des plaques massives de PLA50. A) Temps initial. B) Dégradation après 32 semaines en présence (gauche) et en absence de microorganismes (droite).

L'analyse par SEC (Fig. 5.3.C) montre qu'il n'y a pas de différence significative de la perte de masses molaires entre les plaques dégradées dans les milieux inoculés et non inoculés. Dans les deux cas, la vitesse est de 1,8 % de perte par semaine. Par ailleurs, nous n'avons pas observé des courbes bimodales tout au long de la dégradation (Fig. 5.4).

La Figure 5.5 montre la dégradation progressive des plaques dans les milieux inoculés. Au début (5 semaines), il y a une différenciation cœur/surface. Ensuite, cette différenciation devient de moins en moins importante jusqu'à disparaître. Après 26 semaines, les plaques apparaissent gonflées et finissent par éclater après 32 semaines.

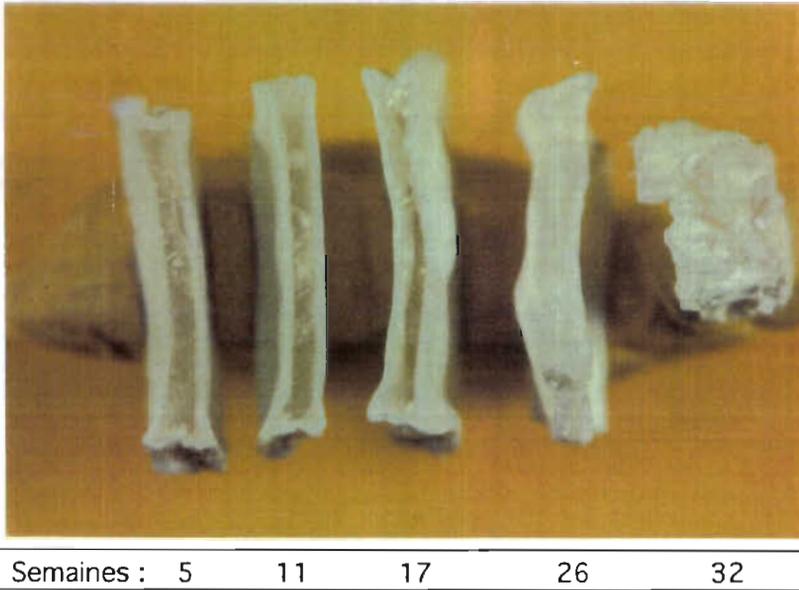


Fig. 5.5 Plaques massives de PLA50 après différents temps de dégradation en présence de la culture mixte de *F. moniliforme* et *P. putida* à 30°C et 150 rpm.

La comparaison avec les plaques témoins permet de confirmer les changements de forme des plaques inoculées (Fig. 5.6.A). En effet, après 26 semaines d'incubation à 30°C, l'épaisseur des plaques dégradées en présence des microorganismes est plus importante que celle des plaques dégradées chimiquement et que celle des plaques au temps initial (Fig. 5.6.B).

De plus, les plaques dégradées chimiquement présentent une différenciation cœur/surface beaucoup plus importante que les plaques dégradées dans les milieux contenant des microorganismes (Fig. 5.7.A). Après 32 semaines, le cœur des plaques témoins commence à devenir visqueux, tandis que les plaques dégradées en présence des microorganismes présentent une structure éclatée (Fig. 5.7.B).

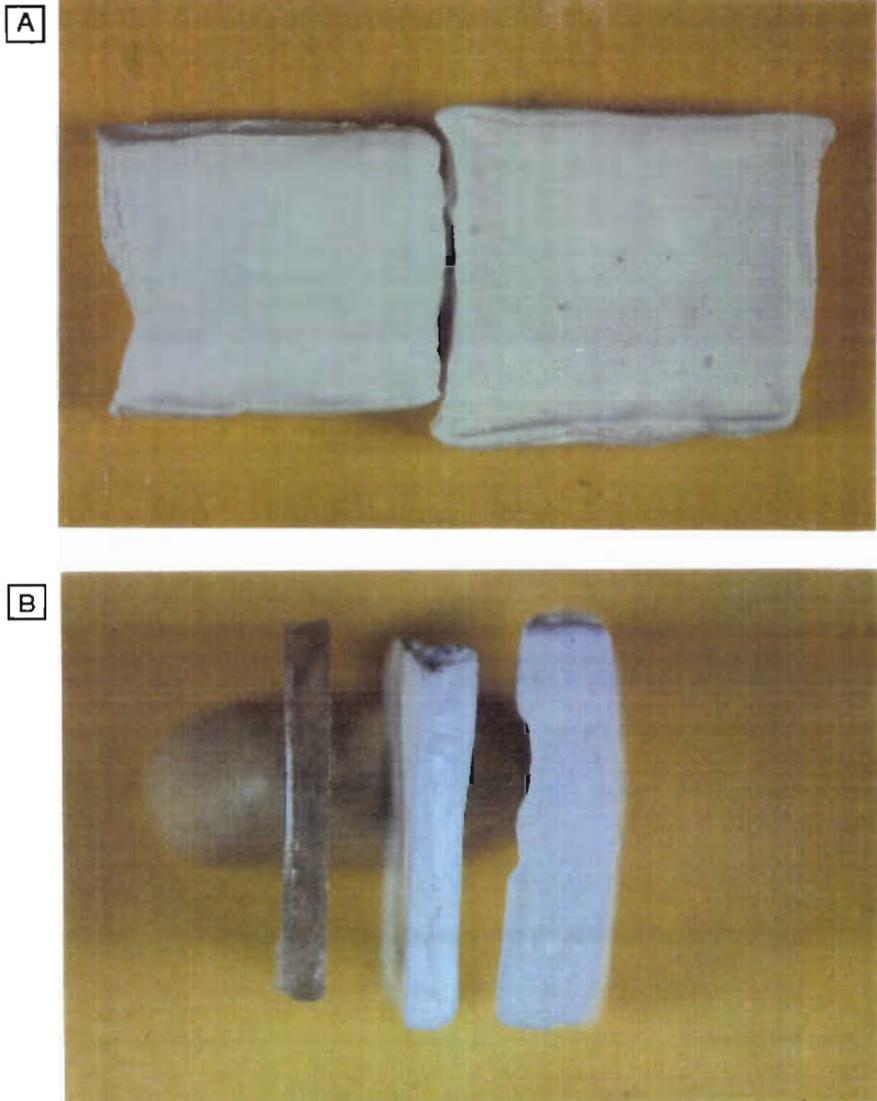


Fig. 5.6 Dégradation des plaques massives de PLA50 après 26 semaines d'incubation à 30°C.
A) Gauche : plaque témoin. Droite : plaque dégradée en présence des microorganismes.
B) De gauche à droite : différence d'épaisseur entre les plaques au temps initial, après dégradation en absence et en présence des microorganismes, respectivement.

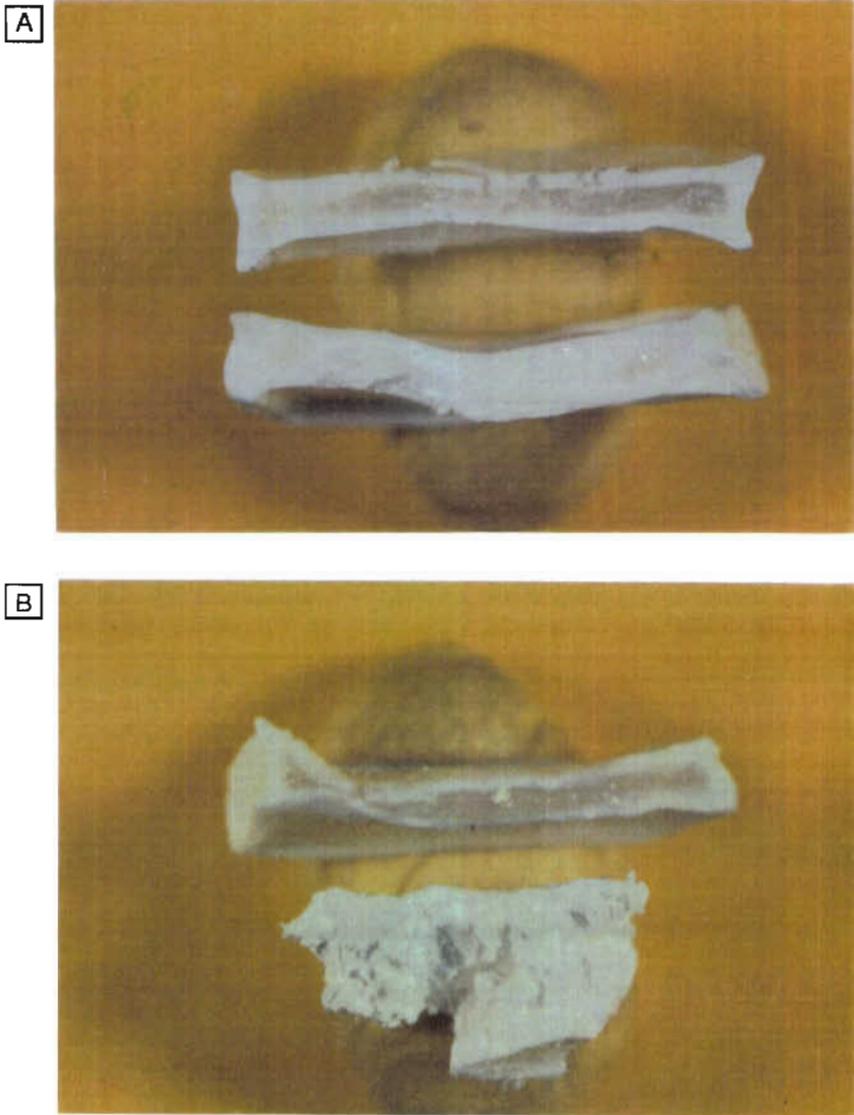


Fig. 5.7 Dégradation des plaques massives de PLA50. A) Temps de dégradation : 17 semaines. En haut : plaque témoin. En bas : plaque dégradée en présence des microorganismes. B) Temps de dégradation : 32 semaines. En haut : plaque témoin. En bas : plaque dégradée en présence des microorganismes.

Pendant toute la période d'étude, des résidus de dégradation n'ont pas été détectés dans tous les milieux. C'est seulement après 32 semaines qu'une très faible concentration d'acide lactique ($0,1 \text{ g.l}^{-1}$) a été détectée pour le témoin.

Afin de détecter des changements éventuels dans la morphologie du PLA50, notamment la formation d'un stéréocomplexe cristallin composé de chaînons L-LA et D-LA dont la présence a été mentionnée récemment (LI et VERT, 1994), nous avons comparé les spectres de diffraction aux rayons-X des plaques dégradées dans les milieux inoculés et non inoculés avec les plaques au temps initial (Fig. 5.8). Nous avons ainsi constaté qu'il n'y a pas eu de changement de morphologie : les plaques restent amorphes au cours de la dégradation.

5.3.2 Dégradation de plaques massives d'autres polyesters biodégradables

Tous les milieux contenant les polyesters présentent une augmentation importante de pH après 1 semaine d'inoculation (Fig. 5.9.A). C'est dans le cas du Bionolle[®] que le pH atteint les valeurs maximales plus rapidement (8,5 après 6 semaines). La PCL provoque une augmentation de pH plus atténuée. Dans tous les cas, la stabilité du pH est observée après 12 semaines de dégradation.

L'augmentation de pH observée dans le cas des témoins a été attribuée à la présence de microorganismes contaminants (Fig. 5.9.B). En effet, des champignons filamenteux étaient visibles dans les milieux. Il est intéressant de noter que la seule source de carbone contenue dans le milieu de dégradation était le polymère, ce qui implique que les microorganismes contaminants ont été capables d'utiliser au moins en partie les différents polyesters. Rappelons que ces matériaux ont été fournis et non synthétisés au Laboratoire, contrairement au PLA50, ce qui rend leur histoire incertaine notamment sur la présence éventuelle d'additifs assimilables. Dans le cas du PLA50, des contaminations n'ont pas été observées : le pH du témoin est resté pratiquement constant pendant la durée de l'analyse (Fig. 5.9.B).

Il a été constaté que les plaques de PLA50 absorbent beaucoup plus d'eau que les autres polyesters (Fig. 5.10). Les vitesses d'absorption d'eau des plaques de PCL et de Bionolle[®] inoculées sont légèrement supérieures par rapport aux plaques non inoculées (cf. Tableau 5.1). Pour le copolymère PHB/HV, pratiquement aucune absorption n'a été détectée que ce soit avec ou sans inoculation.

Les deux phases observées pendant la dégradation des plaques de PLA50 par la culture mixte de *F. moniliforme* et *P. putida* (cf. Fig. 5.3.B) ont été ici confirmées. Cependant, il a été observé que la deuxième phase est plus lente dans la culture mixte de la microflore isolée à partir du sol (15,4 contre 50,5).

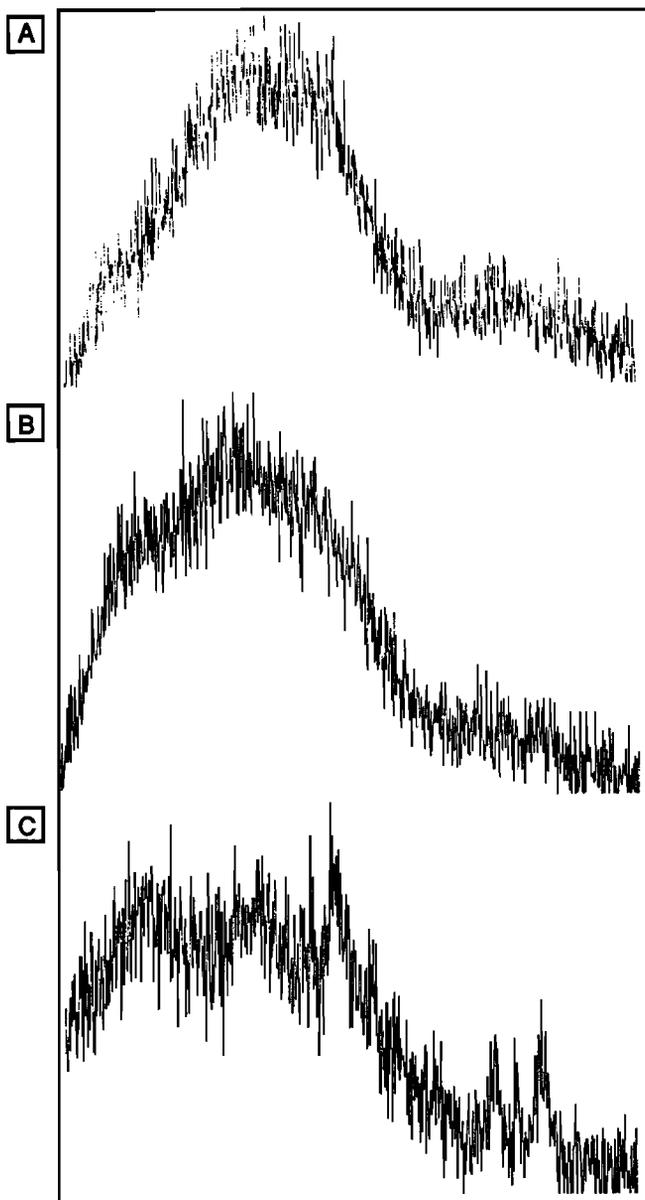


Fig. 5.8 Comparaison entre les spectres de diffraction aux rayons-X des plaques massives de PLA50. A) Temps initial. B) Après 32 semaines de dégradation chimique. C) Après 32 semaines de dégradation en présence des microorganismes.

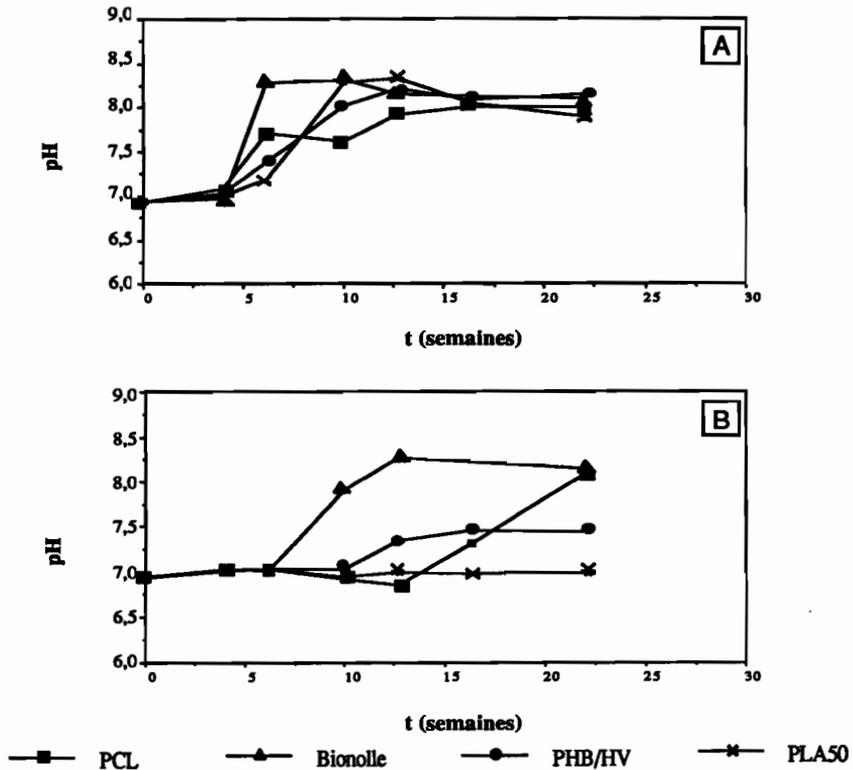


Fig. 5.9 Evolution du pH des milieux contenant des plaques des différents polyesters.
A) Milieux inoculés. B) Milieux non inoculés.

