UNIVERSITE MONTPELLIER I

UNITES DE FORMATION ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES

ETUDE DE LA DEGRADATION DE POLYESTERS DE TYPE POLY(ACIDE LACTIQUE) EN PRESENCE DE VERS DE TERRE

Thèse présentée pour obtenir le grade de:

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

ECOLE DOCTORALE : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

FORMATION DOCTORALE : Interface Chimie-Biologie

N° DISCIPLINE : 50 N° DE SECTION CNU : 33

SPECIALITE : Chimie des Matériaux

PAR

NATHALIE ALAUZET

Soutenue le 22 Octobre 1999

JURY :

M. Marcel BOUCHE	Directeur de Recherche, INRA Montpellier, Examinateur
M. Emo CHIELLINI	Professeur, Université de Pise, Rapporteur
M. Henri GARREAU	Professeur, Université Montpellier I, Directeur de thèse
M. Sevastianos ROUSSOS	Directeur de Recherche, IRD Marseille, Rapporteur
M. Michel VERT	Directeur de Recherche au CNRS, Examinateur

Mai 1999

UNIVERSITE MONTPELLIER I

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE MONTPELLIER I : Président Professeur Alain UZIEL

FACULTE DE PHARMACIE : Doyen Professeur Jean-Louis CHANAL

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Directeur : Professeur Jean-Louis CHANAL

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE EN MATIERE ALIMENTAIRE OENOLOGIE-ENVIRONNEMENT

Directeur : Professeur Jean-Claude CABANIS

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DE PHARMACIE INDUSTRIELLE

Directeur : Professeur Jean-Pierre BALI

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M	ANDARY	Claude	Botanique et Cryptogamie
M.	AUDRAN	Michel	Physique et Biophysique
M.	BALI	Jean-Pierre	Biochimie générale et Clinique
M.	BASTIDE	Jean-Marie	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
M.	BERLAN	Jacques	Hématologie
M.	BONNE	Claude	Physiologie
M.	BONNET	Pierre	Chimie Organique
M.	BONTOUX	Jean	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	BOUDEVILLE	Philippe	Chimie Générale et Minérale
Mme	BRES	Janine	Pharmacocinétique
M.	CABANIS	Jean-Claude	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	CANO	Jean-Paul	Toxicologie
Mme	CASSANAS	Geneviève	Physique Industrielle et Traitement de l'Information
M.	CASTEL	Jean	Chimie Thérapeutique
M.	CHANAL	Jean-Louis	Physique et Biophysique
M.	CHAPAT	Jean-Pierre	Chimie Organique
M.	CROS	Gérard	Pharmacologie
M.	DELARBRE	Jean-Louis	Physique Moléculaire et Structurale
M.	DELONCA	Henri	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	DOREE	Marcel	Biologie Cellulaire
M.	ESCALE	Roger	Chimie Organique
Mlle	FABRE	Huguette	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	FULCRAND	Pierre	Chimie Thérapeutique
M.	GELIS	Christian	Physique et Biophysique
M.	GIAIMIS	Jean	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
M.	GORENFLOT	André	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	GRASSY	Gérard	Chimie Organique
M.	GRIMMONPREZ	Louis	Biochimie Générale et Clinique
M.	JACOB	Maurice	Pharmacie Galénique
Mme	JULLIEN	Magali	Milieux denses et matériaux
Mme	MAILLOLS	Hélène	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mme	MALLIE	Michèle	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
Mlle	MANDROU	Bernadette	Chimie Analytique
M.	MAURY	Luc	Physique Moléculaire et Structurale
M.	MICHEL	A lain	Pharmacologie
M.	MODAT	Guy	Physiologie
Mme	MONLEAUD	Jacqueline	Droit et Economie de la Santé

.../...

M.	PAU	Bernard	Immunologie
M.	PELLECUER	Jacques	Pharmacognosie
Mme	PICOT	Bernadette	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	RAMBAUD	André	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	ROBBE	Yves	Chimie Organique
M.	ROSSI	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	ROUSSEL	Jean-Louis	Botanique et Cryptogamie
M.	SERRANO	Jean-Jacques	Pharmacologie
Mme	SIMEON DE BUOCHBERG	Michèle	Bactériologie et Virologie
Mlle	SOLERE	Maryse	Biochimie Générale et Clinique
M.	TEROL	Alain	Chimie Générale et Minérale

MAITRES DE CONFERENCES

M.	ALBEROLA	Serge	Chimie Générale et Minérale
Mme	ARTIS	Anne-Marie	Chimie Thérapeutique`
M.	AUSSEL	Paul	Physique et Biophysique
Mlle	AZAY	Jacqueline	Pharmacologie
M.	BATAILLE	Bernard	Pharmacie Galénique
M.	BEGEL	Michel	Didactique Physiologie
M.	BELON	Charles	Biochimie Générale et clinique
M.	BERGE	Gilbert	Chimie Thérapeutique
Mme	BILAK	Estelle	Bactériologie et Virologie
M.	BLACHE	Yves	Chimie Organique
M.	BLAISE	Alain	Chimie Analytique et Bromatologie
Mlle	BLANCHIN	Marie-Dominique	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	BOMPART	Jacques	Chimie Organique
M.	BOUDARD	Frédéric	Immunologie
Mme	BOURRET	Evelyne	Physique Moléculaire et Structurale`
Mlle	BRESSOLLE	Françoise	Pharmacocinétique
Mme	CABANIS	Marie-Thérèse	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	CARCY	Bernard	Biologie Cellulaire et Moléculaire`
Mme	CASADEBAIG	Jacqueline	Pharmacie Galénique
Mme	CASELLAS	Claude	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
Mme	CASTEX	Françoise	Immunologie
Mme	CHARLOT	Colette	Chimie Analytique et Bromatologie
Mlle	CHATEAU	M. Thérèse	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	CHAUVET	Alain	Chimie Générale et Minérale
Mlle	CHOQUET	Armelle	Toxicologie
Mme	COCIGLIO	Marylène	Pharmacologie
Mlle	COHEN	Pascale	Immunologie
M.	COOPER	Jean-François	Chimie Analytique et Bromatologie
Mme	COSSON	Laurence	Botanique et Cryptogamie
M.	COUDANE	Jean	Chimie des Matériaux
Mlle	COURET	Isabelle	Biophysique
M.	CRASSOUS	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	CUQ	Pierre	Toxicologie
M.	DARMANADEN	Roland	Chimie Thérapeutique
M.	DEVOISSELLE	Jean-Marie	Technique Pharmaceutique Industrielle`
M.	DURU	Christian	Pharmacie Galénique
Mlle	DUSART	Ghislaine	Bactériologie et Virologie
M.	ENGEL	Robert	Chimie des Matériaux
Mlle	ENJALBERT	Françoise	Botanique et Cryptogamie
Mme	FABREGUE	Eliane	Physique Industrielle et traitement de l'Information
Mlle	FENET	Hélène	Chimie Analytique et Bromatologie
Mme	FLORAC	Marie-Elisabeth	Botanique et Cryptogamie
Mme	FOURCROY	Stella	Physiologie

.../...

Mme	FOURNAJOUX	Josyane	Physique et Biophysique
M.	GAGNE	Didier	Biochimie Générale et Cliniqu
M.	GALLEYRAND	Jean-Claude	Physique et Biophysique
M.	GARREAU	Henri	Chimie des Matériaux
Mmee	GOZE	Catherine	Chimie Thérapeutique
M.	GRIS	Jean-Philippe	Hématologie
Mme	GUIBAL	Jacqueline	Immunologie
Mme	GUIBERT	Marie-Sophie	Physique et Biophysique
Mme	GUIDICELLI	Claudette	Physique et Biophysique
Mlle	HANSEL	Sylvie	Pharmacie Clinique
Mme	ILLES	Suzanne	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	JEANJEAN	Bernard	Chimie Générale et Minérale
Mme	LACOSTE	Anne-Marie	Bactériologie et Virologie
M.	LAGET	Jean-Pierre	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	LARROQUE	Michel	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	LASSERRE	Yves	Pharmacie Galénique
Mlle	LAURENT	Florence	Pharmacologie
Mme	LIUTKUS	Martine	Pharmacologie
Mme	MARION	Chantal	Pharmacognosie
Mme	MENAGE	Karina	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	MESTRES	Jean-Paul	Chimie Analytique
Mme	MESTRES	Gilberte	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	MILHAVET	Jean-Claude	Chimie Organique
Mme	MULLER	Agnès	Physiologie
Mme	NIELLOUD	Françoise	Technique Pharmaceutique Industielle
Mlle	NURIT	Josiane	Chimie Générale et Minérale
M.	PELISSIER	Yves	Pharmacognosie
M.	PERSONNE	Christian	Bactériologie et Virologie
Mme	PHAM	Tuyet Nga	Physique et Biophysique
M.	POUCHERET	Patrick	Pharmacologie
M.	PRECIGOUT	Eric	Biologie Cellulaire et Moléculaire
Mme	RAMBAUD	Joëlle	Chimie Générale et Minérale
Mlle	RAPIOR	Sylvie	Botanique et Cryptogamie
M.	RASCOL	Jean-Pierre	Botanique et Cryptogamie
M.	RAYNAUD	Eric	Biochimie
M.	SABATIER	Robert	Physique Moléculaire et Structurale
Mme	SALHI	Sharon	Immunologie
Mme	SOULIE	Marie-Louise	Biochimie générale et Clinique
Mme	SUSPLUGAS	Claudine	Pharmacognosie
M.	SUSPLUGAS	Paul	Pharmacognosie
M.	TEISSEDRE	Pierre-Louis	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	VALENTIN	Alexis	Parasitologie et Mycologie Médicale
Mlle	VIAN	Laurence	Toxicologie
Mlle	VIE	Marie-Thérèse	Physique et Biophysique
Mme	VIVERGE	Danièle	Biochimie générale et Clinique

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Michel Vert, non seulement pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, mais aussi et surtout parce que sans lui, ce travail n'aurait pu ni commencer, ni surtout continuer, et encore moins finir. Je lui suis infiniment reconnaissante de m'avoir encouragée, moralement, scientifiquement et financièrement, tout le long de ces quatre années. Je dois aussi le remercier de m'avoir permis de passer un fabuleux séjour au Japon à l'occasion d'un stage pour cette thèse.

Tout naturellement je remercie aussi mon chauffeur-secrétaire-informaticien-traducteur-réparateur de vélo-dépanneur en tout genre, et aussi directeur de thèse : j'ai nommé Henri Garreau, l'indispensable et toujours disponible (à condition de le trouver....). Je ne compte plus les innombrables services qu'il a pu me rendre. C'est de plus grâce à lui que j'ai pu m'initier à la chimie des polymères : synthèse, mise en forme et dégradation. Il m'a aidée et conseillée tout le long de mon travail.

Ma reconnaissance à Sévastianos Roussos, non seulement pour avoir accepté d'être dans mon jury de thèse, mais aussi pour son aide précieuse concernant la partie "microbiologie" de mon travail. Je souhaite lui exprimer toute ma gratitude pour sa gentillesse et sa compréhension, et pour son constant soutien.

Je remercie aussi Marcel Bouché pour avoir co-dirigé cette thèse et m'avoir acceptée dans son laboratoire. Je le remercie de m'avoir fait profiter de sa grande érudition concernant les vers de terre et divers autres sujets.

Merci à Emo Chiellini d'avoir accepté d'être dans mon jury de thèse.

Je tiens à remercier Bernard Delay pour m'avoir accueillie au sein du CEFE pour la majeure partie de ma thèse, et Maryse Gautier pour son aide toujours efficace.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à Roxana Ruseckaite, qui a été d'une aide inestimable pour la synthèse et la manipulation de produits radioactifs, ainsi qu'à Jean-Louis Morgat pour son aide.

Je souhaite aussi remercier Dominique Domurado, Jacques Cortez et M. Billès pour leurs conseils fructueux et leur aide.

Un grand merci à Jiang-Ping Qiu pour son aide précieuse, sur le plan pratique et aussi théorique, pour ses conseils et son amitié. Je lui suis vraiment reconnaissante pour son soutien et pour m'avoir initiée à la culture chinoise.

Merci aussi à ceux qui m'ont apporté leur aide et leur amitié pendant toutes ces années : Françoise Lenoir, Isabelle dos Santos, Katarina Marcincinova, Caroline Tirco, Corinne Hoff, Kathy Kurz, Francesca Logli, Alvaro de Araujo, Marlene Soares, Nabil ben Omar, Pepe, Romina, sans oublier le défunt José Augusto Florencio, accidentellement disparu en Juillet 1999.

Je remercie aussi les personnes suivantes qui m'ont beaucoup aidée pour l'utilisation de techniques ou d'appareillage particulier:
Christian Braud (HPCE), Sylvie Hunger (GPC), Abdul Motalib Abdul Rida (tests écotoxicologiques), Ghania Ouahrani et Chantal Debain (dissection de ver de terre), Christelle (identification des champignons), Patricio Soto (informatique).

Je remercie Jean-Pierre Guyot de m'avoir accueillie dans son laboratoire de Biotechnologie, et surtout Nathalie Pujet qui a toujours été une aide précieuse pour mon séjour à l'IRD. Merci aussi à Juliette Guyot, Frédéric Ampe, Jesus Cordova, Eric Giraud, Sylvain Denis et Pierre Christen pour leur sympathique collaboration.

Merci à toute l'équipe du CRBA, Sylvie Tixier, Muriel ElKaim et Xavier Dumont pour leur aide en toutes circonstances, et aussi à Muriel Stéfani, Grégoire Schwach, Anne-Claude Couffin, Didier Hoarau, Joëlle Rietzler-Locardel, Su-Ming Li, Tae-Kyoung Kim, Hervé Menendez, Robert Engel (surtout pour les ciseaux, pompes à vélo et sacs de couchage en tous genres), Martine Domurado, Mahfoud Boustta, et tous ceux qui, comme moi, n'ont fait que passer.

Enfin, "last but not least", je tiens absolument à remercier le professeur Yoshiharu Doi de m'avoir accueillie pour un stage dans son laboratoire au Japon, ainsi que Tadahisa Iwata qui m'a aidée pendant ce stage. Toutes les personnes du Polymer Chemistry Lab. : Sudesh Kumar, Abe-san, Uefuji-san, Kusaka-san, Ohkoshi-san, Ogawa-san, Tanaka-san, Hisano-san, Furuhashi-san, et toutes les autres dont j'ai oublié le nom (gomen nasai...), ainsi que les personnes que j'ai rencontrées là-bas, particulièrement Aiko Maeoka et Rie Kuwana ont rendu mon séjour au pays du soleil levant absolument enchanteur (le mot n'est pas trop fort). Je les remercie tous de tout mon coeur.

Pour finir, ma plus sincère gratitude à toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien pendant ces quatre années.