Tableau 5.1 Vitesses d'absorption d'eau par les plaques massives des différents polyesters*

Polyester	plaques inoculées	plaques non inoculées
PCL	0,3	0,0
Bionolle ^a	0,1	0,0
PHB/HV	0,1	0,1
PLA50	2,5 / 15,4 ^a	2,2

* unités : % / semaine
a) 1^o phase / 2^o phase

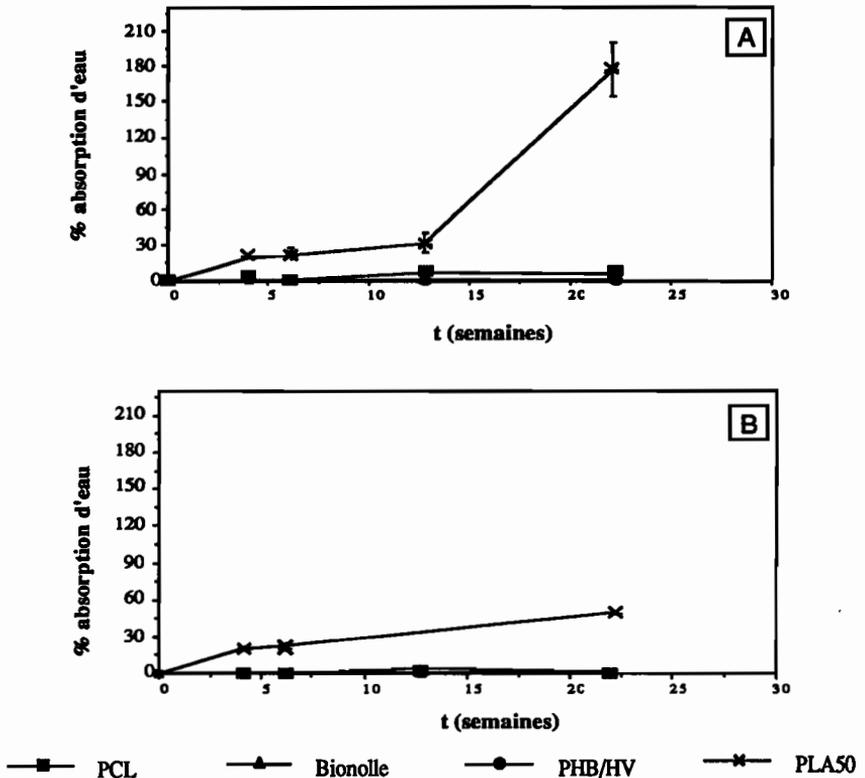


Fig. 5.10 Absorption d'eau des plaques des différents polyesters. A) Milieux inoculés. B) Milieux non inoculés.

La vitesse de la perte de masses molaires des plaques de PCL et de PLA50 est du même ordre dans les milieux inoculés et non inoculés (2 %/sem) (Fig. 5.11). L'analyse par SEC des plaques de Bionolle[®] et du PHB/HV n'a pas été réalisée pour des raisons techniques.

Nous avons observé, par ailleurs, que les microorganismes envahissent plus rapidement la surface des différents polyesters, par rapport au PLA50. En plus, cet envahissement semble couvrir totalement la surface en la laissant apparemment plus érodée que dans le cas des plaques de PLA50, au moins dans le cas de la PCL (Fig. 5.12). Or, ce phénomène n'a pas pu être évalué quantitativement.

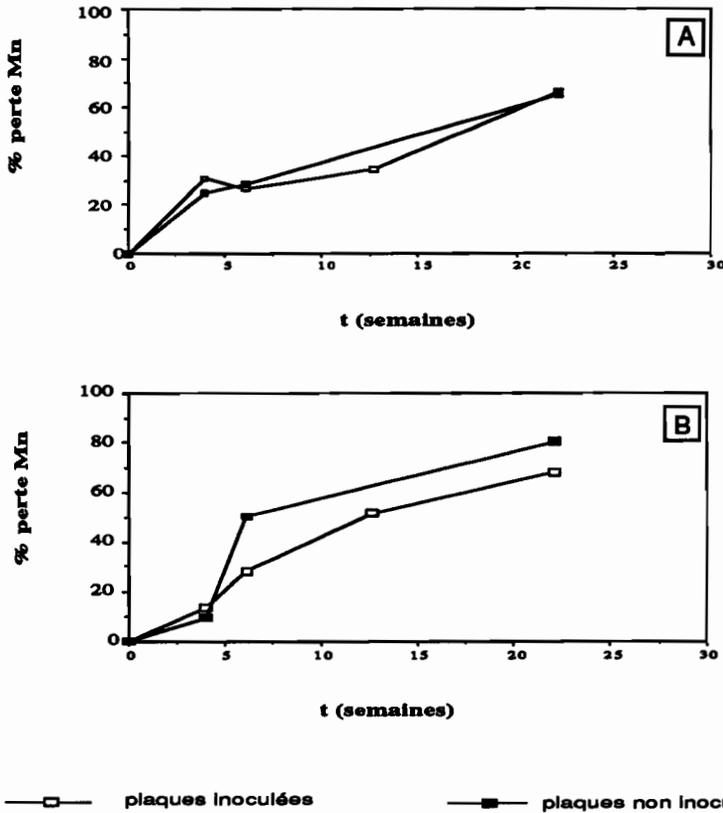


Fig. 5.11 Perte des masses molaires des plaques des différents polyesters. A) PLA50. B) PCL.

Après lyophilisation, nous avons réalisé une observation par MEB afin de comparer l'envahissement des plaques de PLA50 et de Bionolle[®] (Fig. 5.13). Nous avons pu constater que le développement des microorganismes ainsi que leur adhésion à la surface du Bionolle[®] sont plus importants que dans le cas du PLA50.

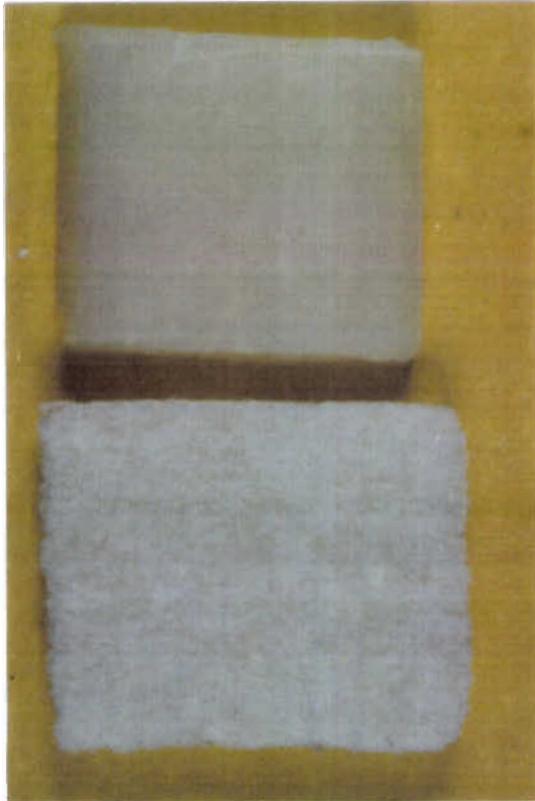


Fig. 5.12 Dégradation des plaques massives de PCL après 11 semaines d'incubation à 30°C en absence (en haut) et en présence (en bas) des microorganismes.

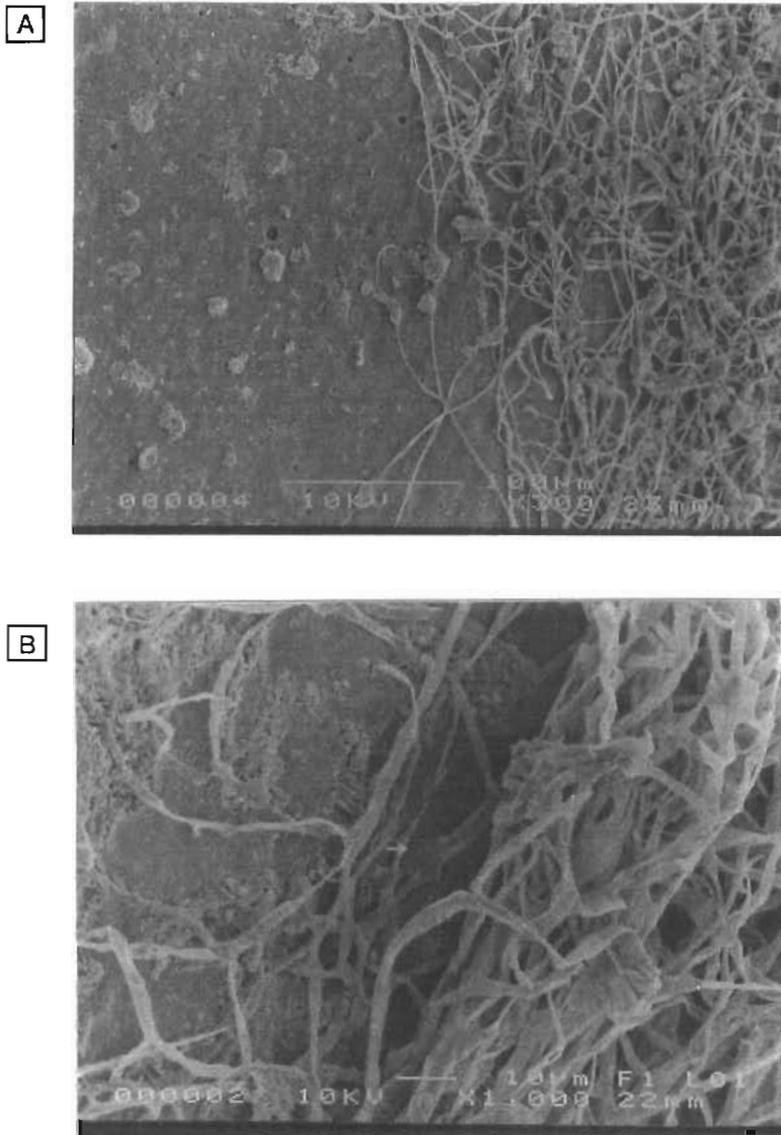


Fig. 5.13 Plaques massives après 11 semaines de dégradation en présence des micro-organismes. A) PLA50. B) Bionolle[®]

5.4 Discussion

Les résultats précédents ont révélé l'existence de différences de comportements entre les échantillons de polymères de hautes masses vieillis en milieu aqueux en présence et en absence de microorganismes.

La question est maintenant de déterminer si ces différences peuvent être considérées comme des preuves d'une biodégradation et d'apprécier les contributions relatives dues à la dégradation chimique.

Les éléments en faveur d'une contribution des microorganismes sont :

- 1) L'observation visuelle de plaques PLA50 inoculées a révélé une faible colonisation accompagnée d'abord d'une déformation de la surface, ensuite d'un gonflement très important et, enfin, d'une forte friabilité, par rapport au témoin.
- 2) Au niveau du milieu de culture, nous avons noté l'apparition d'un trouble subsistant jusqu'à la fin des expériences, c'est-à-dire après 32 semaines. En utilisant la technique des microplaques (*cf.* §4.3.6), nous avons montré que ce trouble, absent chez les témoins, correspondait en partie à une microflore de 5.10^7 cellules viables/ml.
- 3) La différenciation cœur/surface observée en fin d'expérience pour le témoin n'a pas été détectée pour les échantillons en présence de microorganismes.
- 4) Aucune différence significative de la perte des masses molaires n'a été détectée par rapport au témoin. Ceci traduit une évolution de l'intérieur des échantillons indépendante de la présence des microorganismes et de leurs éventuelles enzymes qui ne peuvent pas pénétrer dans une matrice polymère sauf dans le cas d'hydrogels très gonflés. Une absorption d'eau très importante a été observée pour les plaques en présence de microorganismes mais il n'a pas été possible de déterminer si un tel gonflement permettait la pénétration d'enzymes ou favorisait la sortie des oligomères solubles formés. Il faut noter qu'une pénétration d'enzymes actives aurait conduit à une différence importante au niveau des décroissances des masses molaires, ce qui n'a pas été le cas.
- 5) Une augmentation du pH des milieux de cultures en accord avec le suivi d'une microflore.

Ces différents éléments en faveur d'une biodégradation doivent toutefois être modérés. En effet,

- 1) Les différences d'aspect, notamment l'absorption d'eau, pourraient être dues à l'absorption de métabolites liés à l'activité microbienne avec pour conséquence, une forte modification des phénomènes de diffusion-réaction au sein des matrices.
- 2) L'absence de différenciation entre les pertes de masses molaires ne permettrait toutefois de conclure en faveur d'une biodégradation que si la perte de matière était importante en présence des microorganismes. Les conditions opératoires choisies initialement n'ont pas permis de collecter ce type d'information. Il aurait fallu peser chaque échantillon initialement et pouvoir le conditionner ensuite de manière quantitative tout au long des expériences de dégradation.
- 3) La montée du pH est connue pour refléter une activité microbienne. Elle ne reflète pas nécessairement la consommation du polymère, car elle peut être aussi liée à l'assimilation de l'urée par les microorganismes. Cette montée importante du pH pourrait également refléter une difficulté de survie pour les microorganismes. En effet, à chaque fois que nous avons placé nos microflore en présence de substrats peu disponibles (oligomères PLA100, par exemple), nous avons constaté une forte élévation du pH.
- 4) La comparaison avec des polyesters réputés biodégradables a révélé une bien plus importante colonisation de surface par rapport au PLA50. Il faut noter que pour le PHB/HV, la PCL et le Bionolle[®], la colonisation n'était pas accompagnée d'un fort gonflement. D'autre part, ces polymères sont très cristallins, contrairement au PLA50.

En résumé, les principaux phénomènes qui reflètent une forte différence entre la dégradation en présence des microorganismes et l'hydrolyse chimique sont les changements d'aspect des plaques de PLA50. Il semblerait qu'une faible libération des résidus solubles provenant de la dégradation chimique soit suffisante pour attirer les microorganismes vers la matrice polymère. Ainsi, ils seraient capables d'accélérer le processus d'hydrolyse chimique par pompage des résidus. Pour faciliter cette action, les microorganismes, notamment le champignon filamentueux, faciliteraient l'introduction de l'eau dans le réseau polymère. De cette façon, il est possible d'expliquer, d'une part, l'homogénéité des échantillons après une longue période de dégradation sans différence cœur/surface et, d'autre part, le gonflement important des échantillons suivi d'un éclatement de la structure polymère au-delà de 32 semaines.

Finalement, toutes ces constatations semblent indiquer que les microorganismes ne sont pas capables d'attaquer les longues chaînes polymères PLA50. Ils seraient plutôt susceptibles d'avoir une influence sur l'hydrolyse chimique par la consommation des produits de la réaction, une fois que ces produits deviennent biodisponibles.

5.5 Conclusion

Dans les conditions d'étude utilisées, il nous est apparu prudent de limiter nos conclusions par rapport au possible caractère biodégradable du PLA50 et d'examiner le comportement des plaques de PLA50 de hautes masses molaires en présence d'enzymes pures.

DEGRADATION ENZYMATIQUE DES PLA

6.- Dégradation enzymatique des PLA

6.1 Introduction

L'étude bibliographique a montré qu'il existe une confusion générale sur le rôle des enzymes dans la dégradation des polymères d'acide lactique. Pour certains auteurs, les enzymes provoqueraient simplement des modifications physico-chimiques du milieu (VERT et coll., 1992) ; pour d'autres (FUKUZAKI et coll., 1989 ; WILLIAMS et MORT, 1977) elles agiraient en tant que vrais catalyseurs biologiques, bien que certains nuancent leurs affirmations (WILLIAMS et MORT, 1977). Par ailleurs, il y a aussi des confusions entre enzymes selon qu'elles appartiennent au métabolisme de microorganismes ou des cellules animales.

HOLLAND et coll. (1986) affirment qu'il existe une action très faible des enzymes dans les premières étapes de dégradation des polymères en état vitreux. Leur activité deviendrait plus importante lorsque l'érosion et la fragmentation physique du polymère seraient significatives. Par contre, les enzymes peuvent jouer un rôle important dans la dégradation des polymères en état caoutchoutique.

L'hydrolyse des liaisons ester dans une matrice polymère est un processus autocatalytique. Ainsi, des phénomènes qui défavorisent la diffusion des oligomères formés au cours de la dégradation peuvent augmenter la vitesse de réaction. L'hydrolyse peut donc être accélérée sans qu'il n'y ait nécessairement action des enzymes. Néanmoins, les sous-produits de faibles masses molaires peuvent, eux, être attaqués par des enzymes du fait de leur solubilité dans l'eau (VERT et coll., 1992).

Nous avons démontré dans les chapitres précédents que les microorganismes sélectionnés sont capables d'accélérer la dégradation hydrolytique des polymères racémiques d'acide lactique. Toutefois, l'assimilation microbienne des résidus solubles ne permet pas d'analyser l'effet de leur disparition sur l'équilibre chimique. Afin de mieux comprendre la part enzymatique de la dégradation des PLA, tout en permettant l'accumulation des sous-produits, nous avons utilisé des enzymes pures réputées capables de dégrader des polyesters aliphatiques (estérase, lipase, protéinase K)(cf. Etude Bibliographique). Dans le but d'éliminer au maximum les possibles effets purement physico-chimiques, un faible rapport massique enzyme/polymère (inférieur à 10 mg/g) a été utilisé.

Nous avons d'abord étudié l'action d'une estérase porcine, d'une lipase fongique et d'un mélange des deux enzymes sur la dégradation des oligomères racémiques et des oligomères à 100% d'unités L. Le mélange enzymatique a été utilisé afin de mettre en évidence une éventuelle synergie. Ensuite, nous avons étudié la dégradation du PLA50 de hautes masses par une protéase fongique (protéinase K) afin de reproduire les travaux de REEVE et coll. (1994).

6.2 Matériels et Méthodes

6.2.1 Mise au point des conditions de dégradation

Deux milieux de réaction ont été définis pour la mise en évidence de la dégradation enzymatique. Pour le premier, nous avons employé un tampon phosphate à un pH initial de $6,6 \pm 0,1$ et à une concentration de 0,2M afin d'éviter une chute rapide du pH due à l'accumulation des produits de dégradation. Dans le deuxième cas, nous avons utilisé un tampon Tris-HCl à un pH initial de $9,0 \pm 0,1$ et à une concentration de 0,2M (Tableau 6.1). L'azoture de sodium a été utilisé à raison de $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ pour éviter d'éventuelles contaminations. Il a été directement dissout dans les deux tampons.

Pour faciliter les comparaisons entre les différentes enzymes, la même quantité en unités enzymatiques par volume de milieu réactionnel a été utilisée (2500 U/l). Dans le cas du mélange d'enzymes, nous avons utilisé 2500 U/l de lipase + 1250 U/l d'estérase. Des témoins libres d'enzyme ont été analysés.

6.2.2 Substrats étudiés

Nous avons étudié deux types de substrat :

- oligomères de PLA50 et de PLA100 (No. 3).
- polymère PLA50 en poudre

Les caractéristiques de ces substrats ont été décrites dans le §4.2.2.

6.2.3 Enzymes utilisées

Trois enzymes différentes ont été étudiées (Boehringer Mannheim)(Tableau 6.2) :

- Une lipase de *Rhizopus arrhizus* (50 000 U/ml, 10 mg/ml, EC 3.1.1.3).
- Une estérase de foie de porc (1 300 U/ml, 10 mg/ml, EC 3.1.1.).
- Une protéinase K de *Tritirachium album* (600 U/ml, 16,2 mg/ml, EC 3.4.21.14).

6.2.4 Préparation des milieux de dégradation

Les milieux réactionnels sont introduits dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml. Des prélèvements de 3 ml sont effectués périodiquement. Aucun ajustement de pH n'est réalisé.

Tableau 6.1 Conditions de dégradation enzymatique du PLA

Milieu réactionnel 1		Milieu réactionnel 2	
Composé	quantité	Composé	quantité
Tp. P 0,2 M + NaN ₃	200 ml	Tp. Tris-HCl 0,2 M + NaN ₃	200 ml
Substrat	2 g	Substrat	0,02 / 0,2 / 2 ou 4 g
Enzymes :		Enzyme :	
a) estérase ou	0,38 ml	protéinase K	0,84 ml
b) lipase ou	0,01 ml		
c) estérase+lipase	(0,19+0,01) ml		
pH	6,6 ± 0,1	pH	9,0 ± 0,1
Conditions d'incubation			
Agitation		150 tpm	
Température		30°C	

Tableau 6.2 Concentration des différentes enzymes utilisées

Enzymes	U/ml	µg/ml	mg/g substrat
estérase	2,5	19,0	1,9
lipase	2,5	1,0	0,1
estérase + lipase	3,7	20,0	2,0
protéinase K	2,5	67,2	6,7

6.2.5 Traitement des échantillons et paramètres évalués

Les paramètres évalués pour chaque prélèvement sont : l'évolution du pH et l'apparition des produits de la dégradation (acide lactique, dimère et trimère). La fraction d'oligomères solubles est obtenue à partir de l'hydrolyse alcaline totale du surnageant de chaque prélèvement et la concentration finale en acide lactique est calculée après prise en compte de la dilution faite par l'addition de la soude (cf. §4.2.5).

6.3 Résultats

6.3.1 Dégradation des oligomères PLA50

Les trois systèmes enzymatiques choisis (estérase, lipase et mélange des deux) ont permis de suivre la libération des différents produits dans le tampon et de la comparer avec un témoin libre d'enzymes.

A) Apparition d'acide lactique

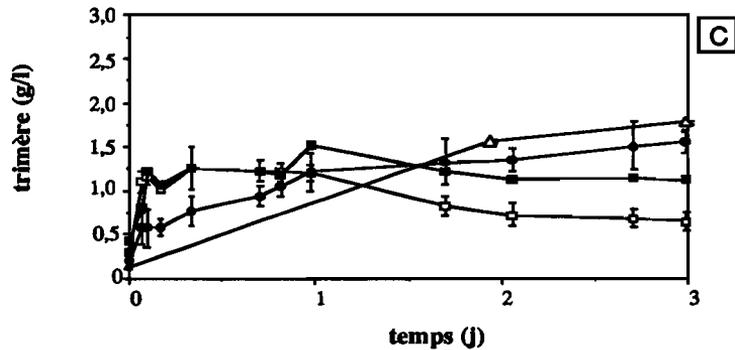
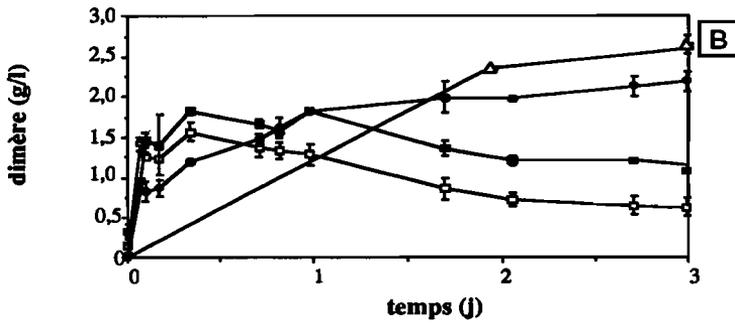
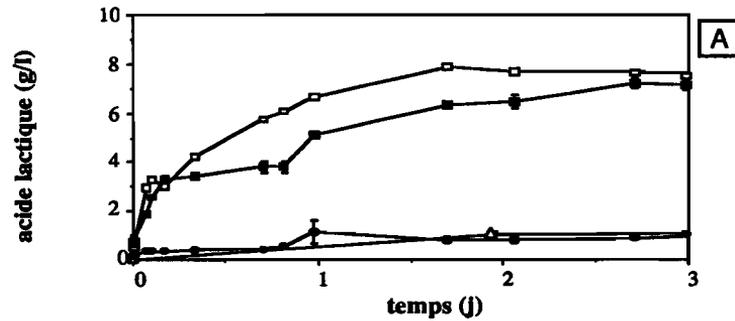
Il a été constaté que la lipase permet une libération d'acide lactique du même ordre que l'hydrolyse chimique (1 g.l^{-1} maximum après 24 h) dans les mêmes conditions ($\text{pH} = 6,6$ et $T = 30^\circ\text{C}$). Par contre, la concentration finale en acide lactique est nettement plus élevée en présence de l'estérase (Fig. 6.1.A). La valeur maximale est d'environ 8 g.l^{-1} qui équivaut un taux de conversion de 66% en prenant en compte le fait que 10 g.l^{-1} d'oligomères correspondent à 12 g.l^{-1} en acide lactique. Dans le cas du mélange des enzymes, la concentration maximale en acide lactique est légèrement inférieure par rapport au cas de l'estérase seule (7 g.l^{-1}).

B) Apparition du dimère

Comme pour l'acide lactique, la quantité de dimère libéré par la lipase n'a pas dépassé celle du témoin qui produit une concentration maximale de 3 g.l^{-1} au-delà de 4 jours. Ce n'est que dans les premières heures de dégradation que l'estérase seule et le mélange libèrent des concentrations plus élevées en dimère que le témoin, le maximum étant inférieur à 2 g.l^{-1} après 12 heures d'incubation à 30°C . Ensuite, la concentration en dimère diminue pour atteindre une valeur constante de 0,5 et 1 g.l^{-1} pour l'estérase et le mélange d'enzymes respectivement, à partir de 36 heures de réaction (Fig. 6.1.B).

C) Apparition du trimère

La libération du trimère suit le même profil que celle du dimère : les concentrations pour l'estérase seule et le mélange sont maximales au début de la dégradation pour ensuite diminuer jusqu'à des valeurs constantes. Le mélange d'enzymes permet également d'atteindre une concentration constante plus élevée que l'estérase seule. Dans ce cas, la libération maximale obtenue par la dégradation chimique est de 2 g.l^{-1} , du même ordre que la dégradation en présence de la lipase (Fig. 6.1.C).



□ estérase ● lipase ■ mélange △ témoin

Fig. 6.1 Cinétique de la libération des produits de la dégradation des oligomères de PLA50 sous l'action de différentes enzymes dans un tampon phosphate 0,2M (pH 6,6) agité à 30°C. A) Acide lactique. B) Dimère. C) Trimère.

D) Evolution du pH

En présence de la lipase, les valeurs de pH restent constantes aux environs de 6,5, de même que pour le témoin (Fig. 6.2.a). En revanche, le pH descend jusqu'à 5 après 2 jours d'incubation avec l'estérase, alors qu'une valeur de 5,5 est atteinte pour la même période d'incubation en présence du mélange.

E) Fraction d'oligomères solubles

La concentration en oligomères solubles augmente rapidement dans le cas de l'estérase et du mélange des enzymes : elle atteint 8 g.l^{-1} au bout de 2 heures de réaction. Après 1 jour d'incubation, une concentration importante d'oligomères solubles, entre 9 et 10 g.l^{-1} , est obtenue pour tous les cas (Fig. 6.2.b).

L'observation des milieux réactionnels a permis de constater que lorsque l'estérase est utilisée, seule ou en mélange avec la lipase, elle conduit à un milieu hétérogène : les oligomères ne se sont pas dispersés et ont précipité sous forme de petits amas blancs au début des cinétiques. Par contre, dans le cas du témoin et de la lipase, les oligomères se sont immédiatement mis en émulsion, c'est-à-dire dispersés en milieu tamponné. Les particules ne sont donc pas solubilisées mais seulement mises en suspension, ce qui se traduit en un milieu transparent bien homogène. Ce n'est qu'au bout de 15 jours que les oligomères se sont présentés sous la forme de petits amas blancs.

F) Conclusion

Dans les conditions expérimentales retenues, la lipase ne présente aucun effet sur la dégradation des oligomères de PLA50. Bien que les oligomères soient dispersés dans le milieu, l'hydrolyse n'est pas favorisée. Par contre, l'estérase est capable de dégrader les oligomères de PLA50. Son action semble inhibée par une diminution de pH due à l'accumulation d'acide lactique. Cette inhibition semble survenir au moment où le pH est de l'ordre de 5. L'estérase aurait un mécanisme à la fois exogène et endogène car des quantités importantes de dimère et de trimère sont produites au début de la dégradation qui diminuent par la suite. Dans le cas du mélange, les concentrations en dimère et en trimère sont plus importantes que dans le cas de l'estérase seule, ce qui indique une réduction de l'activité de l'estérase du fait de la concentration plus faible.

Les changements physiques observés dans les milieux en présence de l'estérase permettent de supposer que, malgré sa faible concentration, elle est capable de modifier les caractéristiques physico-chimiques du milieu.

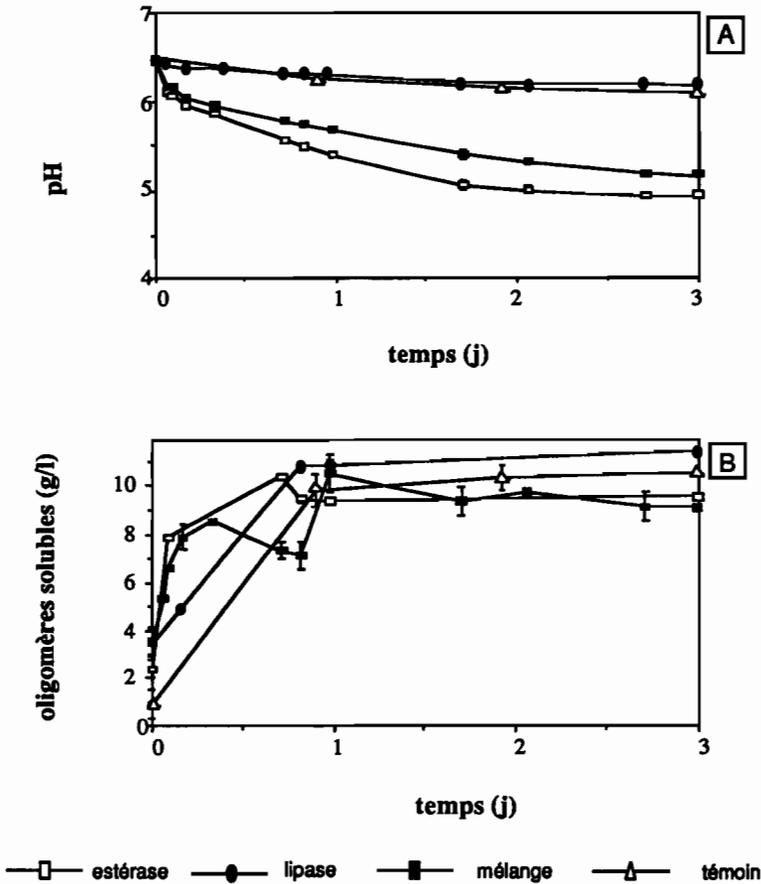


Fig. 6.2 Dégradation des oligomères de PLA50 sous l'action de différentes enzymes dans un tampon phosphate 0,2M (pH 6,6) agité à 30°C. A) Evolution du pH. B) Concentration en oligomères solubles dans le surnageant du tampon.

6.3.2 Dégradation des oligomères PLA100

Globalement, la concentration des produits de la dégradation des oligomères de PLA100 (No.3) est inférieure à celle observée pour les oligomères de PLA50.

A) Apparition d'acide lactique

La plus forte proportion d'acide lactique est produite par l'estérase seule, le maximum étant de $2,0 \text{ g.l}^{-1}$ après 24 heures d'incubation (Fig. 6.3.A). Le taux de conversion maximal est donc de 16%. Pour la même période, le mélange d'enzymes libère une quantité maximale de 1 g.l^{-1} d'acide lactique. Dans les cas de la lipase et du tampon témoin, la concentration en acide lactique est de $0,5 \text{ g.l}^{-1}$.

B) Apparition du dimère

La concentration en dimère est plus faible pour l'estérase et le mélange que pour la lipase et le témoin ($0,5$ contre $1,0 \text{ g.l}^{-1}$ respectivement). Les valeurs restent pratiquement constantes après 24 heures de réaction dans tous les cas (Fig. 6.3.B).

C) Apparition du trimère

Dans le cas où l'estérase est présente, une faible concentration en trimère est détectée (maximum $0,5 \text{ g.l}^{-1}$). En présence de lipase et dans le tampon témoin, le trimère n'est pratiquement pas libéré (Fig. 6.3.C).

D) Evolution du pH

Pour tous les cas, les valeurs de pH restent constantes aux environs de $6,5$ (Fig. 6.4.A).

E) Fraction d'oligomères solubles

Une très faible solubilité des oligomères de PLA100 est observée dans tous les milieux (Fig. 6.4.B). Elle serait légèrement supérieure en présence de l'estérase (3 g.l^{-1} maximum). Des changements d'aspect physique des différents milieux enzymatiques n'ont pas été détectés.