ABREVIATIONS ET SIGLES

CL 50	concentration létale donnant 50% de mortalité
PEG	poly(éthylène glycol)
pF	point de flétrissement
artisol	sol artificiel à base de Lévilite
OLA	oligomères d'acide lactique
PLA	polymères d'acide lactique
BMM	basses masses molaires
HMM	hautes masses molaires
FAA	milieu conservateur à base de formol, d'alcool et d'acide acétique
MWCO	molecular weight cut off = taille du tamis moléculaire, en Da
T_v	température de transition vitreuse
T_f	température de fusion
T_c	température de cristallisation
$\overline{Mn}$	masse molaire moyenne en nombre
$\overline{Mp}$	masse molaire moyenne en poids
RAS	radioactivité spécifique
SEC	chromatographie d'exclusion stérique
HPCE	électrophorèse capillaire de zone
DSC	calorimétrie différentielle à balayage
DPM	désintégration par minute
nCi	nanoCurie

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5

I.1. LE LOMBRICOMPOSTAGE 5

I.1.1. Généralités sur les vers de terre 5

I.1.2. Eisenia fetida et Eisenia andrei 7

I.1.3. Le compostage 8

I.1.4. Le lombricompostage 9

I.2. INGESTION ET DIGESTION PAR LES LOMBRICIENS 12

I.2.1. Tube digestif des lombriciens 12

I.2.2-Sapidité 15

I.2.3-Relations lombriciens/microorganismes 16

I.2.4-Enzymes des lombriciens 20

I.3. LES POLYMÈRES D'ACIDE LACTIQUE 21

I.3.1. Généralités sur les polymères 21

I.3.2. Les polymères dégradables et biodégradables 23

I.3.3. Structure et synthèse des PLA 25

I.3.4. Dégradation, biodégradation et bioassimilation des PLA 27

a) Dégradation chimique 28

b) Dégradation ou biodégradation enzymatique 30

c) Bioassimilation microbienne 32

I.4. COMPOSTAGE ET LOMBRICOMPOSTAGE DES PLA ET DES "PLASTIQUES" 33

I.5-TESTS ET NORMES RELATIFS À LA DÉGRADATION ET À LA BIODÉGRADATION DES "PLASTIQUES" 36

I.5.1. Normes faisant intervenir des micro-organismes 37

I.5.2. Normes faisant intervenir les vers de terre 41

I.6. CONCLUSION DE L'ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 43

CHAPITRE II: ETUDES PRÉLIMINAIRES. LES VERS PEUVENT-ILS INGÉRER LES PLA ET LEURS PRODUITS DE DÉGRADATION ? 45

II.1 LES PLA ET LEURS PRODUITS DE DÉGRADATION SONT-ILS TOXIQUES VIS-À-VIS DES VERS DE TERRE ? 46

II-1-1 Choix des conditions expérimentales 46

II-1-2- Résultats 48

II-1-2-1 Acide lactique 49

II-1-2-2 OLA 100 50

II-1-2-3 PLA 50 50

II-1-3- Conclusion 51

II.2 LES VERS SONT-ILS CAPABLES D'INGÉRER LES PLA ET LEURS PRODUITS DE DÉGRADATION ? 51

II-2-1 Matériel et méthodes 51

II-2-1-1 Matériel 51

II-2-1-2 Méthode d'imprégnation 52

II-2-1-3 Méthode d'étalement 52

II-2-1-4 Tests d'ingestion 52

II-2-2 Résultats-discussion 52

II-2-2-1 OLA 100 53

II-2-2-2 PLA 50 54

II-2-3 Conclusion 54

CHAPITRE III: DÉGRADATION DANS DIFFÉRENTS MILIEUX MODÈLES EN L'ABSENCE DE VERS DE TERRE 56

III-1 ETUDES DE DÉGRADATION HYDROLYTIQUE DE PLA EN TAMPON PHOSPHATE 57

III-1-1 Matériel et méthodes 57

III-1-2 Résultats de dégradation du PLA 50 58

III-1-3 Résultats de dégradation de PLA 96 63

III-2 ETUDE DE DÉGRADATION EN COMPOST MODÈLE 67

III-2-1 Résultats de la dégradation du PLA 50 en compostage modèle 71

III-2-2 Résultats de la dégradation du PLA 96 en compostage modèle 72

III-3 ETUDE DE LA DÉGRADATION DE PLA EN BIOSYNTHÉSOL 74

III-1 Mise au point du biosynthésol 74

III-3-2 Résultats de la dégradation d'OLA 50 en biosynthésol *78*

III-4 CONCLUSIONS **79**

CHAPITRE IV: LES VERS DE TERRE SONT-ILS CAPABLES DE BIOASSIMILER LE PLA ET SES PRODUITS DE DÉGRADATION ? **81**

IV-1 INFLUENCE DE LA PRÉSENCE DE VERS DE TERRE SUR LA DÉGRADATION DE PLA EN LOMBRICOMPOSTAGE MODÈLE ET EN BIOSYNTHÉSOL **82**

IV-1-1 Dégradation en lombricompostage modèle *82*

IV-1-2 Dégradation en biosynthésol *85*

IV-1-4 Conclusion sur la dégradation *87*

IV-2 UTILISATION DES PLA ET DE LEURS PRODUITS DE DÉGRADATION COMME SEULE SOURCE DE CARBONE PAR LES VERS DE TERRE **87**

IV-2-1 Mise au point de l'expérimentation *88*

IV-2-2 Application de la méthode aux composés de type PLA *93*

IV-2-3 Conclusions *96*

CHAPITRE V: SUIVI DU DEVENIR D'OLA SOUMIS À L'ACTION DES VERS DE TERRE-UTILISATION D'OLA RADIOACTIF **98**

V-1 MATÉRIEL **99**

V-2 PRÉPARATION DU MONTAGE **100**

V-3 SUIVI ET DOSAGE DE $^{14}CO_2$ **101**

V-4 SUIVI DU DEVENIR DE L'OLA 50 DANS LES LOMBRICIENS **103**

V-5-CONCLUSION **103**

CHAPITRE VI: EVOLUTION DE LA MICROFLORE EN LOMBRICOMPOSTAGE AVEC OLA 50 ET 96 ..... **107**

VI-1- DÉNOMBREMENT DE LA MICROFLORE ÉPIDERMIQUE **107**

VI-2 DÉNOMBREMENT DE LA MICROFLORE DES FÈCES DE VERS DE TERRE ET DANS LE BIOSYNTHÉSOL TÉMOIN SANS VER **108**

VI-2-1 Prélèvement des fèces *109*

VI-2-2 Prélèvement dans le biosynthésol témoin sans ver *109*

VI-2-3 Ensemencement des dilutions *109*

VI-2-3 Résultats des dénombrements de la microflore totale en biosynthésol sans lombricien et dans les fèces des lombriciens *108*

VI-3 IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS ISOLÉS DU BIOSYNTHÉSOL ET DES FÈCES DE VERS DE TERRE **113**

VI-3 CONCLUSION **117**

CONCLUSION GENERALE **118**

PARTIE EXPÉRIMENTALE **120**

PE-I MATÉRIEL BIOLOGIQUE **120**

PE-I-1- Description d'E.andrei *120*

PE-I-2- Milieu d'élevage des vers *121*

PE-II MATÉRIEL CHIMIQUE **121**

PE-II-1 Synthèse du PLA 50 et 96 ..... *121*

PE-II-1-1- Polycondensation directe d'acide lactique *122*

PE-II-1-2- Polymérisation par ouverture de cycle *122*

PE-II-2- Mise en forme du PLA, extrusion et fabrication de tigettes *123*

PE-II-3- Analyse du PLA par SEC *124*

PE-II-4- Analyse des produits de dégradation du PLA en électrophorèse capillaire de zone *125*

PE-II-5- Analyse de la perte de poids et de l'absorption d'eau *126*

PE-II-6- Examen visuel de la dégradation des fils de PLA *126*

PE-II-7- Analyse du PLA par analyse thermique différentielle *126*

PE-III- AJUSTEMENT DU pF POUR DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ DES SUBSTANCES VIS-À-VIS DES VERS DE TERRE (D'APRÈS BOUCHÉ ET ALIAGA, 1986) **126**

PE-IV UTILISATION DU BIOSYNTHÉSOL **128**

PE-IV-1- Suivi du pH des différents biosynthésols *128*

PE-IV-2- Inoculation du biosynthésol *128*

PE-IV-3- Méthode de séparation-extraction des oligomères insolubles et solubles, purification des oligomères *128*

PE-IV-4- Méthode de mélange des oligomères avec la lévilite *128*

PE-IV-5- Détermination du poids des vers de terre dans du biosynthésol *129*

PE-VI-6- Dosage du OLA et de l'acide lactique restant *129*

PE-V- ETUDE DE LA BIOASSIMILATION DES OLA À L'AIDE D'OLA RADIOACTIF **130**

PE-V-1- Synthèse d'OLA 50 radioactif *130*
PE-V-2- Détermination de la masse molaire d'OLA 50 radioactif par alcalimétrie *131*
PE-V-3- Détermination de la radioactivité spécifique *131*
PE-V-4- Comptage de la radioactivité en scintillation liquide *131*
PE-V-5- Ouverture de la face ventrale des vers de terre *131*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **132**

ANNEXES **142**

TABLE DES ILLUSTRATIONS **148**

Introduction

Introduction

La production mondiale annuelle des matériaux organiques de synthèse dits communément "plastiques" atteint 100 millions de tonnes, dont plus de la moitié est utilisée en Amérique du Nord et en Europe. Ces matériaux sont largement employés en raison de leurs propriétés physico-chimiques intéressantes. Ils sont résistants, chimiquement inertes et bon marché. Cependant la stabilité chimique et l'imputrescibilité de ces matériaux plastiques, pour la plupart d'origine synthétique, posent le problème de leur élimination après usage, en particulier pour les plastiques d'emballage dont la durée d'utilisation est très courte. Diverses solutions sont actuellement possibles :

-le stockage en décharge : c'est un mode palliatif pour les déchets plastiques collectés, mais il a divers inconvénients. Ces décharges prennent beaucoup de place sans résoudre le problème de l'élimination réelle des déchets. De plus les déchets entreposés polluent les sols et les eaux souterraines (nappe phréatique,...). Ce mode de « traitement » qui n'en est en fait pas un, va être fortement réduit voire interdit à partir de 2002, date à partir de laquelle seuls les déchets ultimes (ni dégradables, ni recyclables) seront admis en décharge. Les plastiques ne faisant pas partie de cette catégorie de déchets ultimes, leur mise en décharge devrait être exclue à court terme,

-l'incinération : elle restitue une partie de l'énergie mais produit des poussières et des résidus, voire des produits toxiques ou corrosifs (HCl ou dioxine dans le cas du PVC, poly(chlorure de vinyle)) qu'il faut ensuite éliminer. Les produits gazeux sont difficilement contrôlables,

-le recyclage matière : ce moyen pourrait être intéressant mais conduit systématiquement à des produits de qualité inférieure (en particulier lorsque les plastiques sont mélangés entre eux, la plupart des polymères courants étant non-miscibles pour des raisons thermodynamiques). Les plastiques ne peuvent pas être indéfiniment recyclés et il faudra un jour ou l'autre les éliminer.

-le recyclage chimique: il consiste en une dépolymérisation ou une pyrolyse, deux procédés relativement peu rentables.

Une autre possibilité de traitement existe, à condition que le déchet à traiter s'y prête : le compostage, voire le lombricompostage. Un compost est un mélange de déchets solides subissant une fermentation aérobie caractérisée par un échauffement naturel de la masse. Un lombricompostage est une décomposition aérobie, à température inférieure à 30°C, faisant intervenir des micro-organismes et des lombriciens. Cette phase est précédée, pour des déchets organiques, d'une phase thermophile de compostage (jusqu'à 75°C). Au niveau industriel, ces 2 phases sont précédées d'une phase de tri physique (tri manuel, tri

magnétique,...), et suivies d'une phase d'affinage (séparation des inertes et des fèces). L'ensemble de ces opérations porte le nom de "lombri-polytechnique" (Bouché, comm. pers.). Or pour qu'une matière soit compostable elle doit être « biodégradable » au sens général du terme (dégradables par des êtres vivants), ce qui n'est pas le cas des matériaux plastiques traditionnels.

Des recherches sur les plastiques biodégradables sont déjà lancées aux USA et au Japon, alors que l'Europe a longtemps préféré le recyclage et l'incinération. La biodégradation paraît à première vue la solution idéale à long terme, à condition d'être compatible avec la conservation des avantages économiques et techniques des plastiques de grande consommation.

La dégradation peut être obtenue entre autres lorsque des liaisons hydrolysables, comme des liaisons esters aliphatiques, se trouvent dans la macromolécule. C'est le cas des polyesters aliphatiques qui sont les polymères les plus étudiés de ce point de vue.

Parmi la famille des polyesters aliphatiques, on trouve les poly-β-hydroxyalcanoates, souvent désignés improprement par le signe PHA, parmi lesquels figure le PHB (poly-β-hydroxybutyrate). Ce polymère est très lentement hydrolysable mais biodégradable rapidement car il est obtenu par polymérisation bactérienne et est donc d'origine naturelle. La bactérie *Rhodobacter sphaeroides* et quelques autres (*Pseudomonas*,...) le produisent et l'utilisent comme réserve de nourriture en cas de stress nutritionnel. Il peut être dépolymérisé par des bactéries et des champignons. Le poly(acide lactique) ou PLA fait partie de la famille des PHA; il appartient au sous-groupe des poly(α-hydroxyacide)s. Contrairement au PHB, il n'est pas biodégradable dans le sens dégradation par les micro-organismes. Par contre il est hydrolysable. Ce sont ses produits de dégradation qui sont assimilables (il est donc bioassimilable au sens de Vert et Guérin, 1992).

L'autre intérêt du PLA est que, grâce aux progrès dans la fermentation bactérienne du glucose obtenu à partir de maïs, il est maintenant possible d'obtenir de l'acide lactique beaucoup moins cher et donc d'envisager la synthèse de PLA économiquement compétitif à l'échelle commerciale. Jusqu'en 1994, les seules applications des PLA étaient biomédicales. Entre autres, Ethicon utilise depuis 1972 des fibres à base d'acide lactique et glycolique pour sutures chirurgicales, et Phusis, en France, commercialise des implants chirurgicaux à base d'acide lactique uniquement. Or, depuis quelques années, grâce à la baisse du coût de l'acide lactique et surtout d'importants efforts d'ingénierie chimique, de grandes entreprises comme

Cargill, Neste, Shimadzu ou Mitsui ont entrepris d'étendre l'application des PLA au domaine des matériaux à grande diffusion ou "de commodité" (emballage, couchage du papier, films de paillage, couches culottes,...). De nombreux produits à base de PLA sont actuellement développés. Le plus compétitif sur le plan économique semble être l'EcoPLA de Dow-Cargill. L'application du PLA au domaine de l'emballage à usage unique stimule l'intérêt de l'étude de sa dégradabilité et de sa bioassimilation.

Il existe de nombreuses études sur la dégradation hydrolytique des PLA. On doit à Li *et al.* (1990a, b, c) la description la plus complète de la dégradation hydrolytique à 37°C de différentes sortes de PLA. Le principe de base est une hydrolyse chimique qui libère des oligomères hydrosolubles. Torres *et al.* (1996a) ont démontré que, contrairement au polymère de départ, ces oligomères sont assimilables par certains micro-organismes. De nombreuses études sur la dégradation de PLA en compost ont été entreprises (Buchanan *et al.*, 1995, Gross *et al.*, 1995, Yue *et al.*, 1995), mais avec des composts de compositions non reproductibles. L'évolution des caractéristiques physico-chimiques du PLA pendant la dégradation en compost n'a pas été étudiée systématiquement jusqu'à présent. Seuls l'état du PLA au début et à la fin du compostage a été étudié.

A l'heure actuelle il n'existe aucune étude sur la dégradation de PLA en lombricompostage. L'effet de la microfaune du sol, plus particulièrement des vers de terre, sur la biodégradation de matériaux polymères de synthèse n'a jamais été étudié.

Le but de ce travail est d'étudier le devenir des PLA lorsque ceux-ci sont soumis à un lombricompost, et de suivre l'évolution de certaines de leurs caractéristiques sous l'action des vers de terre, éventuellement en synergie avec leurs micro-organismes commensaux. Cette étude nous conduira à proposer une norme pour l'étude de la « biodégradabilité » des PLA par l'utilisation originale de vers de terre qui sont la première masse animale des terres émergées. Un tel objectif impliquant des parties diverses de la science telles que la chimie, la zoologie, la microbiologie, les techniques environnementales, etc..., l'approche est nécessairement pluridisciplinaire. La réponse apportée à ce besoin est fondée sur l'association de trois laboratoires : le laboratoire de Zooécologie du Sol de l'INRA, le Centre de Recherches sur les Biopolymères Artificiels du CNRS basé à l'université Montpellier I, et le laboratoire de Biotechnologie Microbienne Tropicale de l'IRD.

Afin de faire un point sur les connaissances nécessaires, nous procèderons pour commencer à une étude bibliographique pour examiner les généralités sur les PLA, le lombricompostage et les normes concernant la « biodégradabilité » des matières plastiques De l'ensemble nous déduirons une stratégie d'étude.

Chapitre I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I
Etude bibliographique

I.1. Le lombricompostage

I.1.1. Généralités sur les vers de terre

Les vers de terre étudiés, ou lombriciens, appartiennent à l'embranchement des annélides, à la classe des oligochètes et à l'ordre des Haplotaxina. Parmi les principales familles, on peut citer les Lumbricidae, les Megascolecidae ou les Glossoscolecidae (Qiu, 1998).

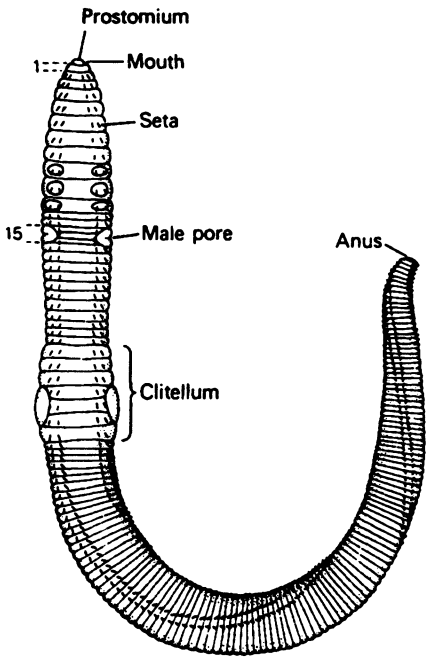


Figure I.1: Morphologie externe d'un lombricien (d'après Lee, 1985).

Les lombriciens constituent la première masse animale sur les terres émergées. Ils interviennent pour accélérer la décomposition de la matière organique et favorisent l'activité microbienne. Ils permettent ainsi la formation d'humus stable et la libération des agents biogènes (azote, phosphore, potassium). Ils favorisent la fertilité du sol, son drainage, son aération, sa structuration (Bouché, 1984). Ils constituent une nourriture abondante et riche pour leurs

prédateurs (sangliers, porcs, oiseaux, volailles, poissons..) car ils sont riches notamment en protéines, en acides gras insaturés et en iode. Ils sont en général classés en trois catégories écologiques (Bouché, 1972) :

- les anéciques (ex: *Lumbricus terrestris*) sont de gros vers creusant des galeries subverticales, se reproduisant relativement peu, se nourrissant la nuit en surface de litière qu'ils mélangent à de la terre prise en profondeur. Ces vers sont dominants dans la plupart des sols de l'Europe tempérée. Ce sont eux qui favorisent les qualités biologiques des sols (infiltrabilité de l'eau, aération, recyclage des matières organiques mortes, bonne stabilité et structure des sols, microflore active, etc...),

- les endogés (ex : *Vignysia popi*) sont des vers dont la taille est variable, non pigmentés, avec un faible taux de reproduction. Ils se nourrissent surtout dans le sol, des différents débris qui s'y trouvent. Ils jouent un rôle complémentaire à celui des anéciques dans la fertilité biologique des sols. Les endogés et anéciques sont actifs en automne, hiver et printemps. Ils s'abritent dans les profondeurs du sol en été.

- les épigés (ex : *Eisenia fetida*) sont des petits vers qui vivent à la surface du sol dans les accumulations organiques (litière, fèces de bétail,..). Ils deviennent rapidement adultes, ont un fort taux de reproduction car ils sont la proie de prédateurs et doivent faire face à des conditions environnementales très difficiles (saisons sèches, etc..)

Les anéciques et les endogés sont des "laboureurs". Les épigés ne font que coloniser et consommer les accumulations organiques.

Une autre classification des lombriciens est utilisée, de façon parfois concomitante à celle de Bouché (d'après Lee, 1985) :

- les détritivores se nourrissent à la surface ou près de la surface du sol, de litière et de débris végétaux ou de déjections animales. Ils correspondent en général aux épigés et aux anéciques.

- les géophages se nourrissent dans le sol en profondeur, ingèrent de grandes quantités de sol, sélectionnant les fractions les plus riches en matière organique. Ils correspondent en général aux endogés.

I.1.2.Eisenia fetida et Eisenia andrei

Les vers les plus couramment utilisés en lombricompostage sont *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) et *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). Le premier est l'un des vers rouges du fumier, de pigmentation rouge vineux uniforme, de 50 à 90 mm de long, et le second est l'un des vers zébrés du fumier, de pigmentation rouge violacé zébré, de 50 à 120 mm de long.

Bouché (1972) les définit comme des épigés corticoles (vivant dans les troncs morts dans la zone en décomposition entre l'écorce et l'aubier). Rares en milieu naturel, ils sont adaptés aux composts et accumulations organiques diverses résultant de l'activité humaine.

Ces vers se reproduisent rapidement et peuvent, dans des conditions favorables, avoir une durée de vie au moins égale à 600 jours (Venter et Reinecke, 1988) et pouvant atteindre 1000 jours (Graff, 1974).

E.fetida peut atteindre sa maturité sexuelle avec le développement du clitellum 4 à 6 semaines après l'éclosion, (Fayolle, 1982). La production de cocons par *E.fetida* est maximale les trois premiers mois de la vie adulte (Graff, 1974) et peut se poursuivre pendant au moins 500 jours (Venter et Reinecke, 1988). Un lombricien *E. fetida* produit environ 350 jeunes par an (Venter et Reinecke, 1988) et produit 200 jeunes par ver pendant les trois premiers mois de la vie adulte (Graff, 1974). Le cycle de vie d'*E. fetida* est montré figure I-2 :

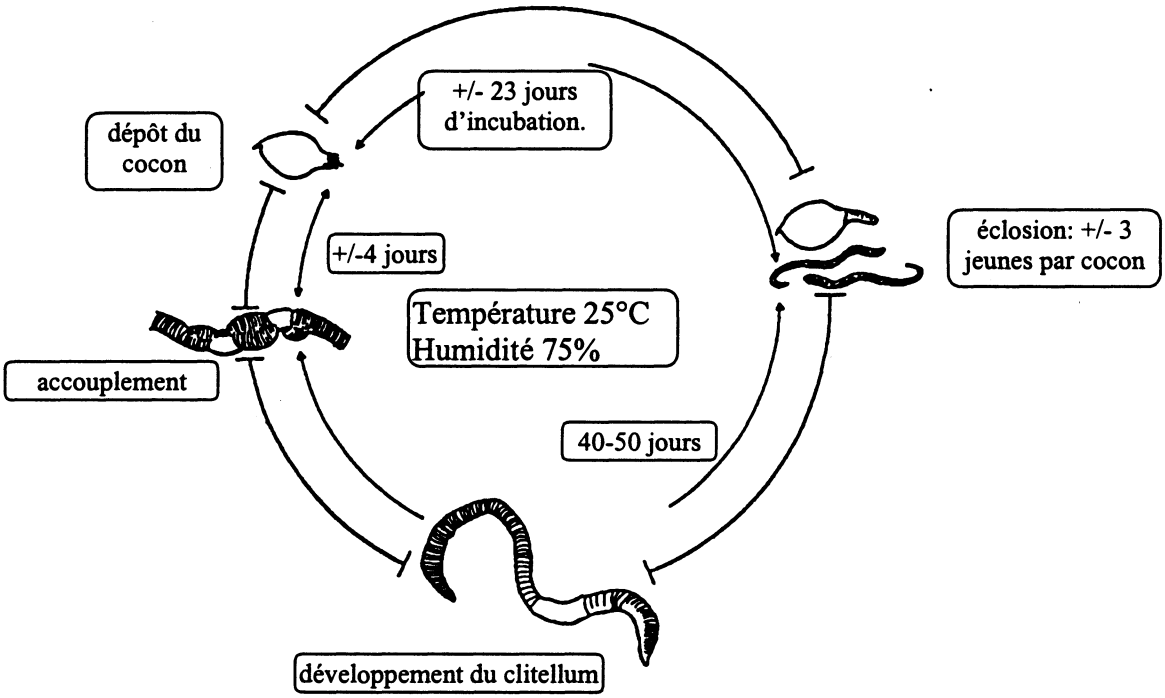


Figure I.2 : Cycle de vie d'*Eisenia fetida* (d'après Venter et Reinecke, 1988).

Après l'accouplement, le cocon se forme en 2 à 4 jours. Après dépôt, la période d'incubation (développement des larves dans le cocon) est alors de 3 semaines (Fayolle, 1982; Graff, 1974). Venter et Reinecke (1988) ont trouvé que les cocons étaient produits à un taux de 0,35 par ver par jour, et que chaque cocon donnait 2,7 jeunes. La fécondité dépend de l'alimentation, de la température (optimale vers 25°C, Reinecke *et al.*, 1992) et d'une humidité abondante (pF 2,7) dans un environnement bien aéré.

I.1.3. Le compostage

D'après la norme AFNOR U44 051 (citée par Ségura, 1984), "le compost urbain est un mélange de déchets solides d'origine principalement domestique ayant subi au cours de sa fabrication un échauffement naturel de la masse à une température de 60°C ou plus pendant une durée au moins égale à 4 jours, précédé ou suivi de certaines opérations mécaniques (triage, broyage, tamisage...)".

Le but du compostage est de stabiliser les déchets organiques, de les débarrasser des germes pathogènes (rôle sanitaire) et de produire un amendement utilisable dans les champs, sans action néfaste pour l'environnement. Les ordures ménagères, comme les fumiers sont des milieux riches en carbone, azote et micro-organismes. Il s'y développe donc naturellement une intense activité biologique. La technique du compostage consiste à orienter cette activité vers une fermentation aérobie, ce qui est obtenu en assurant une oxygénation suffisante du substrat (retournement ou insufflation d'air).

Le compostage comporte différentes phases (Murat, cité par Knipiler, 1985) :

- une phase de latence (environ 1 jour), temps nécessaire aux microorganismes pour coloniser le nouveau milieu. Ces micro-organismes sont mésophiles. Leur température optimum de croissance est tempérée, aux alentours de 20 à 30°C.
- une phase d'élévation thermique (environ 1 jour) atteignant 65-70°C. Entre 45 et 55°C, les mésophiles disparaissent et laissent une flore thermophile occuper les déchets.
- une phase thermophile (2 à 6 jours) correspondant au maximum de température atteinte. Entre 60°C et 75°C, la quasi-totalité des microbes est détruite ou inactivée. Il en est de même des pathogènes de toutes sortes, ainsi que des oeufs et larves d'insectes. Le compostage a donc un rôle sanitaire par hygiénisation aérobie (Ségura, 1984).
- une phase de maturation correspondant à une fermentation secondaire plus lente favorable à l'humification. La fermentation aérobie s'accompagne donc d'un dégagement de chaleur, d'une perte de carbone (CO_2) et d'une hygiénisation du produit de départ surtout par antibiose. Cette phase prend environ 6 mois, le produit obtenu est alors biologiquement stable.

I.1.4. Le lombricompostage

Il s'agit d'une fermentation microbiennne aérobie suivi d'un élevage simultané de lombriciens, ceux-ci stimulant la vie microbienne.

Les avantages du lombricompostage sont :

- l'accroissement de la vitesse de maturation du compost du fait d'une stimulation par les vers de la vie microbienne. Il faut 3 mois de maturation à un lombricompost et 12 mois à un compost pour aboutir à la stabilisation biologique (Bouché, comm. pers.).

- l'obtention après criblage d'un produit final (lombricompost) de qualité supérieure aux composts urbains traditionnels. En effet, le criblage permet la séparation de la matière organique (fèces de lombriciens) des inertes (verres, cailloux, plastiques).

- le développement d'une biomasse de vers éventuellement utilisable pour l'alimentation animale si les problèmes de polluants chimiques sont maîtrisés.

Pendant le lombricompstage, les lombriciens accélèrent la maturation des composts grâce à 2 actions, mécanique et biologique (d'après Knipiler, 1985) :

- une action mécanique d'ingestion et de passage dans l'intestin qui permet de fractionner les amas organiques. Les fèces produites sont calibrées, ce qui peut faciliter leur séparation des inertes et des matières organiques non fermentescibles à la fin de la maturation.

- l'action biologique liée à la digestion de protozoaires, de bactéries, de champignons et d'algues par les vers de terre. Ces derniers favorisent donc une forte activité microbienne en remuant le milieu et en disséminant les microorganismes.

Le lombricompostage a été réalisé à l'échelle industrielle. Le procédé NATURBA, mis en place par la société SOVADEC, fonctionne depuis 1991. Etant donné que les vers ne peuvent supporter la très forte température de la phase thermophile préliminaire du compost, le lombricompostage doit se faire en deux temps (Bouché et Nougaret, 1997) :

- le compostage lui-même avec une phase thermophile dont l'acmé est de 75°C, et qui dure de 4 à 6 semaines. La chaleur et la production d'antibiotiques par les microorganismes permettent de détruire les microorganismes pathogènes et les graines de mauvaises herbes. Cette étape a été appelée bihygiénisation.

- le lombricompostage, après transfert du compost dans un lombricubateur précédemment inoculé avec des *E. andrei*, dont la durée totale est de 100 jours.

Trois paramètres physiques et physicochimiques essentiels doivent être respectés pour permettre la survie et le développement des vers :

1-aération

Il est nécessaire d'avoir une bonne aération afin d'éviter le développement de fermentations anaérobies. Ces fermentations provoquent en effet une mortalité importante de la population de vers, du fait de la libération dans le milieu d'ammoniac (NH_3) et d'ammonium (NH_4^+). Le lombricompostage utilisant beaucoup d'O_2, il faut aussi assurer sa diffusion pour éviter que les lombriciens ne s'asphyxient. Le substrat utilisé doit donc être de porosité suffisante (Knipiler, 1985).

2-humidité

Les vers nécessitent des milieux de vie proches de la saturation en eau. Il est nécessaire d'avoir de l'eau libre dans le substrat (le point de flétrissement pF est inférieur à 2,7, soit 49,23 Pa).

3-température

Pour *E.fetida*, la température optimale se situe entre 20°C et 29°C pour Kaplan *et al* (1980), et à 25°C pour Fayolle (1982). En fait, des problèmes d'aération apparaissent souvent entre 26°C et 30°C si rien n'est fait. Si la température est supérieure à 30°C ou inférieure à 5°C, il y a risque de mortalité des lombriciens (Fayolle, 1982).

En plus de ces trois paramètres, d'autres doivent être contrôlés: le pH (entre 5 et 8), la conductivité (teneur en sels minéraux inférieure à 0.5%, Kaplan cité par Knipiler,1985), la teneur en nitrates.

Le devenir de la matière organique dans un compost et un lombricompost a été suivi par Vinceslas-Akpa et Loquet (1994). Ces auteurs ont montré que sur 10 mois de compostage l'évolution du lombricompost et du compost ne se différencie que dans la phase finale. Le lombricompost s'enrichit en produits aromatiques et en polysaccharides - tout en ayant un taux d'aromaticité inférieur- traduisant un mécanisme de polycondensation et/ou de néosynthèse plus important que dans le compost, avec un enrichissement azoté également supérieur.

La valeur agronomique du compost est légèrement différente de celle du lombricompost. Au bout de 10 semaines, la croissance du maïs est supérieure lorsqu'il est mis en présence de lombricompost. Cela a été attribué par Juste et Soldat (1983) à une amélioration de la nutrition

azotée de la plante. Par ailleurs, Radha *et al.* (1992) ont trouvé un nombre de micro-organismes dans le sol, de bactéries fixatrices d'azote, et de mycorrhizes dans les plantes, supérieur dans les sols amendés 2 mois avec du lombricompost par rapport à un sol amendé avec des fertilisants chimiques traditionnels.

I.2. Ingestion et digestion par les lombriciens

I.2.1. Tube digestif des lombriciens

Le système digestif des lombriciens diffère selon les espèces, mais le tube digestif des Lumbricidae utilisés en lombricompostage a une structure de base commune. Cette structure est montrée sur la figure I.3.

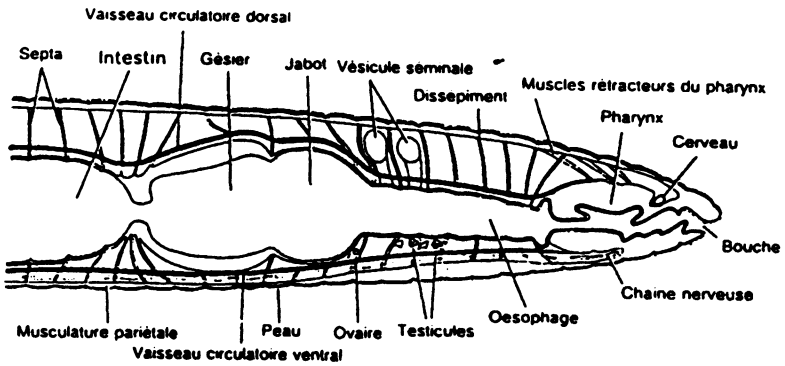


Figure I.3 : Section longitudinale des 24 segments antérieurs d'un lombric «typique» (d'après Lee, 1985).