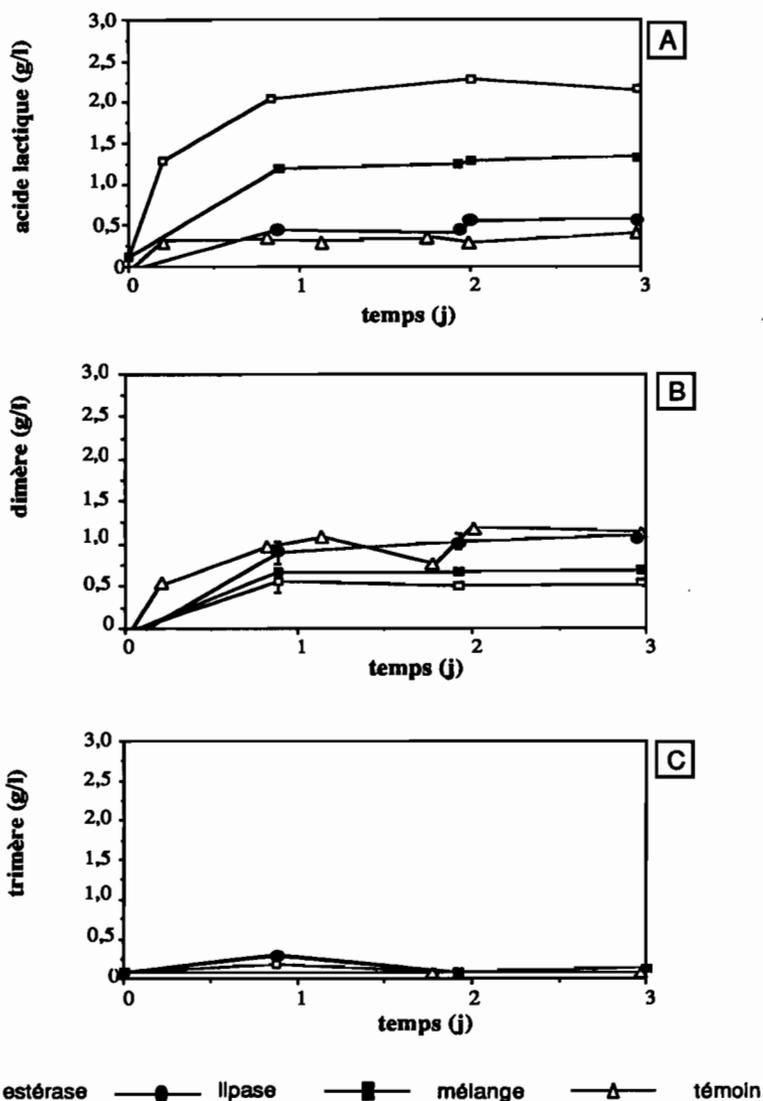


Fig. 6.3 Cinétique de la libération des produits de la dégradation des oligomères de PLA100 sous l'action de différentes enzymes dans un tampon phosphate 0,2M (pH 6,6) agité à 30°C. A) Acide lactique. B) Dimère. C) Trimère.

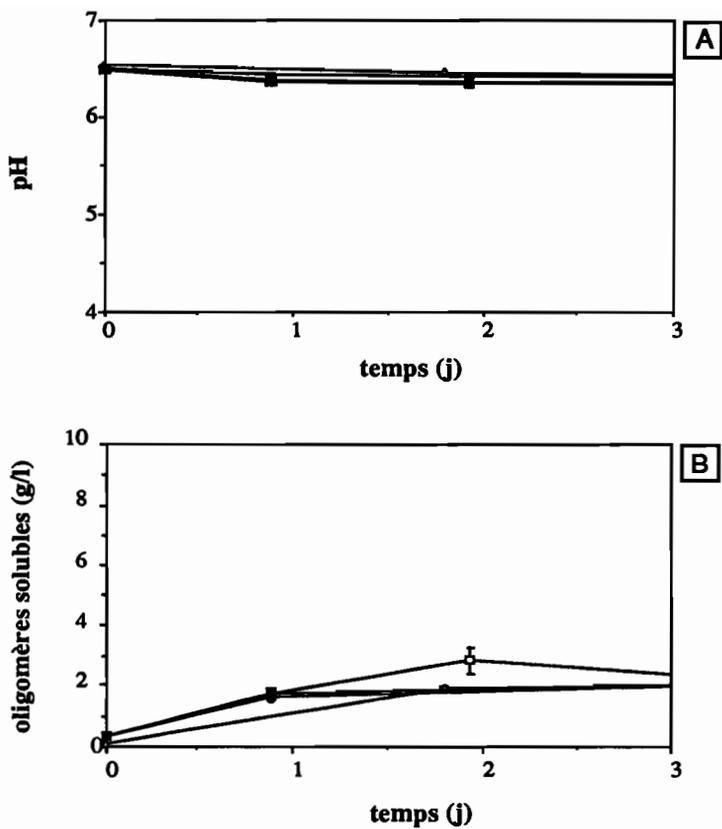


Fig. 6.4 Dégradation des oligomères de PLA100 sous l'action de différentes enzymes dans un tampon phosphate 0,2M (pH 6,6) agité à 30°C. A) Evolution du pH. B) Concentration en oligomères solubles dans le surnageant du tampon.

F) Conclusion

La lipase n'a aucune activité sur la dégradation des oligomères de PLA100.

L'estérase seule et son mélange avec la lipase ont à nouveau manifesté une certaine activité qui reste relativement faible. Dans ce cas, il ne s'agirait pas d'une inhibition par diminution du pH, mais plutôt d'une inhibition par la cristallinité du PLA100 : l'enzyme n'aurait pas accès au substrat. Il serait également possible que l'estérase soit beaucoup moins active sur des oligomères de plus hautes masses, 4000 dans le cas des oligomères PLA100 No. 3 contre 2000 pour les oligomères PLA50.

La libération rapide du dimère et du trimère, suivie d'une disparition progressive, dans le cas de la dégradation des oligomères racémiques en présence de l'estérase et du mélange, n'a pas été observée pendant la dégradation des oligomères de PLA100. En effet, ces enzymes ne semblent pas faciliter la transformation du dimère et du trimère en acide lactique, uniquement lorsque les formes L sont présentes.

La comparaison des dégradations des oligomères PLA50 et PLA100 montre que le degré maximum de dégradation des oligomères est atteint en présence de l'estérase seule, où les vitesses initiales de libération des produits sont les plus importantes (Tableau 6.3). Dans le cas du mélange, où l'estérase est 2 fois moins concentrée, la vitesse de libération d'acide lactique par la dégradation des oligomères de PLA50 est du même ordre que pour l'estérase seule (11,2 vs. 15 g.l⁻¹.h⁻¹ respectivement). En revanche, la vitesse diminue de façon plus importante pour la dégradation des oligomères de PLA100 (5,8 vs. 1,2 g.l⁻¹.h⁻¹ pour l'estérase seule et pour le mélange, respectivement).

Tableau 6.3 Vitesses initiales de libération des produits par la dégradation des oligomères*

Enzymes	Acide LA		Dimère		Trimère	
	50	100 N° 3	50	100 N° 3	50	100 N° 3
Estérase	15,0	5,8	20,5	0,6	12,8	0,1
Lipase	0,2	0,6	1,9	1,2	0,9	0,3
Estérase+lipase	11,2	1,2	6,1	0,8	3,6	0,2
Témoin	0,2	0,1	1,2	0,9	0,7	0,1

* unités : g . l⁻¹ . j⁻¹

6.3.3 Dégradation du polymère PLA50

Les conditions utilisées pour la dégradation enzymatique des oligomères n'ont pas permis d'observer une dégradation des polymères. Bien que la cinétique ait été suivie au-delà de 500 heures, aucun changement de pH n'a été observé. Par ailleurs, l'analyse du surageant par HPLC n'a révélé aucun indice de dégradation.

Afin de pouvoir étudier la dégradation du PLA50 de hautes masses, nous avons utilisé la protéinase K. Cette enzyme est une protéase produite par le champignon *Tritirachium album* isolé du sol contenant un engrais à base de corne en poudre (REEVE et coll., 1994). Le polymère a été utilisé sous forme de poudre. Le même milieu réactionnel (tampon à pH 9) a été suivie, sans changement de la solution, contrairement au protocole suivi par REEVE et coll. (1994) pour des films. L'objectif de cette étude était d'analyser la libération des différents produits de dégradation (acide lactique, dimère, trimère) et non d'évaluer la disparition du substrat.

Dans les conditions utilisées, le PLA50 a présenté une dégradation nulle par le simple effet du tampon à pH 9 dans une période de 2 jours, alors qu'en présence de l'enzyme, des produits de dégradation ont été observés pour la même période (Fig. 6.5). Les concentrations maximales des différents produits libérés sont : pour l'acide lactique, 2 g.l⁻¹; pour le dimère, 0,5 g.l⁻¹; pour le trimère, 4 g.l⁻¹. L'action de l'enzyme n'est observée que pendant les 2 premiers jours d'incubation. Au-delà de cette période, les concentrations en acide lactique et en trimère restent constantes.

Dans le but d'étudier l'effet de la concentration de la poudre de PLA50 de hautes masses sur la dégradation en présence de la protéinase K, nous avons comparé la libération des résidus pour des concentrations en PLA50 de 1, 10 et 20 g.l⁻¹.

Nous avons observé que pour les concentrations initiales de PLA50 de 10 et 20 g.l⁻¹, la concentration maximale d'acide lactique libérée est inférieure à 3 g.l⁻¹, alors que celle du trimère atteint pratiquement le double (Fig. 6.6). Il est intéressant de noter que la libération du dimère suit un comportement très particulier : au début, il y a une légère augmentation et, après un maximum inférieur à 1 g.l⁻¹, le dimère n'est plus observé. Dans le cas de la concentration initiale de 1 g.l⁻¹, pratiquement tout le polymère a été dégradé en acide lactique et en trimère.

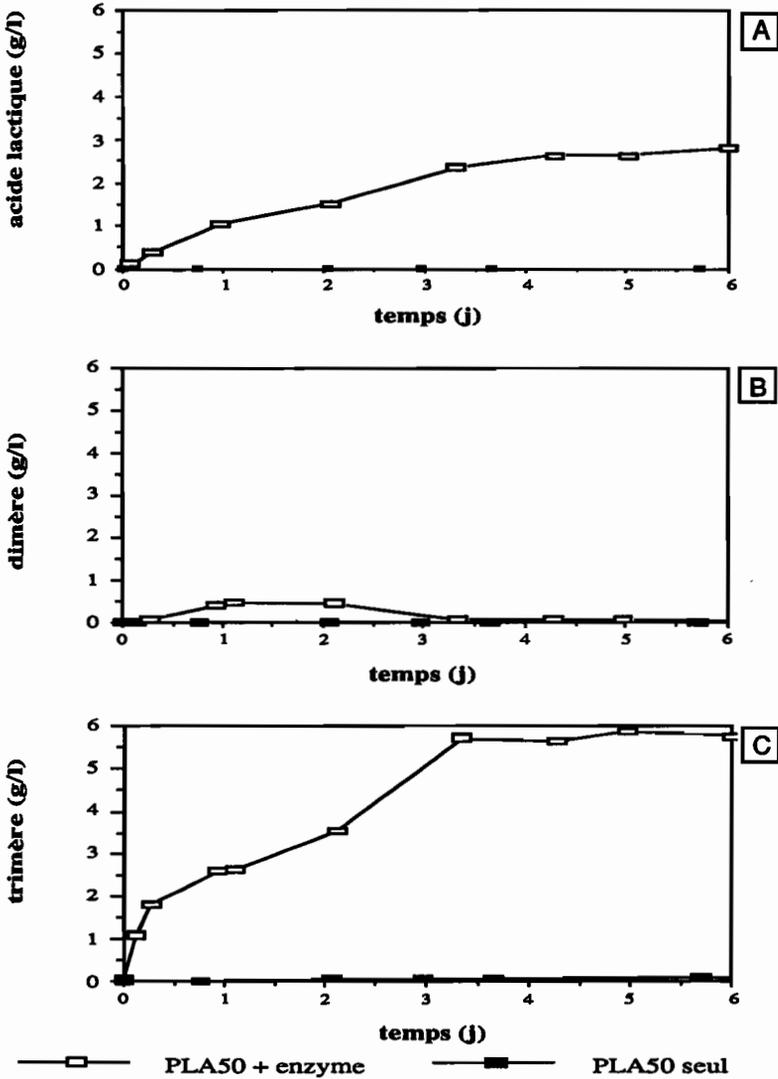


Fig. 6.5 Cinétique de la libération des produits de la dégradation du PLA50 de hautes masses en présence ou en absence de l'enzyme protéinase K dans un tampon Tris-HCl 0,2M (pH 9) agité à 30°C. A) Acide lactique. B) Dimère. C) Trimère.

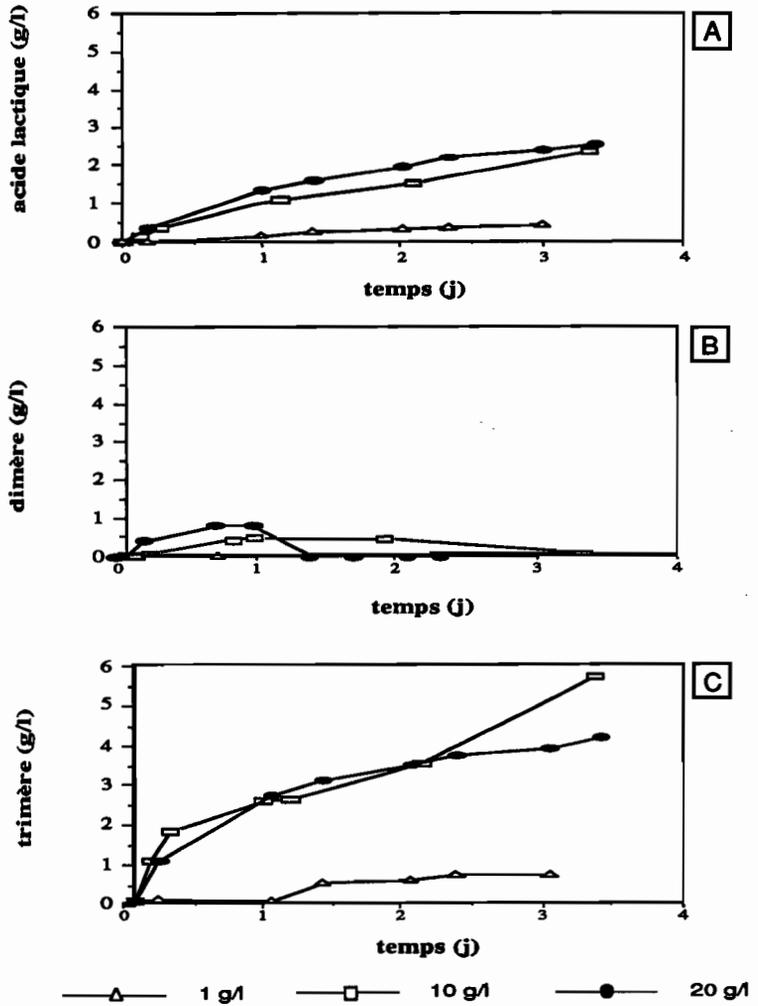


Fig. 6.6 Cinétique de la libération des produits de la dégradation à des concentrations variables de PLA50 de hautes masses en présence de l'enzyme protéinase K dans un tampon Tris-HCl 0,2M (pH 9) agité à 30°C. A) Acide lactique. B) Dimère. C) Trimère.

La valeur minimale du pH est de 8,5 environ dans les cas des concentrations à 10 et 20 g.l⁻¹ de PLA50. Pour les concentrations plus faibles, le pH reste supérieur à 9,0. Dans tous les cas, le pH reste dans le rang d'activité de l'enzyme (Fig. 6.7).

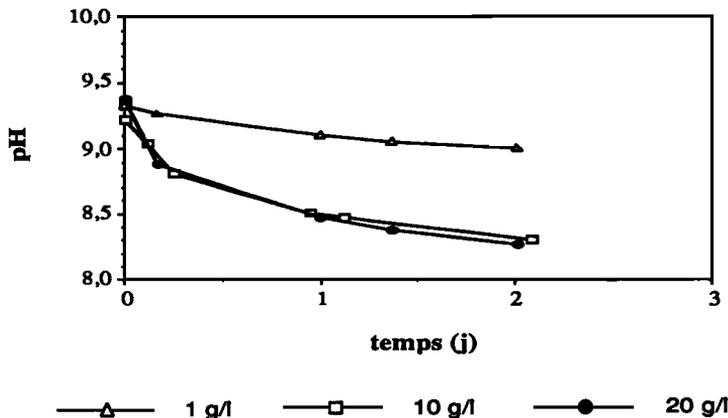


Fig. 6.7 Evolution du pH par la dégradation de PLA50 de hautes masses, à des concentrations variables, en présence de l'enzyme protéinase K dans un tampon Tris-HCl 0,2M (pH 9) agité à 30°C.

Les vitesses initiales d'apparition des différents produits de la dégradation ont été calculées à partir de la Figure 6.6 (Tableau 6.4).