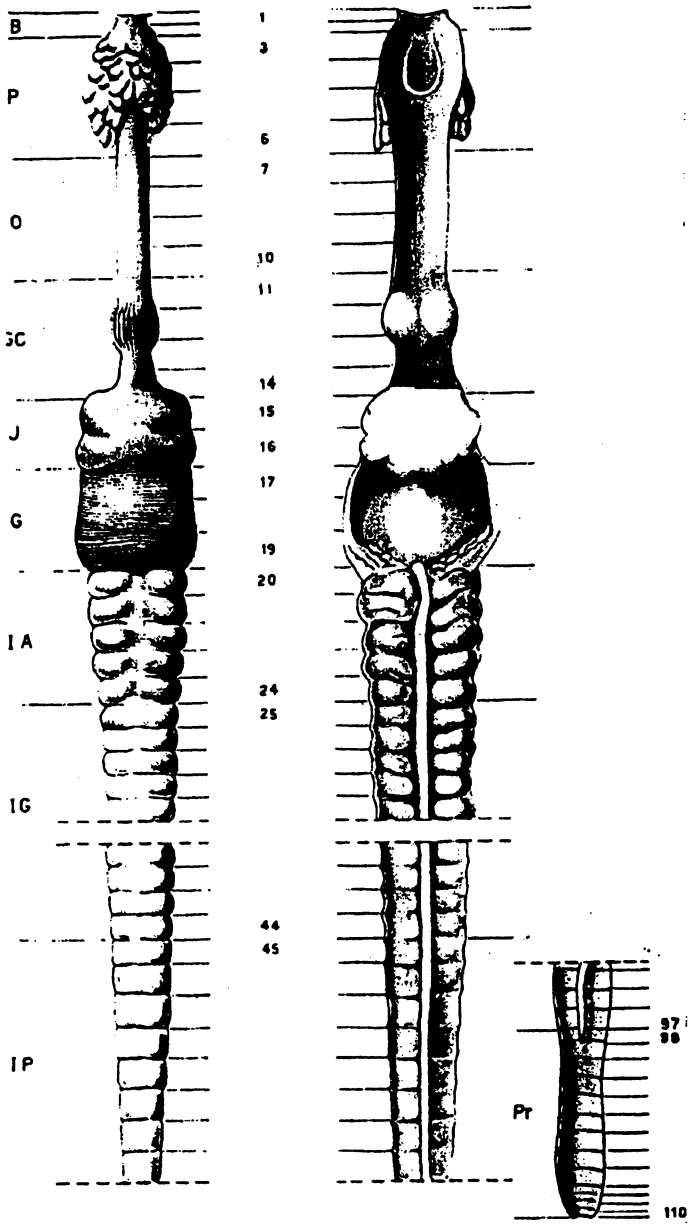


Figure I.4. : Le tube digestif d'*Eisenia fetida*, d'après Van Gansen, 1963.

B : région buccale	P : prostomium	O : œsophage
GC : glandes calciques	J : jabot	G : gésier
IA : intestin antérieur	IG : intestin moyen	IP : intestin postérieur
Pr : proctodaeum		

Le système digestif des lombriciens est constitué d'une chambre buccale, d'un pharynx, d'un oesophage, d'un jabot, d'un gésier et d'un intestin lui-même divisé en trois parties: antérieure, moyenne, postérieure (figure I.4).

La bouche a une musculature qui permet à la cavité buccale de saillir pour que les structures sensorielles à sa surface soient en contact avec la nourriture potentielle. Cette bouche est capable d'exercer une action de succion, de prendre les aliments et les faire passer dans le pharynx puis l'oesophage qui possède des glandes calcifères. De là, il passe dans le jabot puis le gésier qui est entouré de muscles transverses puissants servant à triturer la nourriture (Darwin, 1882). Enfin il passe dans l'intestin. La partie antérieure de l'intestin sécrète du mucus et des protéines. La partie moyenne est ciliée et contient des cellules glandulaires.

La nourriture adhère au mucus au niveau de l'épithelium buccal. La pression dans la cavité buccale est relâchée, ce qui établit un vide partiel. Le pharynx exerce lui aussi une succion et la nourriture entre. Le pharynx fonctionne comme une pompe renforçant le péristaltisme de l'oesophage. Les cils de la partie antérieure de l'oesophage augmentent la contraction musculaire. Le jabot et le gésier sont contractiles (Van Gansen, 1963), ils agissent donc comme des pompes pour transporter la nourriture. Le gésier régule le mouvement de la nourriture, empêche la régurgitation, broie et mélange la nourriture. On trouve fréquemment dans le gésier et les intestins des petites pierres et des grains de sable qui sont avalés indépendamment de ceux avalés lors du creusement des galeries. Il est probable que ces pierres servent à triturer la nourriture (Darwin, 1882). Un sphincter contrôle le passage de la nourriture du gésier jusqu'à l'intestin. Les mouvements péristaltiques de la paroi intestinale aident le matériel à passer à travers l'intestin (Edwards et Fletcher, 1988).

Le temps de transit intestinal de la nourriture varie selon l'espèce de ver de terre. Parle (1963a) trouve que le transit chez *L. terrestris* varie de 12 jours lorsque le ver creuse des galeries, à 20 jours lorsque le ver se nourrit effectivement.

I.2.2-Sapidité

Pour les lombriciens, le choix alimentaire précédant l'ingestion a été souvent observé soit dans la nature, soit en laboratoire dans des dispositifs expérimentaux. L'interprétation de ces observations est délicate en raison du grand nombre de variables qui peuvent intervenir dans ce choix.

Les lombriciens sont saprophages, ils se nourrissent de déchets organiques : feuilles mortes et plantes en décomposition (plus rarement déjections et cadavres d'animaux). Leurs préférences sont liées à la sapidité des substrats qui dépend de plusieurs facteurs:

- l'espèce végétale : par exemple, *Lumbricus terrestris* préfère les feuilles de luzerne à celles de «ray grass» et à celles de chêne vert (Cortez et Hameed, 1988).

- l'état de la feuille : les lombriciens préfèrent les feuilles mortes anciennes aux feuilles fraîchement tombées. Les anéciques comme *Lumbricus terrestris* préfèrent des déchets organiques intacts, les épigés comme *E. fetida* préfèrent la matière organique dans un état avancé de décomposition, et les endogés comme *Allolobophora caliginosa* extraient leurs nutriments à partir de la matière organique mélangée au sol (Edwards et Fletcher, 1988). Martin et Stringer (cités par Wright, 1972) pensent que les molécules phénoliques présentes dans les feuilles fraîches ont un effet répulsif sur les lombriciens. Cet effet serait annulé après lessivage par la pluie qui entraîne les molécules répulsives. Or, les molécules phénoliques ne sont pas lessivables car non solubles. D'après Wright (1972), si les lombriciens préfèrent les feuilles "lessivées" aux feuilles fraichement tombées, c'est plus à cause de l'assouplissement de la texture de ces feuilles (qui sont alors plus faciles à fragmenter et à ingérer) qu'à la perte de substances répulsives.

- l'inoculation microbienne de la nourriture des lombriciens : des expériences menées sur *L. terrestris* ont montré que celui-ci préfère des disques de papier filtre inoculés (avec des bactéries ou des champignons) à du papier filtre stérile. Il préfère aussi les disques inoculés avec des champignons à des disques inoculés par des bactéries (Cooke et Luxton, 1980), ou encore des feuilles inoculées (*Pseudomonas aeruginosa*) à des feuilles non inoculées (Wright, 1972). En effet, *L. terrestris*, en automne et en hiver, enfouit les feuilles par l'apex dans ses galeries, mais ne les mange pas nécessairement tout de suite. Il attend que ces feuilles aient été colonisées par des micro-organismes (Wright, 1972). Le rôle des micro-organismes dans la « sapidisation » des

feuilles n'est pas clairement élucidée. Pour Martin et Stringer (cités par Wright, 1972) les micro-organismes pourraient détruire ou enlever les molécules répulsives que les feuilles contiennent. Toutefois Wright (1972) a montré que des feuilles avec une concentration en phénol artificiellement élevée ne diminuait pas le taux d'alimentation des lombriciens par rapport à des feuilles non traitées. Pour Wright, le rôle des bactéries pourrait être d'assouplir la texture. Mais Satchell et Lowe (cités par Cooke et Luxton, 1980) trouvent qu'il existe peu de correspondance entre la nature mécanique des feuilles et leur sapidité. Cooke et Luxton (1980) avancent l'hypothèse que la contamination microbienne des végétaux morts relâche des phagostimulants attractifs pour les lombriciens, et que cette décomposition rend les carbohydrates et l'azote plus disponibles pour eux.

L'addition de bactéries sur du papier filtre augmente la consommation de ce dernier par les lombriciens, de même que l'inoculation préalable de bactéries est indispensable à l'ingestion de mousse de polyester par des lombriciens (Wright, 1972). A ce niveau, les bactéries masquent peut-être les molécules répulsives.

I.2.3-Relations lombriciens/microorganismes

Comme les lombriciens ingèrent beaucoup de matériel riche en microorganismes, leur canal alimentaire contient les mêmes espèces de micro-organismes que celles trouvées dans le sol environnant (Morgan, 1988). Par contre la quantité de micro-organismes diffère de celle du sol. Cela serait dû à un tri de la nourriture par les vers de terre (Kristufek *et al.*, 1995). *L.rubellus*, détritivore, a dans son intestin 33% de bactéries en moins que dans le sol environnant, probablement en raison d'une nourriture basée sur des végétaux frais, pauvres en microorganismes.

Pendant le transit intestinal, le nombre de microorganismes fluctue. Certains, comme les levures et les champignons stagnent, alors que d'autres comme les bactéries et les actinomycètes augmentent chez *L.terrestris*, *A. caliginosa* et *A.longa* (Parle, 1963b). Pour leur part, Kristufek *et al.* (1992) ont observé une diminution du nombre de bactéries et actinomycètes pendant le transit intestinal d'*A.caliginosa*. En fait il semble que la variation des micro-organismes pendant le transit intestinal dépende de trois facteurs :

1- de la catégorie écologique du lombricien : Kristufek *et al.* (1992) trouvent que le nombre de bactéries et actinomycètes augmente dans l'intestin de *L.rubellus* pendant son transit, contrairement à ce qu'il observe chez *A.caliginosa*. D'après l'auteur, comme *L.rubellus* est un détritivore qui se nourrit de feuilles peu décomposées, sa nourriture fournit plus de nutriments pour les bactéries qui peuvent se développer. Par contre, *A.caliginosa* est géophage. Il se nourrit de résidus humifiés difficilement décomposables par les bactéries.
2- -de la saison : le nombre total de micro-organismes dans l'intestin des vers de terre fluctue exactement comme évolue le nombre de micro-organismes dans le sol, c'est-à-dire avec 2 pics : un au printemps, un en automne. Ce dernier correspond aux pics de précipitation (Kristufek *et al.*, 1995).
3- de la pollution : Ramteke et Hans (1992) trouvent 28% de micro-organismes dégradant l'hexachlorocyclohexane (HCH) dans l'intestin de vers de terre placés dans un sol empoisonné par ce HCH (même pourcentage que dans le sol).

Il est à noter que le nombre de micro-organismes est significativement plus élevé dans l'intestin antérieur que dans l'intestin postérieur pour *A.caliginosa* et *L.rubellus*.

Le fait que la densité en certains microorganismes diminue pendant le transit laisse penser que les lombriciens s'en nourrissent. *L.terrestris*, *A. caliginosa* et *A.longa* se nourriraient de levures et de champignons, de préférence à des bactéries et actinomycètes (Parle, 1963b). Une autre évidence expérimentale est la présence de chitinase, lipase et protéase dans l'intestin des lombriciens. Cette observation semble montrer que ceux-ci pourraient se nourrir de champignons. *Pontoscolex corethrurus* possède une N-acétylglucosaminidase, une laminarinase et une laminaribiase (Zhang et al, 1993), ce qui concorde avec le fait que cet endogé se nourrit de champignons. Les lombriciens ont des préférences relatives aux espèces de microorganismes. *L.terrestris* préfère certains champignons à d'autres. Lorsque les champignons sont inoculés sur papier filtre (Cooke 1983), il préfère *Mucor hiemalis*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* et *Trichoderma viride* plutôt que *Chladosporium chladosporoides*, *Poronia piliformis*, *Chaetochomium globosum* et *Penicillium digitatum*. Cette préférence est indépendante des concentrations en polyphénol, en azote ou en carbone, mais semble dépendre de la quantité de champignons sur le papier, de l'humidité et de la concentration en calcium.

Les algues et cyanobactéries semblent aussi jouer un rôle dans la nourriture des lombriciens. Atlavinyte et Pociene (1973) ont montré que le nombre d'algues (vertes, bleues, diatomées) diminue quand le nombre de lombriciens augmente dans des pots remplis de terre, et que le nombre d'algues diminue par passage dans l'intestin des vers lorsque ceux-ci sont soumis à un régime d'algues. Toutes les algues ne sont pas consommées par les lombriciens : la cyanobactérie *Spirulina platensis* permet la croissance de *E.fetida* contrairement à l'algue *Chlorella* (Stamatiadis *et al.*, 1994).

Rouelle et Pussard (1981) ont trouvé que les amibes à l'état de trophozoïtes (c'est-à-dire non enkystées) sont détruites dans le tube digestif des lombriciens. En effet, le cilié *Colpidium campylum* se lyse lorsqu'il est plongé dans les sucs digestifs de *L.terrestris* (Piearce et Phillips, cités par Rouelle, 1983). Miles (1983) a montré que les larves d'*E. fetida* ne parvenaient à l'état adulte que dans un milieu non dépourvu de protozoaires. De plus ce lombricien croît plus vite dans un milieu enrichi en protozoaires que dans un milieu enrichi seulement avec des bactéries. Cette stimulation pourrait être due à un ou des produits du métabolisme protozoaire, ou bien à l'action de ceux-ci sur la microflore (Neuhauser, cité par Rouelle, 1983).

Les relations entre microorganismes et lombriciens se font avant, pendant et après passage dans l'intestin :

-AVANT (préoral) : c'est le stade de décomposition des litières qui se fait en deux étapes (Cortez et Bouché, 1998)

1/ Décomposition microbienne

2/ Décomposition par les vers de terre

Pendant le premier stade de décomposition des litières, celles-ci sont enfouies sous les fèces de vers. Cet enfouissement stimule l'activité microbienne et la décomposition "préliminaire" de la litière. De plus, Cortez et Bouché (1998) trouvent que le pH dans les fèces augmente, car les lombriciens remontent de la terre des horizons inférieurs (qui sont à pH 7,5) vers l'horizon supérieur à pH 6, et que les vers de terre répandent des cations dans l'horizon supérieur du sol sur la litière. Cette remontée du pH et la décomposition préliminaire de la litière par les microorganismes rendent les litières plus sapides pour les vers de terre, ce qui augmente le taux de décomposition des litières dans le deuxième stade de décomposition (par les vers de terre)

(Cortez et Bouché, 1998). L'augmentation de sapidité grâce à l'action des microorganismes peut être due à l'assouplissement de la texture (Wright, 1972), à la dégradation des molécules non sapides (Martin et Stringer, cités par Wright, 1972) ou à la libération des nutriments sous forme directement assimilable (Cooke et Luxton, 1980). De plus, les anéciques et épianéciques peuvent tirer la matière organique non ingérée près de l'ouverture de leur galerie, certains en enfouissent aussi à l'intérieur. Ceci crée un microhabitat favorisant l'activité microbienne.

-PENDANT (digestion) : à ce stade on peut aussi distinguer deux étapes :

1/ l'ingestion : elle dépend de la sapidité de la litière qui dépend elle-même de l'activité microbienne préalable, non seulement au niveau préoral (décrit ci-dessus), mais aussi au niveau post-anal (voir ci-après), vu que les vers réingèrent leurs fèces. La résistance mécanique à l'ingestion est aussi un autre facteur limitant lié à la taille des débris et à la taille des vers de terre. Les feuilles peuvent être assouplies par décomposition microbienne (Wright, 1972).

2/ la digestion propre : dans l'intestin des lombriciens, les micro-organismes trouvent beaucoup de nourriture triturée, et peuvent s'y multiplier (Kristufek *et al.*, 1992). Les lombriciens sécrètent du mucus dont les micro-organismes peuvent aussi se nourrir. D'un autre coté, les micro-organismes décomposent la matière organique pour eux et pour les lombriciens quand ceux-ci n'ont pas les enzymes nécessaires. Zhang *et al.* (1993) ont trouvé une activité cellulasique dans l'intestin de *P.corethrurus*, mais n'ont pas trouvé cette activité dans les cultures stériles de tissus intestinaux lombriciens. Ils en ont conclu que, pour dégrader la cellulose, le lombricien dépend de l'activité des micro-organismes. Mais Rouelle a vainement cherché à mettre en évidence une activité cellulolytique exclusivement microbienne chez *E. andrei* (Bouché, comm. pers.). Le fait que les micro-organismes servent de nourriture aux vers de terre conforte l'hypothèse de mutualisme, proposée par Barois en 1987 (citée par Barois, 1992). Celle-ci suppose une interrelation entre lombriciens géophages et micro-organismes décomposant la matière organique. Dans ce mécanisme, les lombriciens produisent du carbone assimilable sous forme de mucus ce qui stimule la microflore qui dégrade la matière organique, rendant cette dernière plus digestible par les lombriciens. L'activité des micro-organismes dans l'intestin des lombriciens (épigés et endogés géophages) augmente tout au long du transit intestinal (Barois, 1992).

-APRES (post-anal): c'est un stade post-défécation où les fèces sont décomposés par deux mécanismes (d'après Cortez et Bouché, 1998) :

1/ incubation microbienne : Parle (1963a) trouve que l'activité microbienne, en particulier celle des champignons, augmente dans les fèces de vers de terre alors qu'elle reste stable pendant le transit intestinal. Il y a intensification des processus de minéralisation (Koslovskaya, citée par Flack et Hartenstein, 1984).

2/ réingestion des fèces : le matériel ingéré par les vers de terre peut comprendre jusqu'à 53% d'anciens fèces dans le cas de *Nicodrilus velox* (Bouché *et al.*, 1983, cité par Cortez et Bouché, 1998).

I.2.4-Enzymes des lombriciens

Diverses activités enzymatiques ont été retrouvées dans les intestins de lombriciens (Mishra et Dash, 1980). Citons en particulier les activités cellulase, chitinase, protéase, amylase, lipase, lichenase (Tracey, 1951) et uréase (Dash *et al.*, 1981). Il est à noter que l'essentiel des recherches dans le domaine des activités enzymatiques des lombriciens a été consacré aux enzymes glucidiques.

Les activités enzymatiques diffèrent selon l'espèce et l'activité des lombriciens. Zhang *et al.* (1993) ont montré que l'endogé *Pontoscolex corethrurus* ne possède pas de cellulase ni de mannase alors que ces enzymes sont présentes dans l'intestin (produites par des microorganismes). Ce lombricien se nourrissant de sols pauvres en matières organiques, l'activité de certaines de ses enzymes est inférieure à celle des enzymes analogues chez les épigés. Urbasek, cité par Zhang *et al.*, 1993, trouve en effet que l'activité cellulase des Lumbricidae endogés est inférieure à celle des épigés. Pour un même lombricien, les activités enzymatiques diffèrent selon la région de l'intestin. Van Gansen (1963) trouve que les activités estérase et phosphatase chez *E. fetida* sont plus importantes dans le jabot.

Les expériences menées sur l'origine des enzymes trouvées dans l'intestin des lombriciens ne permettent pas vraiment de conclure car la plupart des auteurs utilisent des lombriciens holoxéniques qu'ils stérilisent par traitement antibiotique. Or, il reste toujours une microflore anaérobie, cellulolytique la plupart du temps (Loquet et Vinceslas, 1987). D'autres utilisent des méthodes histochimiques (Van Gansen, 1963) qui permettent de voir si les enzymes sont

présentes dans les tissus lombriciens, mais qui ne permettent pas de connaître le rôle physiologique de ces dernières, à savoir si elles sont vraiment sécrétées par le lombricien dans son intestin (activité digestive ou cellulaire). Zhang *et al.* (1993) ont cultivé des cellules provenant de différents tissus lombriciens et ont étudié l'activité enzymatique dans le surnageant de culture mais on ne sait pas si *in vivo* ce sont bien les cellules lombriciennes qui sécrètent les enzymes.

I.3. Les polymères d'acide lactique

I.3.1. Généralités sur les polymères

Un polymère est un composé constitué par l'enchaînement covalent de motifs simples identiques ou différents appelés motifs monomères. Le nombre de motifs monomères constituant la macromolécule est appelé degré de polymérisation (DP). Les polymères sont en général des mélanges de molécules de taille différentes (donc de DP différents). On dit qu'ils sont polymoléculaires. Les échantillons où toutes les molécules ont le même DP sont appelées isomoléculaires (cas idéal). La meilleure façon de représenter la gamme de masses molaires d'un échantillon polymoléculaire consiste à établir :

- soit la courbe de distribution numérale qui donne la fraction en nombre de molécules de DP=n en fonction de n. On obtient ainsi la masse molaire moyenne en nombre $\overline{Mn}$.

- soit la courbe de distribution pondérale (fraction en poids de molécules de DP=n pour toute valeur de n). Elle permet de calculer la masse molaire moyenne en poids $\overline{Mp}$, qui rend mieux compte de la dispersion des masses molaires de l'échantillon.

Le rapport $\overline{Mp}/\overline{Mn}$ est appelé indice de polymolécularité. Il permet de caractériser globalement la dispersité des masses molaires. Il est égal à 1 dans le cas des polymères isomoléculaires, et supérieur à un pour les polymoléculaires.

Si les unités monomères sont les mêmes, on parle d'homopolymère. Les macromolécules comportant deux motifs ou plus sont des copolymères. Un polymère peut être linéaire ou tridimensionnel. Ses propriétés macroscopiques dépendent du mode de synthèse et de plusieurs

autres facteurs. Les macromolécules naturelles sont généralement constituées d'un nombre relativement grand d'unités monomères différentes dont la plupart sont hydrophiles.

Synthèse des polymères :

On distingue deux grandes voies de synthèse pour les polymères :

- la polycondensation : lorsque la ou les unité(s) monomère(s) comportent au moins deux fonctions réactives, chaque étape de la synthèse s'effectue avec élimination simultanée d'un composé de faible masse molaire (ex: si l'unité monomère est un acide alcool, il y a réaction d'estérification avec élimination d'eau). Chaque molécule de monomère est susceptible de se combiner dès le début de la réaction et les oligomères de s'additionner entre eux. Il ne reste en général plus de monomère n'ayant pas réagi en fin de synthèse.

- la polyaddition ou polymérisation : c'est une réaction de propagation qui nécessite l'activation des monomères. Cette activation est réalisée dans la phase d'amorçage. Elle peut être radicalaire, anionique, cationique, etc... De nombreuses molécules organiques possèdent cette aptitude à la polyaddition: alcènes, alcynes, aldéhydes, etc... Il n'y a alors pas d'élimination de sous-produits, par contre il reste en général une quantité plus ou moins importante de monomère.

Morphologie des polymères :

L'étude des propriétés des polymères solides conduit à distinguer :

- l'état cristallin : les molécules s'organisent dans l'espace selon un réseau tridimensionnel constitué par la répétition d'un motif élémentaire appelé maille cristalline. L'édifice obtenu possède une très grande régularité.

- l'état amorphe : les molécules sont disposées en désordre.

En réalité, les polymères solides sont soit totalement amorphes, soit plus ou moins cristallins. Cette cristallinité partielle doit être considérée comme la juxtaposition de zones amorphes et de zones cristallines, appelées cristallites, dans lesquelles les chaînes de polymères sont organisées les unes par rapport aux autres. Une même chaîne macromoléculaire peut appartenir à plusieurs domaines, cristallins et amorphes. La morphologie d'un polymère dépend de nombreux paramètres, en particulier la présence de plusieurs unités monomères différentes, la stéréorégularité, la structure chimique, la réticulation, etc...

La morphologie des polymères peut s'évaluer par l'intermédiaire de deux phénomènes :

- la fusion (liée à l'existence de cristallinité). Elle correspond à un point ou à un intervalle de température à partir duquel le polymère se ramollit et se transforme en un liquide plus ou moins visqueux. Pour un polymère cristallin, la fusion correspond à une désorganisation totale des zones cristallines, avec rupture des liaisons interchaînes éventuelles. Par contre, un polymère amorphe ne subit pas de fusion, mais seulement une diminution régulière de la viscosité. C'est pourquoi on parle plutôt de fluidification des polymères amorphes, ou de fusion non cristalline. La température de fusion dépend de divers paramètres : masse molaire, cristallinité, structure chimique.

- la température de transition vitreuse (T_v). C'est la température au-dessous de laquelle le polymère est un solide dur et cassant (état vitreux par opposition à l'état caoutchoutique). Au-dessus de cette température, le polymère a des propriétés physiques différentes et se comporte soit comme un élastomère, soit comme un liquide viscoélastique. La T_v est la température en dessous de laquelle il n'y a plus de possibilité de mouvements browniens dans le polymère, donc plus de changement de conformation des molécules constituant le polymère. La température de transition vitreuse dépend de divers paramètres : structure chimique, masse moléculaire, réticulation, ramification, copolymérisation, emploi de plastifiants.

I.3.2. Les polymères dégradables et biodégradables

La recherche de la maîtrise du devenir des matériaux polymères de synthèse a conduit à la mise au point de nouveaux produits qui sont dégradables ou biodégradables. Cependant la complexité des phénomènes de dégradation des polymères entraîne la nécessité de définir une terminologie adaptée. Vert et Guérin (1992) ont proposé un essai de dénomination des différentes formes de dégradation (Tableau I.1) :

Tableau I.1: Nomenclatures relatives à la "biodégradabilité" des polymères (d'après Vert et Guérin, 1992).

Phénomène de dégradation dans l'environnement	**Dénomination**
Délitement du matériau sans altération des macromolécules synthétiques	
*fragmentation en morceaux ou en poudre	
-par voie physique.....	Fragmentable
-par voie biologique.....	Biofragmentable
Délitement du matériau avec dégradation des macromolécules	
*et formation d'oligomères ou de petites molécules dont le devenir n'est pas établi	
-par voie chimique.....	Dégradable
-par voie biologique.....	Biodégradable
*et formation de molécules	
-assimilées par les cellules.....	Bioassimilable

Parmi les polymères dits biodégradables (au sens large), on peut distinguer deux groupes (Vert, 1995) :

♦ ceux à base d'amidon , plus ou moins biofragmentables, biodégradables et bio-assimilables :

*grains d'amidon mélangés à un polymère synthétique (Ex: le polyéthylène Ecostar)

*amidon déstructuré et gélifié

*amidon thermoplastique: amidon cuit en présence de plastifiants comme le polyéthylène glycol, ou l'éthylène glycol (Ex: Novon, Mater Bi)

♦ les autres

*poly(α-hydroxyacides) biorésorbables, bioassimilables

*poly(β-hydroxyacides) non biorésorbables, mais biodégradables (bioassimilables?). On trouve principalement le polyhydroxybutyrate (PHB), ou le poly(hydroxybutyrate/hydroxyvalérate) (PHB/HV) (Ex: Biopol)

*poly(ε-caprolactone) ou PCL bioassimilable?

*polyalcoolvinylique ou PVA

*polyacétate de cellulose biodégradable (Ex: Bioceta)

*polysuccinate d'éthylène glycol probablement biodégradable, potentiellement bioassimilable (Ex: Bionolle)

*poly(aminoacides) de synthèse biorésorbables, bioassimilables

I.3.3. Structure et synthèse des PLA

Les PLA sont des polyesters dont les unités de répétition dérivent de l'acide lactique, qui est un α-hydroxy-acide.

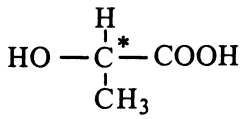
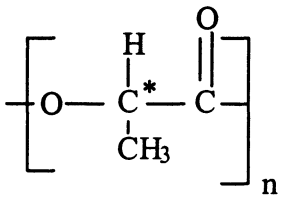


Figure I.5 : Représentation de l'acide L-lactique

L'acide lactique est une molécule chirale, ainsi les PLA sont désignés par le sigle PLAX où X désigne le pourcentage d'unités de répétition d'acide L-lactique.

PLA 100



PLA X
(X=100n/m+n)

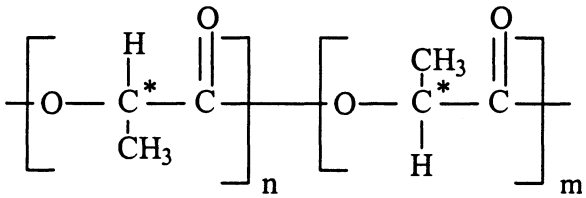


Figure I.6 : Nomenclature des PLA

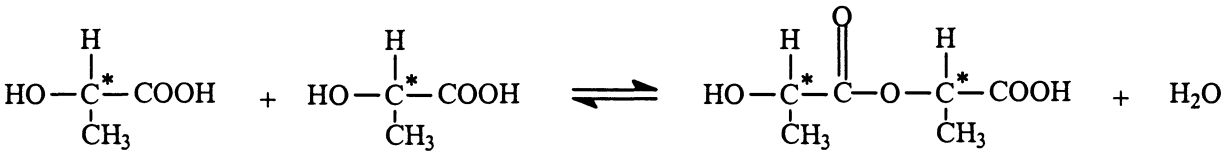
L'acide lactique peut être obtenu de deux façons (Lunt, 1998) :

*à partir de matière première pétrochimique : on obtient alors de l'acide lactique racémique. Seule l'entreprise Musashino produit de l'acide lactique de cette manière.

*à partir de matière première renouvelable, par exemple par fermentation du glucose de certaines plantes, particulièrement de maïs. On obtient de l'acide L-lactique pur, qui peut être racémisé de façon contrôlée en acide D-lactique. C'est la façon la plus utilisée pour obtenir de l'acide lactique.

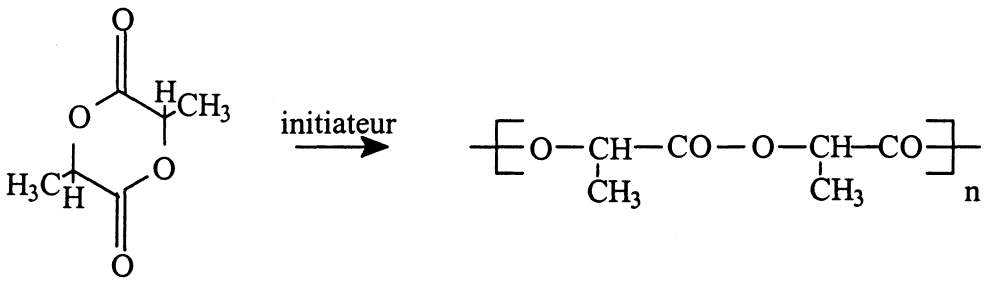
La synthèse des PLA peut se faire de deux façons :

*par polycondensation directe des monomères d'acide lactique :



Cette méthode conduit uniquement à des composés de basses masses molaires.

*par polymérisation du dimère cyclique de l'acide lactique, le lactide. Ce dernier est polymérisé par ouverture de cycle. L'amorceur utilisé est soit le zinc métal, soit l'octanoate d'étain.



La molécule de lactide est chirale avec deux centres d'asymétrie. Elle existe donc sous quatre formes diastéréoisomères différentes : le L-lactide, le D-lactide, le mésolactide, et le lactide racémique qui est en réalité un mélange 50-50 de L-lactide et de D-lactide.

Le PLA 100 ainsi que le PLA 0 qui sont des homopolymères sont semi-cristallins. L'addition d'unités monomères différentes diminue la cristallinité. Le PLA 50 est amorphe. L'addition de 15% d'acide D-lactique dans du PLA 100 rend ce dernier amorphe (Grijpma et Pennings, 1994), la plupart des terpolymères PLAXGAY (GA pour acide glycolique) le sont aussi.