Tableau 6.4 Vitesses initiales d'apparition des produits de la dégradation du PLA50 par la protéinase K*

Concentration du PLA50 g.l ⁻¹	Acide LA	Dimère	Trimère
1,0	0,22	--	0,28
10,0	0,67	0,46	1,51
20,0	1,14	0,74	2,47

* unités : g . l⁻¹ . j⁻¹

Afin de mieux caractériser l'action de la protéinase K sur le PLA50, la concentration en acide lactique de la forme L a été évaluée au moyen d'une méthode enzymatique (Boehringer Mannheim) pour la concentration initiale de 20 g.l^{-1} de PLA50.

Les résultats montrent qu'un pourcentage légèrement inférieur à 50% de la quantité totale d'acide lactique libéré après 3 jours d'incubation avec l'enzyme, se trouve sous la forme L (Fig. 6.8). Ceci impliquerait que la protéinase K attaque les petites chaînes contenant les deux formes énantiomères, dans les conditions expérimentales utilisées.

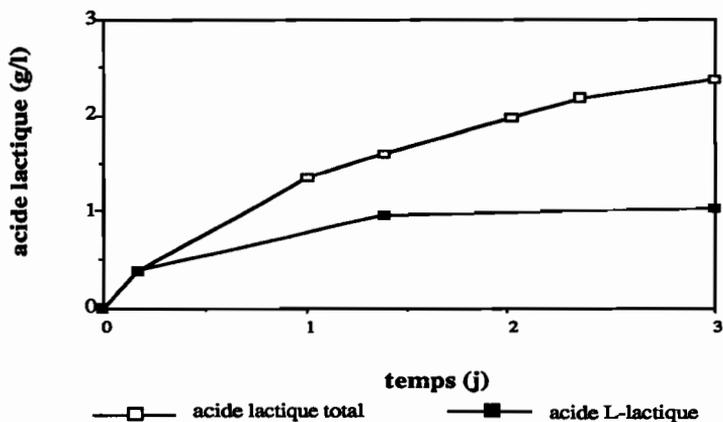


Fig. 6.8 Concentration en acide lactique total et de la forme L- libérés par la dégradation du PLA50 par la protéinase K, à 20 g.l^{-1} de concentration initiale de PLA50.

Nous avons également testé la capacité de la protéinase K à dégrader les oligomères PLA100 No.3. Les résultats montrent que cette enzyme permet une libération très rapide des différents résidus de la dégradation du PLA100, particulièrement du dimère (Fig. 6.9. A). Dans ce cas, l'action de l'enzyme serait inhibée par une chute rapide du pH due à l'accumulation des sous-produits (Fig. 6.9.B).

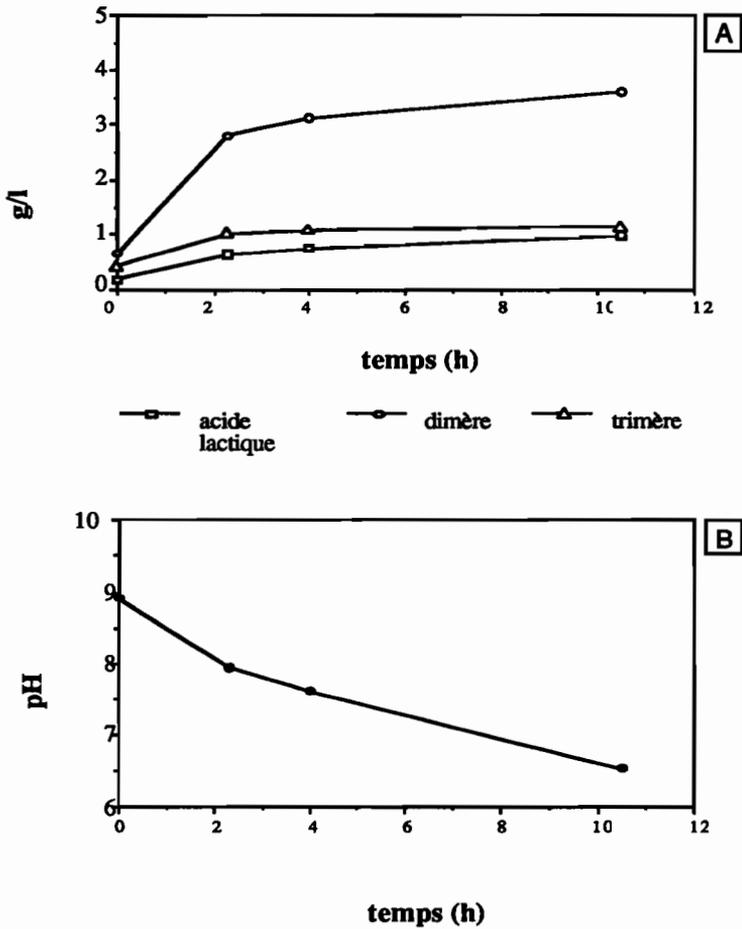


Fig. 6.9 Dégradation des oligomères PLA100 en présence de la protéinase K. A) Libération des résidus dans le milieu. B) Evolution du pH.

Conclusion

La protéinase K, une enzyme fongique non spécifique, est capable d'attaquer les liaisons ester du PLA50 de hautes masses molaires sous forme de poudre. Cette attaque enzymatique dans des conditions alcalines (pH=9) est beaucoup plus rapide que la dégradation chimique au même pH.

Néanmoins, dans les conditions expérimentales utilisées, la protéinase K n'a pas dégradé la totalité du PLA50 lorsque celui-ci est présent en quantité importante. La limite de l'action de cette enzyme n'est pas due à la diminution du pH car REEVE et coll. (1994), qui ont observé une dégradation enzymatique pour des films, affirment que l'activité de la protéinase K reste constante à des valeurs de pH comprises entre 8,0 et 9,0. Il serait possible que l'activité de l'enzyme soit plutôt limitée par le faible rapport enzyme/polymère utilisé (6,7 mg/g).

Les principaux produits de la dégradation du PLA50 de hautes masses en présence de la protéinase K sont l'acide lactique et le trimère. Le dimère n'est observé que dans les premières heures des cinétiques et est ensuite dégradé. Par contre, le principal produit de la dégradation des oligomères PLA100 est le dimère.

6.4 Discussion

L'étude de la dégradation enzymatique des oligomères d'acide lactique nous a permis de constater que l'estérase isolée du foie du porc est capable d'accélérer la dégradation de ces composés, alors que la lipase produite par *Rhizopus arrhizus* ne présente pas d'effet sous les conditions expérimentales utilisées. L'absence d'activité observée pour la lipase serait liée soit au faible rapport enzyme/oligomère utilisé (inférieur à 10 µg/g), soit au pH initial de la réaction (6,6) ou soit à une faible spécificité envers les oligomères de PLA. Par ailleurs, les oligomères de PLA50 sont plus facilement dégradés par l'estérase que les oligomères de PLA100.

Nous avons également observé que les oligomères racémiques présentent un comportement physique différent, selon qu'ils se trouvent en présence ou en absence de l'estérase. Des phénomènes physico-chimiques peuvent donc avoir eu lieu, même pour une concentration très faible en enzyme (19 µg/ml). Ainsi, il semble difficile d'affirmer que l'estérase a eu un effet réel en tant qu'enzyme, ou si elle a simplement facilité l'attaque chimique du tampon. Dans le but de faire la distinction entre les deux types de phénomènes, biochimique et physico-chimique, il serait intéressant d'utiliser une enzyme inactivée, non dénaturée, ou d'introduire un inhibiteur enzymatique dans le milieu de réaction.

La dégradation par la protéinase K du PLA50 de hautes masses en poudre, dans un tampon Tris-HCl 0,2M (pH 9), a permis de constater que les produits majoritaires de l'action de cette enzyme sont l'acide lactique et le trimère. La transformation de ce dernier en acide lactique n'a pas été observée, comme dans le cas de l'action de l'estérase, et le dimère n'a pas été libéré.

La capacité de la protéinase K pour dégrader les oligomères de PLA100 a été observée. Dans ce cas, c'est le dimère qui est libéré de façon plus importante que l'acide lactique et que le trimère. De ce fait, il serait possible que la protéinase K attaque les chaînes contenant 100% d'unités L-lactique d'une façon différente que les chaînes racémiques. De plus, la dégradation rapide des oligomères PLA100 permettrait de confirmer la meilleure affinité de cette enzyme pour les unités L. Parmi toutes les conditions testées auparavant (dégradations chimique, microbienne et enzymatique), la seule biodégradation des oligomères PLA100 observée est celle obtenue avec la protéinase K.

COOKE (1990) et WILLIAMS et MORT (1977) ont affirmé que d'autres enzymes non spécifiques, telles la chymotrypsine et la subtilisine, sont capables d'attaquer des liaisons ester des poly(hydroxy-alkanoates) tout comme des liaisons amide des protéines naturelles.

Il n'est donc pas difficile que des enzymes non spécifiques produites normalement par les microorganismes retrouvés dans les milieux naturels soient capables de dégrader les chaînes de PLA.

6.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons observé qu'une estérase animale est capable d'accélérer la dégradation des oligomères PLA50, mais pas celle des oligomères PLA100 sous les conditions expérimentales choisies. Nous avons confirmé par ailleurs que le PLA50 de hautes masses molaires peut être dégradé par une enzyme microbienne pure, la protéinase K, sous des conditions bien spécifiques.

Afin de mieux apprécier la possible biodégradation des plaques massives de PLA50 dans les milieux naturels, nous voulons maintenant analyser plus en détail la dégradation des plaques qui avaient servi précédemment à la sélection des microorganismes sauvages.

**BIOASSIMILATION DES PLA PAR
DES MICROORGANISMES DU SOL**

7.-Bioassimilation des PLA par des microorganismes isolés du sol

7.1 Introduction

Devant les difficultés rencontrées dans les chapitres précédents pour distinguer entre la dégradation et la biodégradation des plaques massives de PLA50, nous sommes revenus sur le comportement des microorganismes sauvages isolés dans des conditions naturelles.

Nous examinerons tout d'abord la colonisation microbienne des plaques de PLA50 déposées 2 mois dans le sol puis incubées dans des conditions contrôlées au Laboratoire pendant 2 mois (cf. §3.4 page 56). Nous analyserons ensuite la dégradation des oligomères PLA50 et PLA100 par les cultures mixtes des souches sauvages isolées après remise en incubation, c'est-à-dire, après 4 mois de dégradation.

7.2 Matériels et Méthodes

7.2.1 Matériaux étudiés

Nous avons étudié deux types de substrat :

- polymère PLA50 sous forme de plaques massives ayant séjourné en milieu sauvage et donc partiellement dégradées soit hydrolytiquement, soit biologiquement (cf. §3.4).
- oligomères de PLA50 et de PLA100 (No. 3) (cf. §4.2.2).

7.2.2 Conditions de dégradation

A) Dégradation des plaques massives

Les plaques massives ont été d'abord enfouies 8 semaines dans le sol. Elles ont été ensuite secouées pour éliminer la terre avant d'être déposées à la surface du milieu de culture gélosé entièrement minéral. Les boîtes de Pétri contenant les plaques ont été incubées à 30°C pendant 8 semaines, tel qu'il a été décrit dans le §3.4.1.

B) Dégradation des oligomères

Les conditions de dégradation des oligomères sont les mêmes que celles utilisées précédemment pour l'étude de la dégradation des résidus de l'hydrolyse chimique : milieux de culture agités à 150 rpm et incubés à 30°C (cf. §4.2.1).

7.2.3 Traitement des échantillons et paramètres évalués

A) Plaques massives

Après 8 semaines de mise en culture sur milieu gélosé, les plaques ont été lyophilisées puis métallisées à l'or avant d'être examinées par microscopie électronique à balayage (MEB) (cf. Annexe 2).

B) Milieux à base d'oligomères

Pour la dégradation des oligomères, les milieux ont été inoculés avec tous les micro-organismes isolés à partir des plaques enfouies (cf. §3.4.1) à raison de 2.10^7 spores/g de source de carbone/isolat microbien. Après différents temps d'incubation à 30°C, les milieux ont été traités de la même façon que les milieux des cultures de *F. moniliforme* et *P. putida* pour évaluer la dégradation globale des oligomères, c'est-à-dire, après hydrolyse alcaline totale (cf. §4.2.5).

7.3 Résultats

7.3.1 Analyse des plaques par MEB

L'examen par MEB des plaques massives de PLA50 nous a permis de réaliser les observations suivantes :

- a) La surface du matériau massif est envahie par le mycélium d'au moins un champignon filamenteux provenant du sol (Figure 7.1A).
- b) L'invasion s'est produite dans la périphérie de la plaque étant donné la nécessité pour le microorganisme d'atteindre les éléments minéraux contenus dans le milieu de culture gélosé (Figure 7.1A).

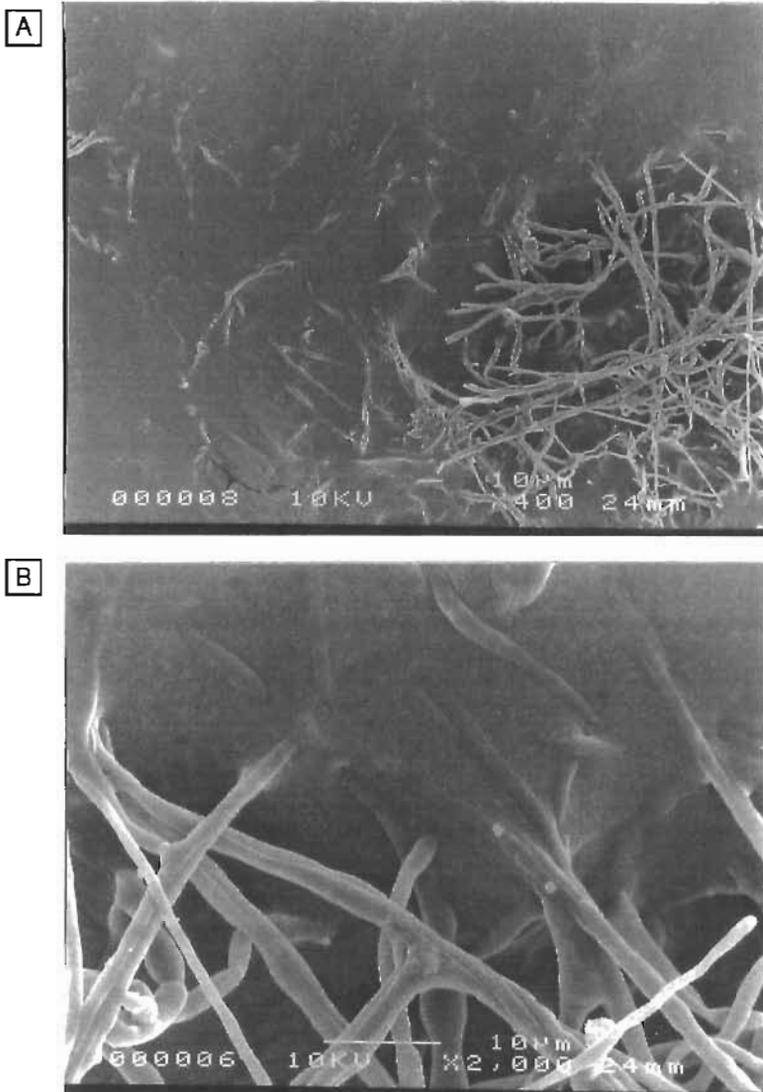


Figure 7.1 Développement d'un champignon filamenteux sur une plaque massive de PLA50 après 8 semaines d'enfouissement dans le sol, suivi de 8 semaines d'incubation à 30°C dans une boîte de Pétri contenant le milieu de culture gélosé sans source de carbone. A) Colonisation de la périphérie de la plaque (X400). B) Observation de l'adhésion et de l'inclusion des hyphes d'un champignon filamenteux dans la matrice du PLA50 (X2000).

- c) L'invasion est réalisée non seulement par adhésion des hyphes à la surface, mais aussi par pénétration. En effet, certaines hyphes du champignon ont pénétré le matériau massif et quelques unes d'entre elles ressortent de la surface pour y pénétrer à nouveau afin d'explorer le matériau. Un agrandissement de la surface (Figure 7.1B) confirme l'inclusion du microorganisme dans le matériau, l'image étant comparable à celle obtenue dans le cas de *F. moniliforme* sur les granules de PLA/GA (cf. Figure 3.3 page 50). Rappelons qu'après la période d'enfouissement dans le sol, aucune image semblable n'a été observée.
- d) La formation de trous à la surface du matériau n'est pas observée après 16 semaines de dégradation.
- e) Le mycélium se trouve en très bon état. Des renflements du mycélium laissent supposer la présence de formes de reproduction asexuée (Fig. 7.2). Toutefois, aucune identification n'a été réalisée par la suite.
- f) Des bactéries sont absentes sur la surface du matériau polymère, ce qui confirme la croissance préférentielle des champignons filamenteux sur des substrats solides.