Les PLA X ont une T_v aux alentours de 60°C, qui ne dépend pratiquement pas de la composition en énantiomères, mais qui diminue dans le cas des copolymères. Les PLAXGAY ont une T_v comprise entre 34°C et 60°C, selon la teneur en unités d'acide glycolique. La T_v diminue quand la masse molaire diminue. La T_f tend vers 184°C quand la masse molaire du PLA 100 tend vers l'infini (Jamshidi et al, 1988); elle diminue quand la masse molaire diminue.

I.3.4. Dégradation, biodégradation et bioassimilation des PLA

Au stade initial de la dégradation des PLA les micro-organismes ne sont pas impliqués. Ils agissent seulement après une dégradation chimique qui libère des résidus bioassimilables, tels que des oligomères ou hydroxyacides constitutifs (Torres, 1995).

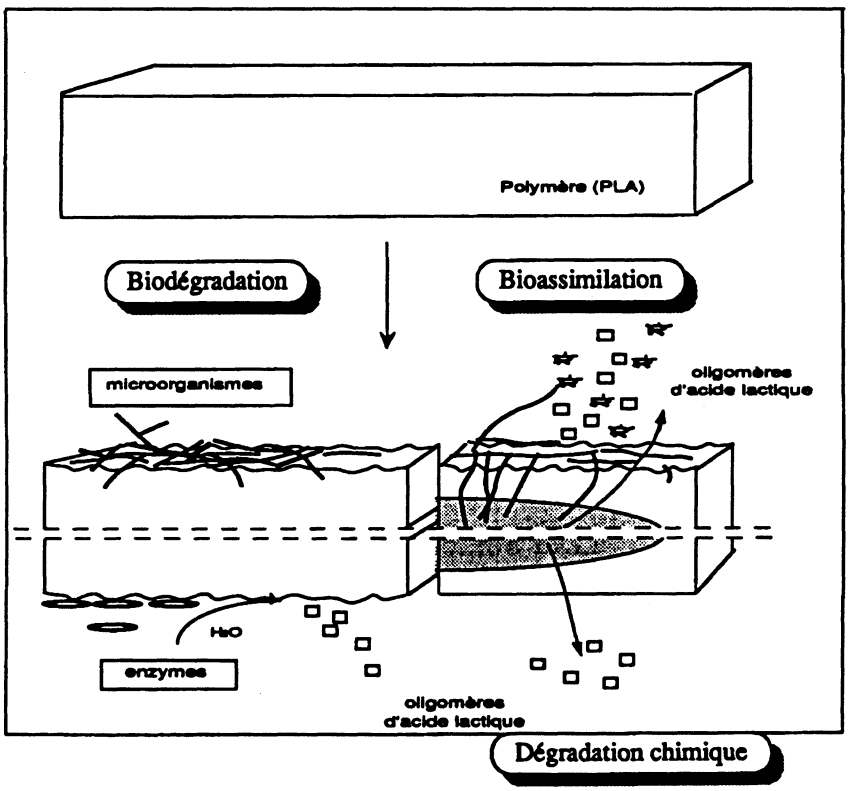


Figure I.7 : Mécanismes de dégradation possibles pour des plaques massives de PLA 50 (Torres, 1995) selon les conditions extérieures.

Sur la figure I.7, on distingue trois parties correspondant respectivement à la dégradation chimique sans enzymes, à la biodégradation par enzymes interposées, et la bioassimilation des plaques massives de PLA 50.

a) Dégradation chimique

La dégradation des PLA, qui sont des polyesters, peut se faire chimiquement par simple hydrolyse. Comme cette réaction est catalysée par un milieu acide, la dégradation des polyesters est un phénomène autocatalytique, c'est-à-dire qu'elle est catalysée par les groupements acide formés par le clivage des liaisons esters. En conséquence, les phénomènes qui commandent l'évacuation des produits de dégradation peuvent aussi affecter le taux de dégradation (Vert *et al.*,

1992). Ce peut être le cas de la diffusion à partir du site de dégradation ou de l'action des enzymes. Dans le cas des plaques massives de PLA 50, on peut constater que la dégradation se produit dans la masse et non préférentiellement à la surface (érosion). Cela est dû à l'accumulation des sous-produits de dégradation qui ne peuvent diffuser vers l'extérieur. Ils provoquent alors une différenciation coeur-surface par suite d'une autocatalyse relativement moins importante en surface (Li *et al.*, 1990a). A la surface, il y a formation d'une "peau" ou membrane de polymère dans laquelle il y a diffusion libre des ions et de l'eau. Cette peau se dégrade plus lentement que le coeur. Elle agit comme une membrane semi-perméable par rapport au coeur du polymère dans lequel les concentrations de produits de dégradation insolubles générés par le clivage des chaînes augmentent. Ces fragments ne peuvent diffuser avant d'avoir atteint une taille suffisamment petite pour devenir solubles et passer à travers les mailles de la membrane externe (Vert *et al.*, 1992). Lors de la dégradation d'un film, c'est la dégradation de type surface qui prédomine. Un film se dégrade donc plus lentement qu'un objet épais.

La dégradation d'une plaque de PLA 50 a été étudiée par Li *et al.* (1990a), et peut être découpée en 5 étapes :

- l'échantillon est initialement homogène. Dès qu'il est plongé dans un milieu aqueux, il absorbe l'eau, ce qui a pour conséquence de provoquer le clivage hydrolytique des liaisons ester. Au début, il est possible que la surface se dégrade plus vite que le coeur (érosion), puisque c'est à ce niveau que l'absorption d'eau est la plus forte.
- il se forme alors des produits de dégradation en surface et dans le coeur, mais ceux qui sont près de la surface diffusent plus facilement dans le milieu. Il reste donc plus de produits de dégradation dans le coeur. Ceux-ci contiennent des groupes acide carboxylique capables de catalyser les réactions de dégradation d'esters.
- au fur et à mesure de la dégradation, le coeur devient plus ou moins visqueux (accumulation d'oligomères) et se différencie de la surface car il se dégrade beaucoup plus vite. La viscosité du coeur dépend de la cristallinité du PLA. Plus le polymère est cristallin, moins le coeur est visqueux.
- la couche de surface devient de plus en plus mince. Quand la surface devient perméable aux oligomères, il y a perte de poids.
- la plaque se vide graduellement pour ne laisser qu'une croûte qui disparaît lentement.

La manifestation de ces différentes étapes dépend de nombreux facteurs (Vert et al, 1992, Li et Vert, 1996) :

- la structure chimique et configurationnelle du polymère, sa masse molaire, la présence de composés résiduels comme des oligomères, monomères, solvants, initiateurs, la présence de composés adsorbés et absorbés comme les lipides.

- la morphologie (taux de cristallinité), facteurs physiques liés à l'absorption d'eau, la diffusion d'ions, la concentration en tampon, la taille de l'échantillon.

b) Dégradation ou biodégradation enzymatique

La dégradation des polymères dits biodégradables implique des mécanismes d'hydrolyse ou d'oxydation enzymatique amenant la coupure des chaînes principales et la formation de fragments assez petits pour être solubles dans l'eau. Les PLA sont des polyesters, ils sont donc susceptibles d'être dégradés par des estérases. En fait, seules quelques enzymes ont été étudiées par rapport à des polymères de type PLA :

- la protéinase K, la pronase et la bromélaïne semblent actives selon Williams (1981). La protéinase K bactérienne peut attaquer le PLA 50 de hautes masses molaires et les oligomères de PLA 100, sous des conditions définies de pH (Reeve *et al.*, 1994, Torres, 1995).

- la ficine, l'estérase animale, la trypsine ont une activité faible selon Williams (1981). Cependant l'estérase de foie de porc testée par Torres n'a accéléré la dégradation que pour les oligomères de PLA 50. Elle est restée sans effet sur les oligomères de PLA 100 et sur les PLA 100 et PLA 50 de hautes masses molaires.

- enfin la lipase est apparue inactive (Torres, 1995) de même que la lactate déshydrogénase (Williams, 1981).

Lorsqu'une enzyme est mise en présence de PLA, la dégradation observée peut être due à l'action catalytique des enzymes, mais elle peut aussi être due à des modifications physico-chimiques du milieu induites par la présence des enzymes. Il peut en effet arriver que les conditions expérimentales ne permettent pas de conclure à une activité enzymatique. Vert *et al.* (1992) font remarquer que lorsque de grandes quantités d'enzymes sont utilisées par rapport à la

concentration en polymère, l'enzyme peut être considérée comme un composé physico-chimiquement actif et capable de modifier de manière plus ou moins importante le milieu liquide environnant (mouillabilité et pression osmotique par exemple). Des phénomènes peuvent alors se produire : changements dans la solubilité des composés, complexation d'ions dans le tampon, ou autres effets physico-chimiques indépendants de l'activité enzymatique.

Il est à noter que les enzymes ne peuvent pénétrer dans la masse du polymère, en raison de leur taille, de leur faible affinité pour les milieux non aqueux (comme l'intérieur d'un polymère), et peut-être aussi à cause de caractéristiques thermodynamiques non favorables (Vert *et al.*, 1992). Elle ne peuvent agir que sur la surface du polymère. On distingue deux modes d'attaque (Lenz, 1993) :

- au hasard dans les chaînes : ce sont alors des endoenzymes et la masse molaire diminue progressivement.

- à l'extrémité des chaînes. Ce sont alors des exoenzymes. Les produits de dégradation sont des monomères, dimères, trimères. L'effet sur la masse molaire est théoriquement nul, le coeur d'un échantillon étant protégé.

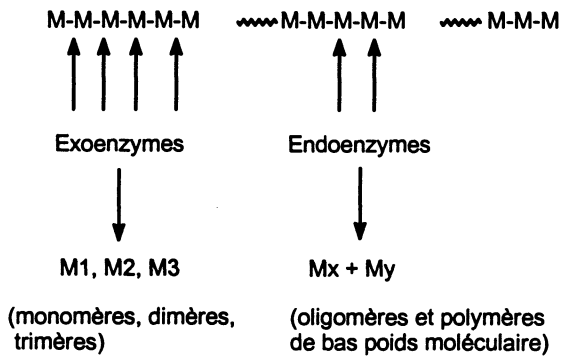


Figure I.8 : Mode d'action des exo- et endoenzymes sur les polymères (d'après Lenz, 1993).

Les enzymes extracellulaires agissent directement sur le polymère puisqu'elles sont dans le milieu extérieur. Les enzymes endocellulaires ne peuvent agir que sur des petites molécules ayant pénétré dans la cellule ou sur de longues molécules à conditions que ces dernières soient localisées dans l'espace périplasmique ou sur la membrane externe (Kawai, 1995). Ceci suppose que les longues chaînes soient hydrosolubles, ce qui ne s'applique pas au PLA. Seuls les

oligomères solubles de PLA sont capables de se détacher de la masse et d'être absorbés par les cellules. Les enzymes agissant sur le PLA massif de hautes masses moléculaires insolubles sont donc extracellulaires.

D'autres facteurs concernant les enzymes sont à prendre en compte (Kawai, 1995) :

-enzymes simples ou multienzymes

-spécificité de substrat

-affinité pour les substrats

Cependant il faut noter que toutes les études ont été réalisées sur des enzymes isolées, sans corrélation directe avec une activité microbienne spécifique.

c) Bioassimilation microbienne

Les PLA sont bioassimilables par certains micro-organismes. Les oligomères de PLA 50 sont bioassimilés plus vite que les oligomères de PLA 100 lorsqu'ils sont mis en présence de *Pseudomonas putida* et *Fusarium monoliforme* (Torres *et al.*, 1996a). Lors de l'enfouissement de plaques de PLA 50 dans le sol 8 semaines puis in vitro 8 semaines, Torres a observé le développement d'un champignon à la surface du matériau, dont les filaments pénétraient dans la masse du polymère. Cette incrustation semble montrer que le champignon est attiré par les oligomères accumulés au coeur de l'échantillon, plutôt que par le matériau polymère de surface. Ainsi la présence de micro-organismes limite l'accumulation de résidus oligomères dans le milieu de culture, vu qu'ils les utilisent comme source de carbone et d'énergie (Torres *et al.*, 1996b).

En conclusion, on peut considérer que les PLA ne sont pas biodégradables dans des conditions environnementales normales. Par contre, ils sont bioassimilables, c'est-à-dire qu'à partir d'un certain degré de décomposition chimique, les micro-organismes sont capables de les dégrader (Torres, 1995).

I.4. Compostage et lombricompostage des PLA et des plastiques

Des tests de compostage de plastiques biodégradables, parmi lesquels les polymères de type PLA, ont été réalisés, mais seulement en compost classique. Les plastiques les plus souvent étudiés sont l'acétate de cellulose et le poly(β-hydroxybutyrate). Les essais de compostage ont tous été faits avec du compost de composition difficile à contrôler, ce qui explique les différences de résultats observées d'un auteur à l'autre pour un même polymère. En effet, Gross et al (1995) ont montré, dans le cas de l'acétate de cellulose, que la perte de masse des films de polymères est dépendante de la formulation du compost. Le paramètre le plus étudié pour mesurer la biodégradation est la perte de masse du polymère, les polymères étudiés le sont sous forme de films. Le tableau I-2 résume les principaux résultats des études de compostage réalisés sur les plastiques. Il est à noter que les PLA 100 et 50 utilisés par Buchanan et al, 1995, ont été synthétisés avec un dérivé de l'étain comme amorceur. Or ce dérivé, même s'il est ici utilisé à faible dose, est soupçonné d'être toxique pour des êtres vivants. Le tableau I-3 apporte des précisions sur la composition des composts utilisés par Gross *et al.*.(1995).

En ce qui concerne des essais de lombricompostage sur du plastique, un seul essai nous est connu à ce jour. Des sacs constitués de Mater-Bi (mélange d'amidon et d'EVOH, Novamont) ont été placés en lombricompost avec des vers de terre « Japanese Tiger ». L'expérience, reportée par le magazine Biocycle (Février 1997), n'a pas été décrite ni publiée dans un magazine scientifique. Le suivi de la dégradation des sacs s'est fait à vue d'œil, et il semblerait qu'ils aient disparu au bout de 20 à 22 jours. Aucun autre paramètre que l'aspect visuel des sacs ne semble avoir été pris en compte.

Tableau I-2 : Présentation des différents résultats de dégradation de polymères en compost d'après la littérature.

Auteurs	***composition du compost***	***molécules testées***	***dégradation***		***remarques particulières***	
			% perte de poids	durée nécessaire à la dégrada-tion (jours)		
Buchanan et al, 1995	3.5 kg de poudre d'alfalfa déshydraté 1.3 kg de poudre de graines de coton 1.4 kg de sciure de peuplier 1 kg de bouse de vache fraîche 1.5 kg de humus de jardin 2.5 kg de journaux finement hachés 480 g de $CaCO_3$ 40 g de $NaHCO_3$ 13 l d'eau *durée du compost : 30 jours* *durée de la phase thermophile : 24 jours* *polymères sous forme de films*	PLA 100	1.5	30	ajouté après le pic thermophile (24° jour)	
		PLA 100	7.8	30	ajouté au début du compost	
		PLA 50	2	30	ajouté après le pic thermophile (24° jour)	
		PLA 50	18.6	30	ajouté au début du compost	
		PCL	100	14		
		Mater-Bi	49.2	14	pas dégradé plus après 14 jours	
		PHB/V (90/10)	100	14		
		PHB	75.8	14		
		CA (DS 1.74)	100	14	plus le degré de substitution est élevé, moins l'acétate de cellulose est biodégradable	
		CA (DS 1.86)	100	14		
		CA (DS 2.06)	100	14		
		CA (DS 2.21)	38	14		
		CA (DS 2.52)	4.1	30		
		CA (DS 2.97)	2.5	30		
		45/55 CAP/PEG (DS 2.09)	47	10		Plus le degré de substitution est élevé, plus c'est le polyester qui perd du poids en premier. Plus la quantité de polyester augmente dans le mélange, plus vite il perd du poids
		55/45 CAP/PEG (DS 2.15)	30	10	la perte de poids est autant due au PEG qu'au CA (15%)	
		55/45 CAP/PEG (DS 2.49)	26	10	La perte de poids est surtout due au PEG (17%)	
		49/51 CAP/PHB (DS 2.75)	5	30		
		60/40 CAP/PLA 50 (DS 2.75)	10	15		
		60/40 CAP/PTG (DS 2.75)	25	10	la perte de poids est surtout due au PTG (22%)	
		60/40 CAP/PEG (DS 2.75)	21	15		
		65/35 CAP/PTG (DS 2.75)	14	15		

I.5.1. Normes faisant intervenir des micro-organismes

Ce sont quasiment les seules normes qui existent relatives à la biodégradation des matériaux plastiques. Il existe des tests impliquant des micro-organismes en conditions aérobies ou anaérobies.