7.3.2 Dégradation des oligomères de PLA

Nous avons observé que les oligomères PLA50 sont dégradés très rapidement par les cultures des microorganismes sauvages, par rapport aux cultures mixtes de *F. moniliforme* et *P. putida* : 90% de dégradation après seulement 8 jours d'incubation, contre 65% pour la même période, respectivement (Tableau 7.1).

En revanche, seulement 30% des oligomères PLA100 No. 3 ont été dégradés en 8 jours (Figure 7.3).

Tableau 7.1 Pourcentage des oligomères PLA50 dégradés en présence des microorganismes

temps (j)	culture sauvage	culture mixte (<i>F. m.</i> + <i>P. p.</i>)
0	0	0
2	2	23
4	63	37
6	74	50
8	90	65

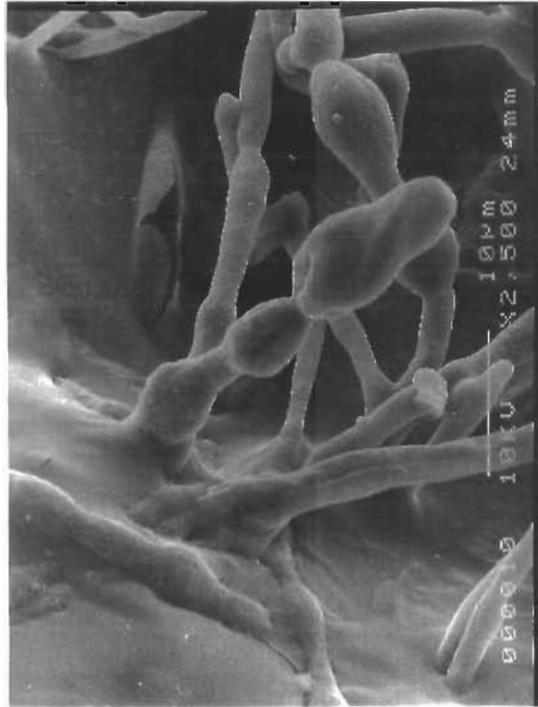


Figure 7.2 Observation de formes possibles de reproduction asexuée d'un champignon filamentueux développé à la surface d'une plaque de PLA50 (X2500).

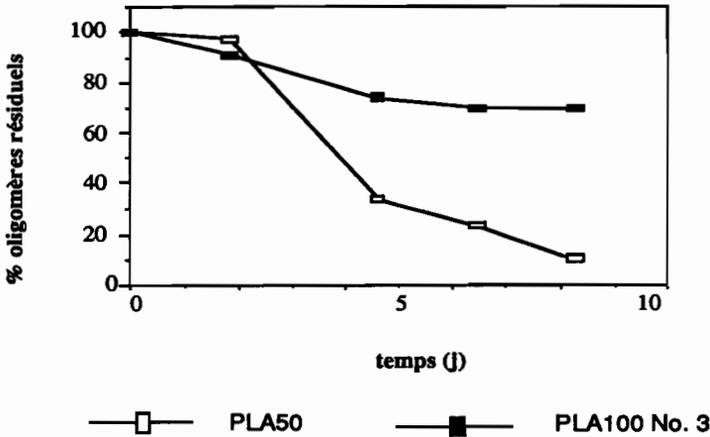


Fig. 7.3 Dégradation des oligomères PLA50 et PLA100 No. 3 par cultures mixtes des micro-organismes isolés du sol.

7.4 Discussion

Dans le cas des plaques massives de PLA50 prédégradées dans le sol et remises en incubation sur milieu gélosé, nous avons noté que, contrairement à ce qui a été observé dans les milieux liquides (cf. §5.3.3), ces plaques ne présentaient pas d'aspect blanchâtre. La dégradation s'est plutôt traduite par une diminution d'épaisseur et les plaques sont toujours restées transparentes. Ainsi, les mécanismes de dégradation en milieu solide où l'humidité est limitée, ou en milieu aqueux liquide sont différents.

En effet, l'enfouissement dans le sol et ensuite la culture en milieu gélosé n'ont pas donné lieu aux phénomènes de gonflement et d'absorption d'humidité observés dans les milieux aqueux (cf. §5.3.1 page 114). Il semblerait que la limitation d'eau en milieu gélosé défavorise la formation de structures poreuses et que l'effet d'éponge observé en milieu aqueux ne puisse pas avoir lieu.

Les images obtenues au MEB nous ont permis de constater qu'au moins un champignon filamenteux s'est très bien développé dans la masse polymère. L'incrustation du mycélium semble indiquer que le champignon est attiré par les oligomères accumulés à l'intérieur de l'échantillon, plutôt que par le matériau polymère de la surface. Il faut rappeler que les échantillons ont été soumis à une dégradation globale de 16 semaines dont les huit premières semaines ont été passées en site naturel. De plus, nous n'avons pas observé de croissance microbienne à la fin de la première période. La croissance s'est présentée pendant l'incubation dans des conditions contrôlées d'humidité et température.

Sur la base de la connaissance de la dégradation chimique, il est vraisemblable que des oligomères se sont produits lors des 8 semaines d'enfouissement avec une faible probabilité de diffusion dans les conditions d'humidité limitée. Ces oligomères se sont donc accumulés à l'intérieur des échantillons pour devenir biodisponibles pendant la deuxième période de dégradation.

En effet, les oligomères PLA50 sont dégradés très rapidement en présence des souches sauvages. De plus, ces souches se montrent plus efficaces que les microorganismes sélectionnées au Laboratoire. Ceci est en accord avec l'hypothèse émise lors du chapitre de la sélection des microorganismes (cf. 3.4), à savoir, que les milieux naturels contiennent une microflore très diversifiée et capable de dégrader des chaînes polymères PLA50. Cependant, la dégradation des oligomères PLA100 est aussi limitée qu'en présence des cultures mixtes de *F. moniliforme* et *P. putida*, ce qui confirme la faible biodisponibilité de ces composés.

La croissance préférentielle des champignons filamenteux sauvages sur les plaques de PLA50 prédégradées permet d'avancer l'hypothèse que ces microorganismes seraient les plus susceptibles d'attaquer des matériaux solides dans des conditions naturelles.

Il est intéressant de noter que l'enfouissement des plaques massives dans le sol a permis le développement ciblé d'un champignon filamenteux à la surface du matériau. Ainsi, le protocole utilisé s'est révélé efficace pour l'isolement de microorganismes dans des conditions naturelles.

Par ailleurs, le traitement des plaques par lyophilisation et ensuite la métallisation directe sans fixation n'ont abîmé ni la surface du matériau polymère, ni le mycélium du champignon, ce qui a permis une bonne observation des échantillons au MEB.

En résumé, les phénomènes observés lors de la dégradation des plaques massives de PLA50 en milieux solides et aqueux nous amènent à distinguer différents mécanismes de dégradation selon les conditions (Figure 7.4).

Une biodégradation, c'est-à-dire, l'action des microorganismes et des enzymes sur le matériau massif donnerait lieu premièrement à l'attaque de la surface pour ensuite poursuivre l'érosion vers l'intérieur. Les résultats des études réalisées avec les microorganismes sauvages ou de collection suggèrent que ce type de dégradation bio-dépendante n'est pas impliquée, au moins dans la phase initiale de dégradation.

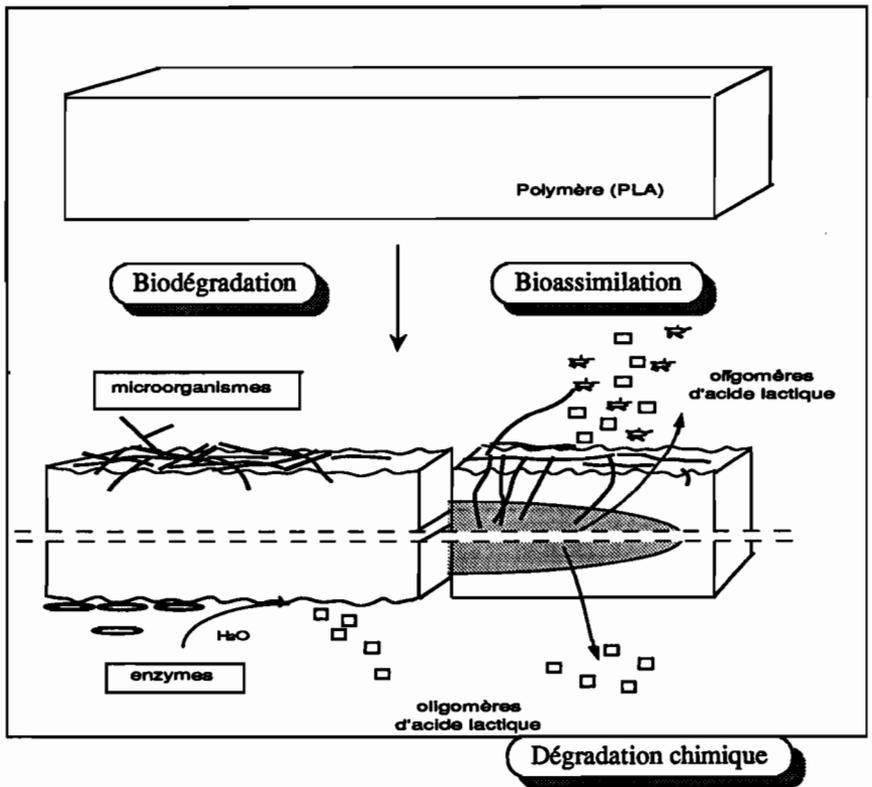


Fig. 7.4 Mécanismes proposés de la dégradation des plaques massives de PLA50.

Tout paraît indiquer que le mécanisme principal de dégradation en présence des microorganismes est la bioassimilation et non la biodégradation, au moins pour les composés massifs à base de polymère de hautes masses molaires. Ainsi, les microorganismes semblent agir seulement après une dégradation chimique qui libère des résidus bioassimilables, les oligomères.

La façon dont les oligomères sont utilisés est fonction de la disponibilité en eau libre du milieu. Dans le cas des milieux aqueux, dans leur effort pour accéder aux résidus oligomères, les microorganismes augmentent l'absorption d'eau à l'intérieur du réseau polymère et provoquent l'éclatement final du matériau. Dans les milieux à humidité limitée, le mycélium des champignons filamenteux pénètre dans la masse polymère pour atteindre les oligomères de l'intérieur, sans pour autant provoquer un éclatement de la structure.

7.5 Conclusion

Les résultats de ce travail permettent de confirmer la bioassimilation de PLA50 à l'état massif. Ils confortent la dégradabilité par certaines enzymes observée dans le chapitre précédent et l'absence de biodégradation au stade initial.

CONCLUSION GENERALE

8.- CONCLUSION GENERALE

Le problème d'accumulation de déchets solides dans l'environnement a provoqué ces dernières années un intérêt croissant pour les matériaux polymères dégradables, notamment, la famille des PLA avec l'apparition des composés industriels bon marché comme les ECO-PLA. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes concentrés sur l'étude de la dégradation des PLA de Laboratoire afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu.

Les mécanismes d'hydrolyse chimique des PLA ont été bien étudiés à l'heure actuelle. Ainsi, il est maintenant connu que les résidus de la dégradation des matériaux massifs sont des petites chaînes, des oligomères, qui diffusent vers le milieu extérieur une fois qu'elles sont suffisamment petites pour devenir solubles et pour donner en fin de compte l'acide lactique.

Néanmoins, la dégradation en présence de microorganismes n'a pas été étudiée de façon approfondie.

Notre objectif était donc d'apprécier l'éventualité d'une biodégradation des PLA par des microorganismes. Nous avons voulu vérifier si ces matériaux étaient biodégradables ou simplement bioassimilables, c'est-à-dire, si les microorganismes avaient une influence sur la dégradation dès les premières étapes ou s'ils commençaient à agir seulement à partir d'un degré avancé d'hydrolyse chimique, une fois que des résidus de dégradation étaient formés.

Nous avons d'abord sélectionné deux microorganismes de collection capables d'utiliser les résidus de la dégradation (oligomères) comme seule source de carbone et d'énergie. Ces microorganismes sont un champignon filamenteux, *F. moniliforme*, et une bactérie, *P. putida*.

Deuxièmement, nous avons mis au point une stratégie pour étudier la dégradation des résidus de l'hydrolyse chimique à des degrés différents de polymérisation : acide lactique, dimère et des oligomères insolubles.

Les paramètres sélectionnés pour le suivi de la dégradation des différents composés sont pour la plupart apparus adaptés à la compréhension des comportements microbiens. Par exemple, nous avons observé que l'évolution du pH est un très bon indicateur indirect de la consommation des différents substrats par les microorganismes, ainsi que de la dégradation chimique. De même, la concentration en acide lactique s'est révélée adéquate malgré le fait que l'acide lactique soit un inhibiteur commun de la croissance des *Pseudomonas*. La concentration que nous avons choisie n'a pas présenté d'effet inhibiteur ni pour *P. putida* ni pour *F. moniliforme*.

Par ailleurs, l'insolubilité des oligomères de faibles masses molaires en milieux aqueux aboutit à des systèmes hétérogènes difficiles à étudier et les techniques classiques pour déterminer la disparition des substrats n'ont pas pu être utilisées. Il a donc été nécessaire d'établir une nouvelle méthodologie d'évaluation de la disparition d'oligomères de PLA fondée sur l'hydrolyse totale des échantillons à étudier et l'analyse chromatographique par HPLC des intermédiaires de dégradation.

En utilisant cette méthodologie, nous avons pu comparer, d'une part, la dégradation en présence de *F. moniliforme* et de *P. putida*, en cultures pures et en cultures mixtes, avec l'hydrolyse dans le même milieu sans microorganismes. D'autre part, nous avons étudié l'effet de la composition en énantiomères (mélanges racémiques ou à 100% d'unités d'acide L lactique) sur la dégradation des oligomères PLA.

Nous avons constaté que les microorganismes n'assimilent pas l'acide lactique de façon préférentielle par rapport à la configuration L- ou DL-. Au contraire, dans le cas des dimères et oligomères nous avons mis en évidence une différence entre les mélanges racémiques et les composés 100%L. De plus, nous avons montré que le champignon présente une meilleure capacité initiale pour assimiler les dimères et les oligomères, tandis que la bactérie nécessite une période d'induction avant de devenir active.

De même, nous avons pu confirmer que la dégradation des résidus racémiques est plus rapide en présence des microorganismes. Tout d'abord, nous avons observé que la dégradation du dimère lactyl lactique en acide lactique est plus rapide par les microorganismes que par l'hydrolyse chimique. De plus, les microorganismes consomment rapidement l'acide lactique libéré. Ensuite, nous avons remarqué que pendant la dégradation chimique le taux de libération d'oligomères solubles dans le milieu de culture est lent, alors qu'avec les microorganismes, il y a, premièrement, une augmentation importante de la solubilisation puis, une diminution due à la consommation, surtout lorsque *P. putida* est utilisée.

Par ailleurs, la dégradation globale des oligomères PLA50 est plus rapide en présence de la bactérie qu'en présence du champignon. Celui-ci fait diminuer la solubilité en envahissant la surface des oligomères insolubles. Lorsque les deux microorganismes sont cultivés simultanément, la vitesse de disparition des oligomères PLA50 augmente de façon considérable. Finalement, l'activité microbienne a été reliée à une activité estérasiqque dans le surnageant des cultures.

Conclusion

Ces constatations nous ont permis de proposer un mécanisme de dégradation des oligomères racémiques, selon lequel les chaînes seraient attaquées par deux types d'enzymes : exo et endo-enzymes. Les premières seraient produites par le champignon, lequel a une faible capacité de solubilisation des oligomères mais aussi une bonne aptitude à dégrader les petits résidus. Les deuxièmes seraient produites par la bactérie qui peut solubiliser rapidement les oligomères mais qui conduit à une accumulation de petits résidus dans le milieu. L'action simultanée des deux microorganismes produit une accélération de la dégradation grâce à la complémentarité des systèmes enzymatiques.

Le comportement des microorganismes vis-à-vis des oligomères PLA100 est différent. En général, le champignon a plus de préférence pour les oligomères PLA100 que la bactérie. Cependant, dans toutes les cultures, pures et mixtes, la dégradation de ces oligomères s'est arrêtée après un certain temps. Contrairement à ce qui a été observé dans le cas des oligomères PLA50, les microorganismes n'augmentent pas la solubilité par rapport à l'hydrolyse chimique et ils ne sont pas capables non plus de créer une synergie entre eux pour augmenter la dégradation. Il semble qu'ils n'assimilent que les petites chaînes qui ont été solubilisées chimiquement. Dans ce cas, l'hydrolyse microbienne est du même ordre que l'hydrolyse chimique, bien qu'une forte activité estérasiq ue soit présente dans le milieu des cultures et même pour des masses molaires similaires aux oligomères PLA50.

Lors de la dégradation des oligomères PLA, la production de biomasse a été particulièrement difficile à évaluer à cause de l'hétérogénéité des milieux. Nous avons donc choisi d'utiliser une méthode indirecte pour étudier le cas précis du comportement de *P. putida* vis-à-vis des formes racémiques et de 100% L. Cette méthode nous a permis de confirmer l'incapacité de cette bactérie à utiliser les oligomères PLA100 pour sa survie, alors qu'elle se développe favorablement en présence des oligomères PLA50. Il s'avère que le caractère cristallin des PLA100 les rend plus résistants à l'attaque par les microorganismes.

Nous pouvons donc considérer que les oligomères PLA50 sont biodégradables et bioassimilables, tandis que les oligomères PLA100 ne sont que bioassimilables. Par ailleurs, il est évident que plus le degré de polymérisation est important, plus la dégradation est lente.

La présence de microorganismes limite l'accumulation des petits résidus de la dégradation des PLA dans le milieu de culture grâce à leur utilisation comme source de carbone et d'énergie. C'est seulement dans le cas où la libération des composés est plus importante que leur assimilation, qu'une accumulation peut avoir lieu.

La capacité de nos microorganismes à assimiler les résidus de la dégradation hydrolytique des PLA50 ayant été démontrée, nous avons voulu vérifier si ces microorganismes sont également capables de dégrader directement des PLA50 de hautes masses molaires, sous forme de matériaux massifs.

Nous avons observé que la dégradation des plaques massives de PLA50 est accélérée en présence des microorganismes mais il a été difficile d'affirmer que ce phénomène est directement lié à une activité enzymatique. Il est possible que les plaques aient été dégradées par une action indirecte des microorganismes, soit par des changements des conditions du milieu, notamment par l'élévation du pH, soit par la disparition des sous-produits de dégradation par un effet de pompage accompagné d'une absorption importante d'eau.

Pour mieux apprécier une possible dégradation par des enzymes, nous avons décidé d'utiliser des enzymes pures qui sont reportées dans la littérature comme capables d'attaquer les PLA : une estérase animale, une lipase microbienne et la protéinase K bactérienne. Nous avons trouvé que l'estérase est capable d'accélérer la dégradation des oligomères PLA50, mais pas des oligomères PLA100 ni du PLA50 de hautes masses, ceci pour des valeurs faibles de pH. La lipase n'a présenté aucun effet sur les différents substrats. Par contre, nous avons pu confirmer les résultats rapportés par REEVE et coll. (1994) pour la dégradation du PLA50 de hautes masses. C'est-à-dire que cette enzyme peut attaquer les chaînes polymères, mais sous des conditions bien spécifiques de pH. Néanmoins, pour bien démontrer la biodégradabilité des PLA, il est toujours important de prendre en compte la présence de microorganismes et non d'utiliser d'enzymes seules. En effet, les microorganismes n'ont pas nécessairement le complexe enzymatique correspondant à l'attaque du polymère. Ils peuvent aussi fournir des cofacteurs ou d'autres éléments permettant l'action optimale des enzymes.

Afin de pouvoir comparer les phénomènes observés au Laboratoire avec ceux présentés dans des conditions naturelles, nous avons choisi d'examiner plus en détail la dégradation des plaques massives de PLA50 enfouies d'abord dans le sol et mises ensuite en incubation dans des conditions contrôlées d'humidité et température. Ce protocole nous a permis, d'une part, d'observer la croissance microbienne sur le matériau massif et, d'autre part, d'isoler des souches de microorganismes sauvages.

L'observation au MEB des plaques dégradées sous ces conditions a révélée la colonisation par des champignons filamenteux, non seulement par adhésion des hyphes à la surface mais aussi par pénétration dans la masse.

Par ailleurs, la culture mixte des souches sauvages isolées à partir du sol a montré une meilleure performance pour dégrader les oligomères PLA50 que la culture mixte de *F. moniliforme* et *P. putida*. En revanche, les oligomères PLA100 sont aussi difficilement dégradés par les deux types de cultures mixtes.

Tous ces résultats nous ont amené à conclure que les PLA sont bioassimilables, au moins dans le cas des matériaux massifs de hautes masses molaires. C'est-à-dire que ces polymères ne peuvent se dégrader dans les milieux naturels qu'à partir d'un degré avancé de dégradation chimique.

De toute façon, dans les décharges, des composés hautement biodégradables perdent leur biodégradabilité lorsque les conditions sont très limitées : réduction de lumière, oxygène non disponible.... Or, il existe toujours beaucoup d'eau libre. Pour cette raison, les PLA devraient être dégradables même en décharge.

Il serait intéressant d'étudier par la suite les mécanismes de dégradation des PLA dans des conditions de compost. Dans ce système biologique, le dégagement de chaleur métabolique provenant de l'activité microbienne produit une élévation importante de la température. Ainsi, il serait possible d'analyser le comportement des PLA vis-a-vis des températures supérieures à leur T_v.

Finalement, la biorésistance initiale des PLA peut être considérée comme utile pour fabriquer des composés ayant une durée de vie programmée sans risque de pollution microbienne au stockage.

REFERENCES

9.- REFERENCES

- AFNOR. 1985. Evaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie "ultime" des produits organiques solubles. Norme française NF T90-312.
- AIBA S., HUMPHREY A.E., MILLIS N.F. 1973. Biochemical engineering. Academic Press, N.Y., 92-100.
- ALBERTSSON A.C. 1992. Biodegradation of polymers. In : "Handbook of polymer degradation", HAMID S.H., MAADHAH A.G., AMIN M.B. Eds., Marcel Dekker, N.Y., 345.
- ALBERTSSON A.C., LJUNGQUIST O. 1992. Degradable polymer. I. Synthesis, characterization and long-term *in vitro* degradation of a ¹⁴C-labelled aliphatic polyester. *J. of Macromol. Sci. Chem.*, 23(3), 393-409.
- AL-MALLAH M., GOUTX M., MILLE G., BERTRAND J.C. 1990. Production of emulsifying agents during growth of a marine *Alteromonas* in sea water with eicosane as carbon source, a solid hydrocarbon. *Oil Chem. Pollut.*, 6, 289-305.
- ASTM METHOD G21-70.1980. Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi.
- AUGUSTA J., MÜLLER R.J., WIDDECKE H. 1992. Development of standard degradation tests by the use of polyhydroxyalkanoates. Proc. of Int. Symposium on bacterial polyhydroxyalkanoates, Göttingen, Germany.
- BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GUY P., LARPENT J.P., VEAU P. 1985. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson, Paris, 139-145.
- BRANDL H., PUCHNER P. 1992. Biodegradation of plastic bottles made from 'Biopol' in an aquatic ecosystem under *in situ* conditions. *Biodegradation*, 2, 237-243.
- BRAUD C. VERT M. 1992. Degradation of poly(β -malic acid)-monitoring of oligomers formation by aqueous SEC and HPCE. *Polymer Bulletin*, 29, 177-183.
- BUCHHOLZ B. 1992. Accelerated degradation test on resorbable polymers. In "Degradation Phenomena on Polymeric Biomaterials", Springer Verlag, Berlin, 67-78.
- BUITRON G., KOEFOED A. CAPDEVILLE B. 1992. Microbial activity evolution during the acclimation of a mixed culture to phenol. Use of CO₂ evolution rate as indicator. IAWPRC, 16th. Biennial Int. Conf., Washington.
- BUITRON G., CHUDOBA P., CAPDEVILLE B. 1991. Application of gas mass spectrometry in respirometric measurements and tests of biodegradability. *Biological approach to sewage treatment process : Current status and perspectives*, 301-306.
- CELLI A., SCANDOLA M. 1992. Thermal properties and physical ageing of poly(L-lactic acid). *Polymer*, 33 (13), 2699-2703.
- CHEN X., GONSALVES K.E., CAMERON J.A. 1993. Further studies on biodegradation of aliphatic poly (ester - amides). *J. of Appl. Polymer Sci.*, 50, 1999-2006.

- COFFIN M.D., MC GINITY J.W. 1992. Biodegradable pseudolatexes : the chemical stability of poly(D,L-lactide) and poly(ϵ -caprolactone) nanoparticules in aqueous media. *Pharmaceutical Research*, 9(2), 200-205.
- COOKE T.F. 1990. Biodegradability of Polymers and fibers. *J. of Polymer Eng.* 9(3), 171-211.
- COX M.K. 1991. The effect of material parameters on the properties and biodegradation of "BIOPOL". Proc. of 2th. Int. Sci. Workshop on biodegradable polymers and plastics, Montpellier, France, 95-99.
- DOI Y., KUMAGAI Y., TANASHI N., MUKAI K. 1991. Structural effects on biodegradation of microbial and synthetic poly (hydroxyalkanoates). Proc. of 2th. Int. Sci. Workshop on biodegradable polymers and plastics, Montpellier, France, 139-146.
- DOMSCH K.H., GAMS W., TRAUTE-HEIDI A. 1980. Compendium of soil fungi. Vol. I. Academic Press, London, 319-323.
- DONAGHY J., MCKAY A.M. 1992. Extracellular carboxylesterase activity of *Fusarium graminearum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 742-744.
- DUPRAT F., GALLANT D., GUILBOT A., MERCIER C., ROBIN J.P. 1980. L'amidon. In : "Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés", MONTIES B., Ed., Bordas, Paris. 176-231.
- DURAND G., MONSAN P. 1982. Les enzymes. Production et utilisations industrielles. Bordas, Paris. 347.
- FRANCO C.M.L., CIACCO C.F., TAVARES D.Q. 1987. Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack. Part 2 : Study of the granular structure of starch. *Starch/Stärke*, 39(1), 29-32.
- FUKUZAKI H., YOSHIDA M., ASANO M., KUMAKURA M. 1989. Synthesis of copoly(D,L-Lactic acid) with relatively low molecular weight and *in vitro* degradation. *Eur. Polym. J.*, 25(10), 1019-1026.
- GALLANT D., MERCIER C., GUILBOT A. 1972. Electron microscopy of starch granules modified by bacterial α -amylase. *Cereal chemistry*, 49(3), 354-365.
- GAUDY A.F., BLACHY T.R. 1985. A study of the biodegradability of residual COD. *J. of WPCF*, 57(4), 332-338.
- GILBERT P.A., WATSON G.K. 1977. Biodegradability testing and its relevance to environmental acceptability. *Tenside detergents*, 14(4), 171-177.
- GILMOR D.F., LOTTI N., LENZ R.W., FULLER R.C., SCANDOLA M. 1991. Biodegradability of blends of poly(3 - hydroxybutyrate - co - 3 - hydroxyvalerate) with ester - substituted celluloses. Proc. of 2th. Int. Sci. Workshop on biodegradable polymers and plastics, Montpellier, France, 251-254.
- GONSALVES K.E., CHEN X., CAMERON J.A. 1992. Degradation of nonalternating poly(ester-amides). *Macromolecules*, 25 (12), 3309-3312.
- GOTTSCHALK G., KNACKMUSS H.J. 1993. Bacteria and the biodegradation of chemicals achieved naturally, by combination, or by construction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 1398-1408.

- GRADY JR. C.P.L. 1985. Biodegradation : its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. and Bioeng.*, 27, 660-674.
- GRIZZI I., GARREAU H., LI S.M., VERT M. 1995. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials*, 16, 305-311.
- HERNANDEZ J.F., POURCHER A.M., DELATTRE J.M. 1993. MPN miniaturized procedure for the enumeration of faecal Enterococci in fresh and marine waters : the must procedure. *Wat. Res.*, 27(4), 597-606.
- HOCKING P.J. 1992. The classification, preparation and utility of degradable polymers. *J. of Mat. Sci. - Rev. Macromol. Chem. Phys.*, 32(1), 35-54.
- HOLLAND S.J., TIGHE B.J., GOULD P. 1986. Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *J. of Controlled Release*, 4, 155-180.
- HOU C.T. 1993. Screening of microbial esterases for asymmetric hydrolysis of 2-ethyl-hexyl butyrate. *J. of Industrial Microbiology*, 11, 73-81.
- HU D.S.G., LIU H.J., PAN L.L. 1993. Inhibition of bovine serum albumin adsorption by poly(ethylene glycol) soft segment in biodegradable poly(ethylene glycol)/poly(L-lactide) copolymers. *J. of Appl. Polymer Science*, 50, 1391-1396.
- HUANG J.C., SHETTY A.S., WANG M.S. 1990. Biodegradable plastics : a review. *Adv. in Polym. Technol.*, 10(1), 23-30.
- IMAM S.H., GOULD M. 1990. Adhesion of an amyolytic *Arthrobacter* sp. to starch-containing plastic films. *Appl. and Env. Microbiol.*, 872-876.
- IMAM S.H., BURGESS-CASSLER A., COTE G.L., GORDON S.H. 1991 a. A study of cornstarch granule digestion by an unusually high molecular weight α -amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. *Current Microbiology*, 22, 365-370.
- IMAM S.H., HARRY-O'KURU R.E. 1991 b. Adhesion of *Lactobacillus amylovorus* to insoluble and derivatized cornstarch granules. *Appl. and Env. Microbiol.*, 1128-1133.
- JARRET P., BENEDICT C.V., BELL J. P., CAMERON J.A. and HUANG S.J. 1983. Mechanism of the biodegradation of polycaprolactone. In : "Polymers as biomaterials", SHALABY S.W., HOFFMAN A.S., RATNER B.D. and HORBETT T.A. Eds., Plenum Publ. Corp., 181-192.
- JENDROSSEK D., KNOKE T., HABIBIAN R.B., STEINBUCHER A., SHLEGEL H.G. 1993. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of a novel PHB depolymerase from *Comamonas* sp. *J. of Environ. Polymer Deg.*, 1(1), 53-63.
- JOHNSON K.E., POMETTO III A.L., NIKOLOV Z.L. 1993. Degradation of degradable starch-polyethylene plastics in a compost environment. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 1155-1161.
- JUNGE W. 1984. Carboxylesterase. In : "Methods of Enzymatic Analysis. Volume IV.", BERGMAYER H.U., BERGMAYER J., GRABL M. Eds., Verlag Chemie, Weinheim, 2-8.

- KENLEY R.A., LEE M.O., MAHONEY T.R. II, SANDERS L.M. 1987. Poly(lactide-co-glycolide) decomposition kinetics *in vivo* and *in vitro*. *Macromolecules*, **20**, 2398-2403.
- KLECKA G.M., LANDI L.P. 1985. Evaluation of the OECD activated sludge, respiration inhibition test. *Chemosphere*, **14**(9), 1239-1251.
- KLEMCHUK P.P. 1990. Degradable plastics : A critical review. *Polymer degradation and stability*, **27**, 183-202.
- KNOWLES J.C., HASTINGS G.W. 1991. *In vitro* degradation of a PHB/PHV copolymer and a new technique for monitoring early surface changes. *Biomaterials*, **12**, 210-214.
- KOLATTUKUDY P.E. 1984. Cutinases from fungi and pollen. Dans : "Lipases", BORGSTROM B., BROCKMAN L. Eds., Elsevier Science Publishers, B.V., 473-503.
- KRICHELDORF H.R., JONTE J.M. 1983. New polymer synthesis. 8. Synthesis and polymerization of L-lactic acid O-carboxyanhydride (5-methyl-dioxola2,4-dione). *Polymer bulletin*, **9**, 276-283.
- KRONMAN M.J., HOLMES L.G. 1971. The fluorescence of native, denatured, and reduced denatured protein. *Photochem. Photobiol.*, **14**, 113-134.
- KULKARNI R.K., MOORE E.G., HEGYELI A.F., LEONARD F. 1971. Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *J. of Biomed. Mater. Res.*, **5**, 169-181.
- KUMAGAI Y., KANESAWA Y., DOI Y. 1992. Enzymatic degradation of microbial poly(3-hydroxybutyrate) films. *Makromol. Chem.*, **193**, 53-57.
- LARSON R.J. 1984. Kinetic and ecological approaches for predicting biodegradation rates of xenobiotic organic chemicals in natural ecosystems. In : "Current perspectives in microbial ecology". KHEG M.J., REDDY C.A. Eds., ASM Pub., Washington, 677-686.
- LEACH H.W., SCHOCH T.J. 1961. Structure of the starch granule. II. Action of various amylases on granular starches. *Cereal Chem.*, **38**, 34-46.
- LENZ R.W. 1993. Biodegradable polymers. *Adv. in Polymer Sci.*, **107**, 1-40.
- LI S.M., GARREAU H., VERT M. 1990 a. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 1 : Poly(DL-lactic acid). *J. of Mat. in Med.*, **1**, 123-130.
- LI S.M., GARREAU H., VERT M. 1990 b. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 2 : Degradation of lactide-glycolide copolymers : PLA37.5GA25 and PLA75GA25. *J. of Mat. in Med.*, **1**, 131-139.
- LI S.M., VERT M. 1994. Crystalline oligomeric stereocomplex as an intermediate compound in racemic poly(DL-lactic acid) degradation. *Polymer International*, **33**, 34-41.
- LIZARRAGA-PARTIDA M.L. 1979. Pseudomonades du milieu marin. Taxonomie polyphasique et écologie. Thèse de Doctorat, Université de Provence Aix-Marseille I,
- MAGEE R.S. 1989. Plastics in municipal solid waste incineration. In : "Technology overview for executives pre-conference", Plastics Institute of America, Inc., FOOD PLAS VI-89, Orlando, U.S.A.