Les milieux dans lesquels sont réalisés les tests de biodégradation de polymères sont variés. On distingue deux grands groupes :

- les tests en milieux synthétiques, contrôlés et reproductibles qui simulent l'environnement naturel. Les conditions de dégradation sont quelque peu éloignées des conditions réelles, mais elles permettent un meilleur contrôle du suivi de la dégradation et un plus grand choix de paramètres à suivre.
- les tests en « milieux naturels », solide (sol, compost, boues activées) ou liquide (eau de mer,...), le matériau est alors dégradé en conditions « réelles » mais non contrôlées et difficilement reproductibles, ce qui rend suivi et comparaison difficiles.

Tableau I.4: Titre des normes et des méthodes standardisées existantes pour évaluer la biodégradabilité des matériaux plastiques.

Norme	Test n°	Titre du test
ASTM	D5210-92	"Test method for determining the anaerobic biodegradation of plastic materials in the presence of municipal sewage sludge" *Méthode pour déterminer la biodégradation anaérobie de matières plastiques en présence de boues d'égouts municipaux*
	D5526-94	"Standard test method for determining anaerobic biodegradation of plastic materials under accelerated landfill conditions" *Méthode standard pour déterminer la biodégradation anaérobie de matières plastiques en conditions de décharge accélérée*
	D5511-94	"Standard test method for determining anaerobic biodegradation of plastic materials under high solids anaerobic digestion conditions" *Méthode standard pour déterminer la biodégradation anaérobie de matières plastiques en conditions de digestion anaérobie de solides*

ASTM	D5271-93	"Standard test method for determining the aerobic biodegradation of plastics materials in an activated sludge wastewater treatment system" *Méthode standard pour déterminer la biodégradation aérobie de matières plastiques dans un système de traitement de boues activées d'eaux usées*
	D5209-92	"Standard test method for determining the aerobic biodegradation of plastics materials in the presence of municipal sewage sludge" *Méthode standard pour déterminer la biodégradation aérobie de matières plastiques en présence de boues d'égouts municipaux*
	D5338-92	"Standard test method for determining the aerobic biodegradation of plastics materials under controlled composting conditions" *Méthode standard pour déterminer la biodégradation aérobie de matières plastiques dans des conditions de compostage contrôlé*
	D5247-92	"Standard test method for determining the aerobic biodegradability of degradable plastics by specific micro-organisms" *Méthode standard pour déterminer la biodégradabilité aérobie de plastiques dégradables par des micro-organismes spécifiques*
	D6003-96	"Standard test method for determining weight loss from plastic materials exposed to simulated municipal solid waste aerobic compost environment" *Méthode standard pour déterminer la perte de masse de matières plastiques exposée à un compostage aérobie de déchets solides municipaux simulés*
	D6094-97	"Standard guide to assess the compostability of environmentally degradable nonwoven fabrics" *Guide standard pour évaluer la compostabilité de fibres non tricotées environnementalement dégradables*

ASTM	D6002-96	"Standard guide for assessing the compostability of environmentally degradable plastics" *Guide standard pour évaluer la compostabilité de plastiques dégradables*
	D5525-94a	"Standard practice for exposing plastics to a simulated active landfill environment" *Pratique standard pour exposer des plastiques à un environnement de décharge active simulée*
	D5951-96	"Standard practice for preparing residual solids obtained after biodegradability standard methods for plastics in solid waste for toxicity and compost quality testing" *Pratique standard pour préparer des résidus solides obtenus après application des méthodes de biodégradabilité des plastiques dans les ordures solides pour tester la toxicité et la qualité du compost*
	D5512-96	"Standard practice for exposing plastics to a simulated compost environment using an externally heated reactor" *Pratique standard pour exposer des plastiques à un compostage simulé en utilisant un réacteur à chauffage externe*
	D5509-96	"Standard practice for exposing plastics to a simulated compost environment" *Pratique standard pour exposer des plastiques à un compostage simulé*
ISO	ISO 846:1997	Plastiques--Evaluation de l'action des micro-organismes
CEN AFNOR	ISO/DIS 14851	Evaluation de la biodégradabilité aérobie ultime des matériaux plastiques en milieu aqueux-- Méthode par détermination de la demande en oxygène dans un respiromètre fermé
	ISO/DIS 14852	Evaluation de la biodégradabilité aérobie ultime des matériaux plastiques en milieu aqueux-- Méthode par analyse du dioxyde de carbone libéré

	ISO/DIS 14853	Plastique--Evaluation de la biodégradabilité anaérobie ultime en milieu aqueux--Méthode par détermination de la production de biogaz
	ISO/DIS 14855	Evaluation de la biodégradabilité aérobie ultime et de la désintégration des matériaux plastiques dans des conditions de compostage contrôlées--Méthode par analyse du dioxyde de carbone libéré
	ISO/DIS 15985	Plastique--Evaluation de la biodégradabilité anaérobie ultime et de la désintégration dans des conditions de digestion anaérobie à teneur élevée en solides--Méthode par analyse du biogaz libéré
JIS Japanese Industrial Standards	K 6950-94	"Determination of the biodegradability of polymeric materials. Aerobic biodegradation in presence of activated sludge." *Détermination de la biodégradabilité de matériaux polymères. Biodégradation aérobie en présence de boues activées.*
OCDE	301B	"Modified Sturm test" (evolved CO2) *Test de Sturm modifié*
	301C	Modified MITI test (I). *Test MITI modifié (I)*
	301D	Closed bottle test. *Test en bouteille fermée*
	301F	Manometric respirometric test. *Test respirométrique manométrique*
	302B	Modified Zahn-Wellens/EMPA test. *Test EMPA modifié*
	302C	Modified MITI test (II). *Test MITI modifié (II)*
	304A	Inherent biodegradability in soil. *Biodégradabilité naturelle dans le sol*

Les milieux les plus souvent utilisés sont les milieux "naturels" solides (ordures ménagères, boues activées de station d'épuration, compost, résidus de décharge, ...) et liquides (eau de mer, ...). Quasiment tous les tests correspondants sont basés sur des méthodes respirométriques (O_2, CO_2, ou CH_4). Seuls quelques très rares tests font appel à d'autres méthodes (voir tableau I.4), plus proches du matériau lui-même, comme le suivi de la masse molaire ou celui des propriétés mécaniques (ASTM D5247-92).

L'inoculum bactérien fait aussi l'objet d'une variabilité importante, autant en qualité, qu'en quantité. En effet, les sources d'inocula (boues activées,...) sont diverses, et il est impossible d'avoir une qualité standard à ce niveau. De même, le volume d'inoculum n'est pas toujours mentionné. L'inoculum doit contenir le moins possible de matières en suspension pour ne pas fausser la mesure. La détermination de la biomasse d'un inoculum est assez compliquée à mettre en œuvre et ne dénombre que la biomasse viable, alors qu'il faudrait dénombrer la biomasse active.

Seules 2 méthodes normalisées existent pour évaluer la biodégradation d'un matériau plastique dans un compost : ASTM D5338-92 et ISO/DIS 14855. Dans les deux, le milieu de dégradation "contrôlé" et son inoculum sont issus d'un compost d'ordures ménagères mûr, les 2 normes ne différant que par leurs profils de température. Le test ISO préconise une température constante de 58°C pendant 45 jours alors que la méthode ASTM suit le profil suivant : 1 jour à 35°C, 4 jours à 58°C, 28 jours à 50°C, puis laissé à 35°C jusqu'à atteindre 45 jours (Sawada, 1998). Le paramètre étudié est le suivi du CO_2. Le pourcentage de biodégradation est obtenu en comparant la quantité de CO_2 produit à partir du matériel testé, à la quantité théorique calculée à partir du carbone organique total.

Le composé de référence le plus souvent utilisé pour évaluer la biodégradation des polymères est la cellulose.

Il est à noter que d'après le test ASTM D 5338, le PLA 100 ne se dégrade pas facilement, tandis que dans les mêmes conditions la PCL se dégrade (Sawada, cité par Sawada, 1998).

I.5.2. Normes faisant intervenir les vers de terre

Les seules normes existantes qui prennent en compte les vers de terre sont des normes ou des recommandations pour l'évaluation de la toxicité des substances. Elles n'ont donc pas pour vocation d'évaluer la biodégradation des matériaux. Elles sont au nombre de 5 (voir tableau I-5).

Tableau I.5 : Titre des normes internationales existantes pour évaluer la toxicité des polluants vis-à-vis des vers de terre.

Norme	Test ou recommandation n°	Titre de la norme
OCDE	TG 207	Earthworm, acute toxicity tests *Ver de terre, tests de toxicité aigüe*
AFNOR	X31-250	Détermination de la toxicité d'une substance vis-à-vis des lombriciens (espèce *Eisenia fetida*), méthode artisol.
ASTM	E 1676-97	Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with lumbricid earthworm *Eisenia fetida* *Guide standard pour la conduite de tests en laboratoire de toxicité dans le sol ou de bioaccumulation avec le lombricien Eisenia fetida*
ISO	ISO 11268/1 Décembre 1993	Qualité du sol : effet des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 1 : Détermination de la toxicité aigüe en utilisant des substrats de sol artificiel
	ISO 11268/2 Mai 1994	Qualité du sol : effet des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 2 : Détermination des effets sur la reproduction
	ISO 11268/3 Juillet 1998	Qualité du sol : effet des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 1 : Lignes directrices relatives à la détermination des effets sur site

Les recommandations ASTM E1676-97 et OCDE TG 207 ne préconisent pas un type de milieu particulier pour les essais. Les milieux tests recommandés sont soit des sols prélevés *in situ*, soit des sols de référence, soit des sols artificiels mais de composition non reproductible (ex : sol à base de tourbe, de kaolinite et de sable industriel dans la recommandation de l'OCDE). Les normes ISO (ISO 11268/1 et ISO 11268/2) utilisent un sol artificiel reproductible à base de Lévilite®, une poudre de silice hydratée, et d'eau bidistillée.

Bien que toutes les normes distinguent les 2 espèces de vers de terre *E.fetida* et *E.andrei*, les recommandations diffèrent. L'OCDE et l'ASTM préfèrent *E.fetida*, alors que la norme ISO recommande *E.andrei* (il s'agit en fait d'une imprécision; *E.fetida* est alors un complexe d'espèces, seul *E.andrei* est précis, Bouché comm.pers.). Par contre, les normes s'accordent sur le fait que les lombriciens utilisés doivent être adultes, âgés d'au moins 2 mois, posséder un clitellum, et avoir un poids compris entre 300 mg et 600 mg.

Le paramètre évalué pour la toxicité est en général la survie des vers de terre traduite par la CL 50 (concentration létale laissant 50% de survivants dans la population) déterminée après 7, 14 ou 28 jours d'exposition selon les normes. L'OCDE demande aussi de donner dans les résultats le nombre de vers de terre vivants et leur poids moyen pour chaque essai. Un autre paramètre uniquement utilisé dans la norme ISO 11268/2 est l'effet des substances sur la reproduction des lombriciens.

Pour toutes les normes, la substance de référence préconisée est le chloroacétamide. Par contre le sol utilisé n'est généralement pas standardisé, et l'espèce de lombricien non plus.

Il n'existe à ce jour aucune norme de biodégradation faisant intervenir les vers de terre, ni en ce qui concerne les plastiques, ni en ce qui concerne d'autres produits chimiques.

I.6. Conclusion de l'étude bibliographique :

Cette analyse bibliographique nous a permis de constater que :

- les polymères de type PLA sont dégradables en milieu aqueux par hydrolyse de la liaison ester. Les produits issus de la dégradation sont des oligomères (petites chaînes de faibles masses molaires), le produit final étant l'acide lactique,
- les polymères de type PLA sont bioassimilables, c'est-à-dire que les résidus de leur dégradation chimique peuvent être bioassimilés par certains micro-organismes,
- le PLA est dégradable par la protéinase K. Cette protéine fongique n'est pas ubiquitaire. Elle n'existe ni chez l'homme, ni chez l'animal, ni chez les vers de terre,

- les variations de propriétés physico-chimiques du PLA en compost n'ont jamais fait l'objet d'une étude systématique,
- le devenir du PLA en présence de vers de terre n'a jamais été étudié,
- les normes de « biodégradation » concernant les plastiques n'utilisent que des micro-organismes, les milieux n'étant pas standardisés et l'évaluation de la biodégradation se faisant par respirométrie,
- les vers de terre sont utilisés seulement en tant qu'indicateurs de la toxicité d'une substance par les normes actuelles,
- il n'existe à ce jour aucune norme de biodégradabilité faisant intervenir les vers de terre, ni en ce qui concerne les plastiques, ni en ce qui concerne d'autres produits chimiques.

Les vers de terre constituent cependant la plus grande masse animale des terres émergées, et une grande partie de leur activité consiste à dégrader la matière organique du sol. Il est donc particulièrement intéressant de les inclure dans une étude de biodégradation de substances, naturelles ou xénobiotiques. En effet, la plupart des problèmes techniques dûs aux micro-organismes seraient résolus. Les vers de terre étant des animaux, on peut très précisément connaître leur biomasse, leur nombre, leur espèce, voire leur âge.

Avant d'étudier le devenir des PLA soumis à l'action des vers de terre, il nous paraît nécessaire de vérifier que ces PLA et leurs produits de dégradation ne sont pas toxiques vis-à-vis des lombriciens, et que ces derniers sont bien capables de les ingurgiter. L'étude préliminaire correspondante sera présentée dans le chapitre II. Dans le chapitre III, nous tenterons de suivre le devenir des PLA en compost artificiel, et dans le chapitre IV nous vérifierons que les vers sont capables d'assimiler les résidus de PLA après compostage lorsque ces derniers représentent la seule source de carbone disponible. Pour préciser le devenir des résidus de PLA dans les tissus lombriciens, nous utiliserons des molécules radiomarquées dans le chapitre V. Enfin, le chapitre VI sera consacré au suivi qualitatif et quantitatif des micro-organismes associés au tractus digestif des vers de terre.

Chapitre II

ETUDES PRELIMINAIRES. LES VERS DE TERRE PEUVENT-ILS INGERER LES PLA ET LEURS PRODUITS DE DEGRADATION?

Chapitre II

Etudes Préliminaires : les vers peuvent-ils ingérer les PLA et leurs produits de dégradation ?

Un des intérêts de notre travail est l'étude de la dégradation de polymères respectueux de l'environnement qui puissent, par exemple, contribuer à la diminution de la masse de déchets plastiques (emballages en particulier) polluants. Les PLA de hautes masses molaires (HMM), malgré les problèmes inhérents à leurs caractéristiques thermo-mécaniques, sont de bons candidats pour cela, car ils peuvent être facilement mis en oeuvre. Lorsqu'ils se dégradent, les polymères PLA génèrent des oligomères qui finissent par donner de l'acide lactique. Ces différents types de molécules se retrouveront donc dans toutes les solutions ou milieux de culture que nous étudierons plus tard.

Toute étude de la biodégradation d'une substance nécessite le contrôle de l'innocuité de cette substance vis-à-vis des organismes utilisés et de l'innocuité des produits que cette substance est susceptible de générer pendant sa décomposition. Le cas échéant, si la substance se révèle toxique, il faut en déterminer la CL 50. C'est la raison pour laquelle dans la première partie de ce chapitre nous allons tenter de répondre à la question : les PLA et leurs produits de dégradation sont-ils toxiques vis-à-vis des vers de terre ?