- MAKINO K., OSHIMA H., KONDO T. 1986. Mechanism of hydrolytic degradation of poly (L-lactide) microcapsules : effects of pH, ionic strength and buffer concentration. *J. of Microencapsulation*, 3(3), 203-212.
- MARTINEZ C., DE GENS P., LAUWEREYS M., MATTHYSSENS G., CABBILLAU C. 1992. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, 356, 615-618.
- MATSUMARA S., YOSHIKAWA S. 1990. Biodegradable poly(carboxylic acid) design. In : "Agricultural and synthetic polymers. Biodegradability and utilization". GLASS J.E., SWIFT G. Eds. ACS, Washington D.C., 124-135.
- MCKAY A.M. 1993. Microbial carboxylic ester hydrolases (EC 3.1.1) in food biotechnology. *Letters in Appl. Microbiol.*, 16, 1-6.
- MEANS J.L., ANDERSON S.J. 1981. Comparison of five different methods for measuring biodegradability in aqueous environments. *Water, air and soil pollution*, 16, 301-315.
- MERGAERT J., WOUTER S.A., SWINGS J., KERSTERS K. 1991. Microbial flora involved in the biodegradation of poly(hydroxy alcanoates). Proc. of 2th. Int. Sci. Workshop on biodegradable polymers and plastics, Montpellier, France, 267-270.
- MÜLLER R.J., AUGUSTA J., PANTKE M. 1992. An interlaboratory investigation into biodegradation of plastics. Part 1: A modified Sturm-test. *Material und Organismen*, 27(3), 179-189.
- MÜLLER B., JENDROSSEK D. 1993. Purification and properties of poly(3-hydroxyvaleric acid) depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 487-492.
- NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., MARASAS W.F.O. 1983. *Fusarium* Species : An illustrated Manual for identification. The Pennsylvania State University Press., 128-130.
- NISHIDA H., TOKIWA Y. 1992. Distribution of poly(β - hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone) degrading microorganisms and microbial degradation behaviour on plastic surfaces. *Polymer Mater. Sci. Eng.*, 67, 137-138.
- NISHIDA H., TOKIWA Y. 1993. Distribution of poly(β -hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone) aerobic degrading microorganisms in different environments. *J. of Env. Polymer Deg.*, 1(3), 227-233.
- OBST U., HOLZAPFEL - PSCHORN A. 1988. Enzymatische tests für die wasseranalytik. OLDENBURG R. Eds., Verlag chimie, 36-45.
- O.E.C.D. 1981. Biodégradabilité dite facile. Essai de Sturm modifié. Ligne directrice pour les essais de produits chimiques (12 mai 1981/301 B).
- PALLERONI N.J. 1977. *Pseudomonas*. In : "Handbook of Microbiology. Vol. I", LASKIN A.I., LECHEVALIER H.A. Eds., CRC Press, Ohio, 247-258.
- PELCZAR M.J., REID R.D., CHAN E.C.S. 1982. Microbiología. Mc. Graw-Hill Ed., Mexico. 207-229.
- PENCZEK S., KUBISA P., MATYJASZEWSKI K. 1981. Cationic ring-opening polymerisation. *Polymers from cyclic esters*, 9, 177-185.

- PIETRASANTA Y. 1994. "Livre blanc sur le recyclage des matières plastiques", EREC, France, 27.
- PITTER P. 1976. Determination of biological degradability of organic substances. *Wat. Res.*, 10, 231-235.
- RAGHAVAN D., WAGNER G., WOOL R.P. 1992. Carbon balance during biodegradation of a polymer. *Polymer Matter Sci. Eng.*, 67,
- RAGHAVAN D., WAGNER G., WOOL R.P. 1993. Aerobic biometer analysis of glucose and starch biodegradation. *J. of Env. Polymer Deg.*, 1(3), 203-211.
- REED A.M., GILDING D.F. 1981. Biodegradable polymers for use in surgery poly(glycolic)/poly (lactic acid) homo and copolymers : 2. *In vitro* degradation. *Polymer*, 22, 494-498.
- REEVE M.S., MC CARTHY, S.P., DOWNEY M.J., GROSS R.A. 1994. Polylactide stereochemistry : effect on enzymatic degradability. *Macromolecules*, 27, 825-831.
- RHEE X.H., HANG J.H., ROGERS P.L. 1992. Production of copolymer consisting of 3-HB and 3-HV by fed-batch culture of *Alcaligenes* sp. SH - 69. *Biotechnol. Letters*, 15(4), 377-382.
- ROUSSOS S. 1982. Mise au point d'une méthode pour l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et nutritionnels des champignons imparfaits. *Cahiers ORSTOM, série Biol.* 45, 25-34.
- ROUSSOS S. 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse d'Etat, Université de Provence.
- ROUSSOS S., RAIMBAULT M., SAUCEDO-CASTAÑEDA G., VINIEGRA-GONZALEZ G., LONSANE B.K. 1991. Kinetics and ratios of carboxy-methyl cellulase and filter paper activities of the cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum* on different substrates in solid state fermentation. *Micol. Neotrop. Apl.*, 4, 19-40.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA G., TREJO-HERNANDEZ M.R., LONSANE B.K., NAVARRO J.M., ROUSSOS S., DUFOUR D., RAIMBAULT M. 1994. On-line monitoring and control system for CO₂ and O₂ concentrations in aerobic and anaerobic solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 29, 13-24.
- SATYANARAYANA D., CHATTERJI P.R. 1993. Biodegradable polymers : challenges and strategies. *J.M.S.-Rev. Macromol. Chem. Phys.*, 33(3), 349-368.
- SAWAN S.P., BARRY J.J. 1988. Quantification of poly(DL-lactic acid) degradation products by HPLC. *Polymer Prep.*, 29, 299-300.
- SCHAKENRAAD J.M., HARDONK M.J., FELJEN J. MOLENAAR I., NIEUWENHUIS P. 1990; Enzymatic activity toward poly(L-lactic acid) implants. *J. of Biomedical Materials Research*, 24,
- SCHINK B., JANSSEN P.H., FRINGS J. 1992. Microbial degradation of natural and of new synthetic polymers. *FEMS Microbiology Reviews*, 103(2-4), 311-316.

- SCHIRMER A., JENDROSSEK D., SCHLEGEL H.G., 1993. Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) (P(3HO)) by bacteria : purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Appl. and Env. Microbiol.*, 59(4), 1220-1227.
- SEBASTIAO M.J., CABRAL J.M.S., AIRES-BARROS. 1993. *Fusarium solani* pisi recombinant cutinase partitioning in PEG/potassium phosphate aqueous two-phase systems, *Biotechnol. Techniques*, 7(9), 631-634.
- TABAK H.H., QUAVE J.A., MASHNI C.I., BARTH E.F. 1981. Biodegradability studies with organic priority pollutant compounds. *J. WPCF.*, 53(10), 1503-1518.
- THERIN M., CHRISTEL P., LI S.M., GARREAU H., VERT M. 1992. *In vivo* degradation of massive poly (α -hydroxy acids) : validation of *in vitro* findings. *Biomaterials*, 13(9), 594-600.
- TIMMINS M.R., LENZ R.W. 1994. Enzymatic biodegradation of polymers : The polymers chemists' perspective. *TRIP*, 2(1), 15-19.
- TORRES A., ROUSSOS S., VERT M. 1993. Biodégradabilité de nouveaux matériaux plastiques, polymères de l'acide lactique : criblage de souches. In : Mémoires du Colloque "Le microorganisme, réactif chimique : bioconversion et biodégradation", Marseille, 25-26 Mars.
- TORSLOV J. 1993. Comparison of bacterial toxicity tests based on growth dehydrogenase activity, and esterase activity of *Pseudomonas fluorescens*. *Ecotoxicology and Environm. Safety*, 25(1), 33-40.
- VERT M. 1991. Biodégradables : réalités et perspectives. *Caoutchoucs et plastiques*, 706, 71-76.
- VERT M., LI S.M., GARREAU H. 1991. More about the degradation of LA-GA derived matrices in aqueous media. *J. of Controlled Release*, 16, 15-26.
- VERT M., LI S.M., SPENLEHAUER G., GUERIN P. 1992. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J. of Mat. Sci. : Materials in Medicine*. 3, 432-446.
- VERT M., GUERIN P. 1992. Des biosystèmes aux matériaux polymères : une utopie?. *Biofutur*, Juin, 52-57.
- VERT M., TORRES A., LI S.M., ROUSSOS S., GARREAU H. 1994. The complexity of the biodegradation of poly(α -hydroxy acid)-type aliphatic polyesters. Proc. of 3th. International Scientific Workshop on Biodegradable Plastics and Polymers, Osaka, Japan, 11-23.
- VION J.M., JEROME R., TEYSSIE P., AUBIN M., PRUD'HOMME R.E. 1986. Synthesis, characterization and miscibility of caprolactone random copolymers. *Macromolecules*, 19, 1828-1838.
- WILLIAMS D.F., MORT E. 1977. Enzyme-accelerated hydrolysis of polyglycolic acid. *J. of Bioeng.*, 1, 231-238.
- WOOL R.P., RAGHAVAN D. 1993. Biodegradation rates of polymer-starch blends in aquatic environments : effects of fractal structure. *A.C.S. Meeting at Chicago*, 1-7.

- WOOL R.P., RAGHAVAN D., BILLIEUX S., WAGNER G. 1993. Statics and dynamics of biodegradation in polymer-starch blends. Proc. of 2th. Int. Sci. Workshop on biodegradable polymers and plastics, Montpellier, France, 112-120.
- YAKABE Y., MORI E., HARA T., NOHARA K. 1992. Biodegradability of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) in activated sludge. *Chemosphere*, 25(6), 835-841.
- YAKABE Y., NOHARA K., HARA T., FUJINO Y. 1992. Factors affecting the biodegradability of biodegradable polyester in soil. *Chemosphere*, 25(12), 1879-1888.
- YASIN M., TIGHE B.J. 1992. Polymers for biodegradable medical devices. *Biomaterials*, 13(1), 9-16.
- YOUNG M.E. 1985. Relación entre la degradación de substrato insoluble y producción de enzima. In : "Biotecnología de enzimas", HUITTRON C., Ed., UNAM, Mexico, 139-152.
- ZHU J.H., SHEN Z.R., WU L.T., YANG S.L. 1991. *In vitro* degradation of polylactide and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J. of Appl. Polymer Sci.*, 43, 2099-2106.

ANNEXES

ANNEXE 1.- Composition des solutions de vitamines et d' oligoéléments

Solution de vitamines (mg/l) :		Solution d'oligoéléments (g/l):	
Biotine	20	FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0
Acide folique	20	MnSO ₄ .H ₂ O	1,6
Pyridoxine-HCl	100	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4
Thiamine-HCl	50	CaCl ₂	2,0
Riboflavine	50		
Acide nicotinique	50		
D-L Pantothénate de Ca	50		
Vitamine B12	1		
Acide PABA	50		
Acide lipoïque	50		

ANNEXE 2.- Fixation au glutaraldéhyde pour l'analyse au Microscope Electronique à Balayage

Composition du fixateur :

Composé	Quantité
Glutaraldéhyde à 25%	1 ml
Tampon cacodylate (16 g/l à pH 7,5)	4 ml
Eau distillée	1 ml

Les échantillons sont placés dans des paniers grillagés et immergés dans le fixateur pendant 12 h sous vide. Le bain de fixateur est renouvelé 2 fois à une demie heure d'intervalle avec mise sous vide, puis les échantillons sont rincés dans 2 bains de tampon cacodylate (avec mise sous vide de 10 mn entre chaque bain). Les échantillons sont ensuite portés 12 h sous vide dans du tampon cacodylate.

Suite à la fixation, on procède à la phase de déshydratation. Les échantillons sont transférés dans des bains successifs d'alcool de concentrations croissantes : 10, 20, 40, 60, 80, 95% et enfin dans de l'éthanol absolu. Pour chaque concentration, 2 bains avec mise sous vide d'une demie heure sont réalisés.

Les échantillons sont conservés dans de l'alcool absolu jusqu'à la métallisation à l'or réalisée à l'Université de Montpellier II. L'opération de métallisation des structures est réalisée après élimination totale de l'alcool. Pour ce faire, les petits paniers contenant les échantillons sont introduits dans un appareil à déshydratation par la méthode du point critique. Du CO₂ liquide recouvre les échantillons et remplace totalement l'alcool. A pression atmosphérique, le CO₂ est dégazé et les échantillons desséchés sont prêts pour la métallisation. Ceux-ci sont déposés sur du ruban adhésif double face et montés sur des plots disposés dans un appareil à pulvérisation cathodique. Une fine pellicule d'or d'environ 200-250 Å se dépose alors et les préparations deviennent conductibles (Polaron, Modèle E 5000).

Les échantillons sont alors prêts pour l'observation au MEB.

ABSTRACT

Poly(lactic acid) (PLA) is one of the new degradable polymers synthesized recently. The monomer unit of PLA is a compound that can be easily assimilated by the normal biochemical pathways. Nevertheless, PLA biological degradation mechanisms are not well understood until now. We studied the activity of two microorganisms, a filamentous fungi (*Fusarium moniliforme*) and a bacteria (*Pseudomonas putida*), on two kind of PLA oligomers : a racemic one and a L-pure form one.

Oligomers were synthesized by direct polycondensation of a concentrated lactic acid solution. Degradation rate was measured by chromatographic analysis after total alkaline hydrolysis. Esterase activity assessment was made by fluoresceine diacetate hydrolysis. It was noted that the mixed culture of two microorganisms accelerated racemic oligomers degradation by means of a complex enzymatic system. L-pure form PLA oligomers are not degraded in a significant way by these microorganisms.

We also analysed the degradation of high molecular weight polymers in the bulk state. PLA synthesis was made by ring opening polymerization. Molecular weight was evaluated by size exclusion chromatography. Polymer morphologie was assessed by differential thermic analysis and by Rx diffraction. Results showed that the presence of microorganisms increased the degradation rate, but it is difficult to distinguish between chemical and biological hydrolysis.

Finally, we used scanning electron microscopy to examine PLA plates degradation after soil burial and laboratory incubation. We observed some mycelium growth not only at the surface of plates, but also into the mass. It was noted that this growth was presented only after a long period of chemical degradation.

It was then concluded that lactic acid polymers at the bulk state may be considered as bioassimilable and not as biodegradable materials. This means that PLA would degrade by microorganisms only after some extent of chemical degradation, once residual products are formed.

RESUME

Parmi les polymères dégradables qui existent actuellement, nous retrouvons les poly(acide lactique) (PLA) dont l'unité monomère est un métabolite facilement assimilable par les voies biochimiques naturelles. Cependant, les mécanismes de dégradation biologique de ce type de polymères sont mal connus. Nous avons étudié l'action de deux microorganismes, un champignon filamenteux (*Fusarium moniliforme*) et une bactérie (*Pseudomonas putida*), sur deux oligomères de PLA : un racémique et un ayant une composition de 100% d'unités L-lactique.

Les oligomères ont été obtenus par polycondensation directe d'une solution concentrée d'acide lactique. L'analyse de la dégradation a été réalisée par hydrolyse alcaline totale des oligomères résiduels et ensuite par quantification chromatographique (HPLC). Il a été observé que la culture mixte des deux microorganismes accélère la dégradation des oligomères racémiques grâce à une complémentarité des systèmes enzymatiques. Par contre, les oligomères à 100% d'unités L sont difficilement dégradés par ces microorganismes. La dégradation des oligomères a été reliée à une activité estérasique du surnageant des cultures. Cette activité a été dosée par l'hydrolyse du diacétate de fluorescéine.

Nous avons également étudié la dégradation d'un polymère racémique de hautes masses molaires à l'état massif. La polymérisation a été réalisée par ouverture du cycle lactide, en présence du Zinc. La caractérisation du produit a été effectuée par chromatographie par exclusion de taille, par analyse thermique différentielle et par diffraction des Rayons X. Les résultats ont montré que la présence des microorganismes accélère la dégradation des plaques massives, mais qu'il est difficile de distinguer entre la dégradation purement chimique et l'attaque par des enzymes microbiennes.

Enfin, par microscopie électronique à balayage, nous avons examiné la dégradation des plaques enfouies d'abord dans un site naturel et mises ensuite en culture dans des conditions contrôlées au Laboratoire. Du mycélium d'un ou de plusieurs champignon filamenteux a été observé non seulement adhérent à la surface, mais incrusté dans le réseau polymère. Toutefois, ce développement microbien n'a été détecté qu'après un certain temps de dégradation.

Nous avons ainsi conclu que les polymères de l'acide lactique à l'état massif sont bio-assimilables, c'est-à-dire, que ces polymères ne peuvent se dégrader dans les milieux naturels qu'à partir d'un degré avancé de dégradation chimique, lorsque des résidus (oligomères) sont formés.