D'autre part, les vers de terre exploitent, entre autre nourriture, des déchets végétaux présents à la surface du sol. D'après Martin et Stringer (cités par Wright, 1972), les feuilles de certains arbres, dont les feuilles de figuier, sont particulièrement sapides pour les vers. Il en est de même pour le papier filtre à base de cellulose (Bouché, com. pers.). D'après Edwards et Fletcher (1988), pour les épigés la sapidité maximale des feuilles est atteinte à un stade de dégradation microbienne avancée. On ne connaît rien de la sapidité de l'acide lactique, ni *a fortiori* des PLA, vis-à-vis des vers de terre. Ayant besoin, pour notre étude, de faire ingérer des PLA à des vers de terre, il était intéressant de mélanger ces polymères à des substances connues pour être sapides. Dans la seconde partie de ce chapitre, nous tenterons donc de répondre à la question: les vers sont-ils capables d'ingérer les PLA et leurs produits de dégradation ?

II.1 Les PLA et leurs produits de dégradation sont-ils toxiques vis-à-vis des vers de terre ?

II-1-1- Choix des conditions expérimentales

La méthode utilisée ici pour déterminer la toxicité est la norme AFNOR X 31-250 modifiée. La modification porte sur le milieu préconisé, l'artisol (sol artificiel à base de silice en poudre et d'eau) et a été faite d'après les travaux de Bouché et Qiu (1998). Ces auteurs ont montré que les 90 g de sol artificiel pour 20 vers de terre préconisés par la norme peuvent être réduits à 30 g pour 10 vers de terre, sans altérer les résultats. Ce procédé présente l'avantage d'être moins coûteux et d'éviter le gaspillage du matériel.

La méthode consiste à déterminer la CL 50 après avoir mis pendant 14 jours les vers de terre en contact cutané et digestif avec l'artisol contenant la molécule à étudier à différentes concentrations. Au préalable, le sol artificiel doit être humidifié en tenant compte de l'hydrophilie de la molécule à tester.

Substances testées

Lorsque les PLA HMM se dégradent, ils génèrent des oligomères qui eux-mêmes se dégradent en acide lactique. Ces différents types de molécules se retrouveront dans toutes les solutions ou milieux de culture que nous utiliserons plus tard. Ils ont donc été inclus dans la liste des produits à tester, soit:

- PLA 50 en poudre : $\overline{Mp}$ =224000, $\overline{Mn}$ =146000, I=1.55
- OLA 100 en poudre : $\overline{Mp}$ =2000, $\overline{Mn}$ =1600, I=1.23
- DL-Lactate de calcium (SIGMA)
- DL-Lactate de sodium (SIGMA)
- Acide DL-lactique (SIGMA, solution à 85% d'acide)

Le PLA 50 a été synthétisé à partir du lactide racémique, l'amorceur étant du lactate de zinc, produit ne présentant pratiquement pas de toxicité vis-à-vis des animaux. Il a été utilisé pour nos expériences ultérieures.

Détermination de la toxicité

L'artisol est préparé en mélangeant dans un bocal (figure II-1) :

- 30 billes de verre de 1,5 à 2 cm de diamètre (Vetrotex, ref E14,5g). Ces billes servent à donner une structure au sol artificiel, et lui permettre une bonne aération,
- 30 grammes de silice hydratée en poudre Lévilite® (Prolabo) pour remplacer la terre,
- la substance étudiée à différentes concentrations. Pour rajouter la molécule toxique à étudier, que le substrat soit liquide (acide lactique) ou solide (PLA), on ajoute la quantité voulue de substance (en poids) et on diminue d'autant la quantité de Lévilite rajoutée pour travailler à masse constante.
- de l'eau distillée calculée en fonction de la pression hydrique potentielle du mélange substance/Lévilite. La quantité d'eau est ajustée en fonction de la nature de la substance à étudier pour arriver à pF 2,7 (pF=point de flétrissement).

Le point de flétrissement est une donnée empirique qui évalue l'eau libre dans un sol, c'est-à-dire l'eau disponible pour permettre la croissance d'êtres vivants. Dans un sol, les organismes vivent en milieu saturé d'eau dans des conditions aérobies et se trouvent plutôt à l'interface solide/gaz. Dans notre sol artificiel, la porosité est assurée par des billes de verre donnant un support structurel permettant des échanges gazeux. L'atmosphère saturée en eau est assurée par une pression hydrique potentielle (ou succion) exprimée en pascal (Pa). La norme AFNOR X 31-250 a retenu une valeur constante pour tout mélange et pour toute proportion de substrat : pF=2,7 ou 49,23 Pa. La disponibilité en eau dans un sol artificiel doit être suffisante mais sans excès, ainsi la valeur de 49,23 Pa a été choisie pour éviter des stress hydriques au niveau des organismes. Elle correspond à une humidité de sol dont le critère qualitatif est l'obtention d'une pâte malléable mais qui n'exsude pas. Les agronomes ont toujours utilisé la notion de pF de façon empirique sans qu'elle crée de problèmes (Bouché et Qiu, 1998).

Pour obtenir un pF déterminé, la méthode consiste à établir un équilibre à travers une membrane de dialyse. Un des compartiments contient une solution de PEG 6000 dont la concentration correspond à un pF déterminé, et dans l'autre compartiment se trouve le

mélange que l'on veut amener au pF fixé (PE-III). Dans la pratique, les essais réalisés ont conduit à des échecs en raison de la présence de petites molécules (acide lactique, oligomères, etc...) diffusant dans le sens opposé à l'eau absorbée. Pour pallier cet inconvénient, nous avons dû nous satisfaire d'une méthode approximative consistant à obtenir une pâte malléable n'exsudant pas.

Quand l'artisol est prêt, le bocal est placé dans une chambre à 20°C et à l'obscurité pour que les vers de terre soient dans de bonnes conditions de vie et ce pendant 14 jours. Au-delà, les vers vivants sont dénombrés. La CL 50 est déterminée. En pratique on ne fait qu'encadrer les valeurs de la CL 50 par les valeurs expérimentales choisies. La CL50 est exprimée en grammes de substance par gramme de poids sec de milieu.

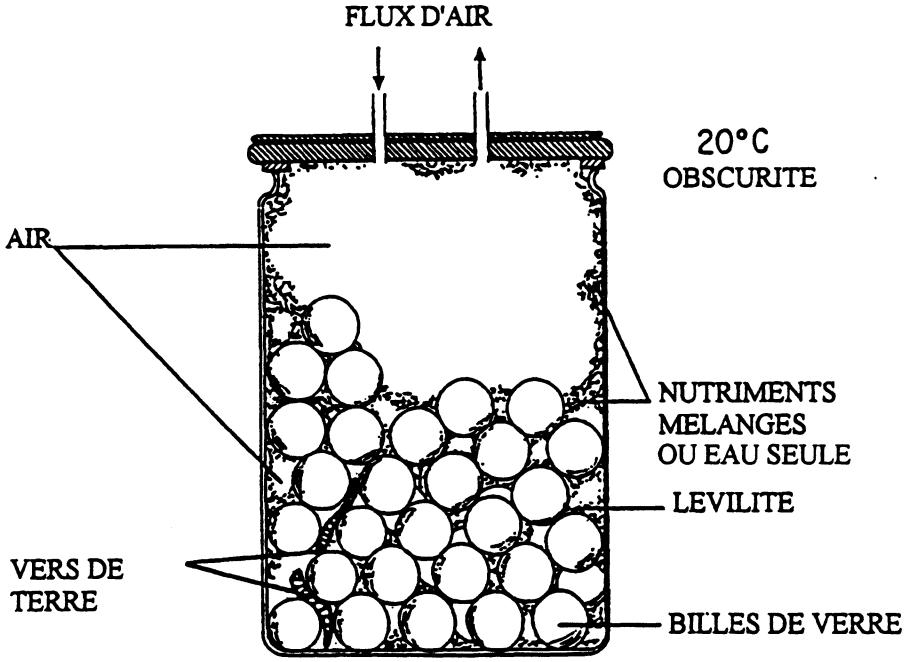


Figure I-1: Schéma du dispositif expérimental utilisé pour la détermination de la toxicité (eau seule), et pour les études de bioassimilation (biosynthésol = avec nutriments mélangés) des OLA et PLA par les lombriciens.

II-1-2- Résultats

Les concentrations testées pour chacune des substances étudiées sont les suivantes : 0; 3,5; 7; 14; 28% en poids sec par rapport au poids sec du mélange utilisé. Il est à noter que la plupart de ces concentrations sont très supérieures à celles que l'on pourrait trouver dans

D'après la figure II-2, l'acide lactique, utilisé pur, a une CL50 très basse pouvant être attribuée à l'acidité qu'il engendre. Le lactate de sodium, acide lactique neutralisé par des ions sodium, a presque le même effet et la même CL50 que l'acide lactique. Cette situation pourrait s'expliquer par le fait que la libération de sodium dans un milieu initialement pauvre en cet élément entraîne un déséquilibre de la pompe Na^+/K^+ des vers de terre. Par contre le lactate de calcium a une CL50 assez élevée (entre 7 et 14% en poids sec). Il faut noter, d'une part, qu'un sol réel sera relativement riche en ions calcium (et pauvre en sodium), d'autre part, qu'il est peu probable d'y atteindre des concentrations en lactate importantes.

On peut donc conclure que l'acide lactique et les lactates de sodium et de calcium ne seront pas toxiques en milieux compost modèles ou réels.

II-1-2-2 OLA

La méthode de détermination du pF étant dans ce cas également inapplicable, nous n'avons pas déterminé la tension de pression hydrique potentielle du mélange lévilite/OLA.

D'après la figure II-2, le composé OLA 100 a aussi une CL 50 élevée (>10% en poids sec). Ceci s'explique par le fait que plus la chaîne carbonée d'un acide est longue, plus cet acide a tendance à être faible. De plus, comme la masse molaire augmente, pour une même masse de produit, la concentration en COOH, c'est-à-dire en extrémités de chaîne, est beaucoup plus basse dans les oligomères. Ces deux raisons expliquent que les oligomères ne sont pas toxiques à des doses susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement.

II-1-2-3 PLA 50

Comme pour les autres produits, l'humidité a été ajustée par comparaison qualitative avec l'artisol pur.

Le PLA 50 de hautes masses a une CL 50 très élevée, supérieure à la limite des concentrations testées (28%). Sa composition chimique n'entraîne pas de toxicité. Cela était prévisible car le PLA n'est normalement pas métabolisé directement.

II-1-3- Conclusion

Les résultats précédents nous indiquent qu'aucun des produits testés ne devrait être toxique pour les vers de terre aux concentrations testées que ces derniers seraient susceptibles de trouver dans un environnement naturel.

II.2 Les vers sont-ils capables d'ingérer les PLA et leurs produits de dégradation ?

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons mélangé les polymères à des feuilles de figuier et du papier filtre selon deux méthodes:

-une méthode par imprégnation

-une méthode par étalement

II-2-1 Matériel et méthodes

II-2-1-1 Matériel

Support:

- Des feuilles de figuier tombées de l'arbre et dans un état assez avancé de décomposition (donc de sapidité maximale pour les vers), sont prélevées en automne. Elles sont traitées telles quelles, sans être coupées.
- Du papier filtre (Baeckeroot) découpé en carrés de 5 cm de côté. Le découpage a été effectué après traitement pour la méthode par étalement, et avant traitement pour la méthode par imprégnation.

Substances testées:

- OLA 100 : $\overline{Mp} = 2000$, $\overline{Mn} = 1600$, I= 1,2
- PLA 50 : $\overline{Mp} = 227000$, $\overline{Mn} = 146000$, I= 1,5

II-2-1-2 Méthode d'imprégnation

Le PLA ou l'OLA sont dissous dans de l'acétone. La feuille entière ou le papier filtre découpé sont alors trempés 10 mn dans cette solution, laissés sécher et finalement égoutter une demi-heure. L'opération est recommencée une fois, puis le support est laissé une journée à l'air libre pour permettre l'évaporation du solvant.

II-2-1-3 Méthode d'étalement

Le PLA (ou l'OLA) est dissous dans très peu d'acétone. On obtient une solution visqueuse qui est étalée au pinceau sur les feuilles de figuier ou sur des grands morceaux de papier. La première couche est laissée sécher une heure pour obtenir la consistance d'un gel. Une deuxième couche est appliquée. Le tout est laissé une journée à l'air libre pour laisser le solvant s'évaporer.

II-2-1-4 Tests d'ingestion

Les feuilles de figuier sont coupées en deux. Le papier filtre coupé en carrés de 5 cm environ. Les divers échantillons ainsi obtenus sont placés séparément dans des boîtes de Pétri en verre, avec 3 *E.andrei* adultes par boîte. De l'eau est rajoutée pour permettre une bonne humidification des vers. Il est à noter que dans ces expériences, la quantité d'OLA ou de PLA est d'environ 50% en poids humide total. Le pH est régulièrement évalué dans les boîtes de Pétri par papier pH.

II-2-2 Résultats-discussion

La défécation par les lombriciens des PLA 50 ou OLA 100 a été utilisée comme critère pour décider de l'ingestion. Le début de défécation a été apprécié à partir de l'apparition dans les fèces de morceaux de polymère blancs. Le tableau II-2 montre à quel moment les supports ont commencé à être déféqués.

Tableau II-2 : Tests d'ingestion des composés de type PLA sur supports naturels.

	Début d'ingestion (jours) / (examen visuel)	
polymère / support	OLA 100	PLA 50
papier filtre imbibé	13	
papier filtre enduit	26	
feuilles de figuier imbibées	26	
feuilles de figuier enduites	26	6

Il faut noter que l'appréciation dans le cas du papier imbibé de PLA 50 HMM s'est révélée difficile en raison de l'identité de couleur entre le support et le produit testé. Dans le cas des feuilles de figuier imbibées ou enduites de PLA 50 HMM, seule la partie végétale a été ingérée, la couche de PLA restant sous forme de résidus.

II-2-2-1 OLA 100

D'après les résultats précédents, on peut conclure que les vers mangent plus volontiers la feuille de figuier ou de papier que les polymères étalés dessus. Cependant, dans les expériences avec feuilles de figuier, des fèces ont été retrouvés qui contenaient des morceaux de OLA 100, preuve qu'ils avaient bien été ingérés (figure II-3). Il est à noter que dans certaines boîtes, les vers sont morts après 6 à 7 jours à cause du pH trop bas (jusqu'à 5) dû à la dégradation des OLA 100 en acide lactique, le milieu n'ayant pas été tamponné.

Figure II-3: Fèces contenant des OLA 50 après 26 jours de mise en contact des vers de terre avec de l'OLA 50 étalé sur des feuilles de figuier.

II-2-2-2 PLA 50

On peut constater (figure II-4) que les vers ingèrent et dégradent très rapidement la feuille de figuier en laissant intacte la pellicule de PLA, plus rigide que les OLA. Il en est de même pour les feuilles imbibées : les endroits où l'imbibition ne s'est pas bien faite sont troués car les vers ont mangé la feuille de figuier mais ont laissé le PLA. Cependant, un fèces a été retrouvé enveloppé dans un rouleau de PLA (figure II-5). Ce morceau de PLA, très petit et pouvant donc aisément passer par le prostomium d'un ver de terre, a donc pu être avalé en même temps que le morceau de feuille de figuier. Il semblerait donc que le PLA puisse aussi être ingéré, mais uniquement lorsqu'il est déjà fragmenté en morceaux suffisamment petits pour rentrer dans la bouche d'un lombricien. Ainsi l'addition de molécules sapides n'apparaît que partiellement efficace.

Figure II-4: Pellicule de PLA 50, 6 jours après mise en contact des vers de terre avec des PLA 50 étalés sur des feuilles de figuier.

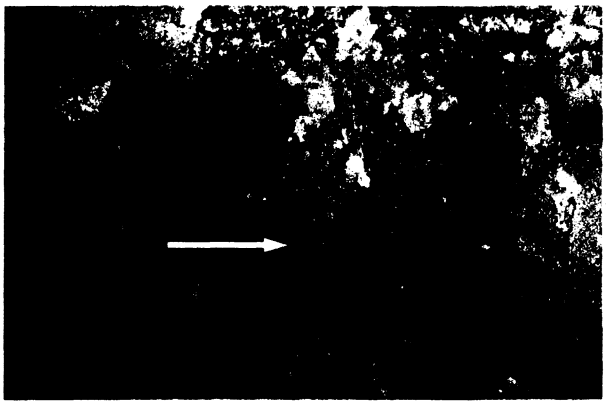


Figure II-5: Unique fèces de PLA 50 6 jours après mise en contact des vers de terre avec des PLA 50 étalés sur des feuilles de figuier.

II-2-3 Conclusion

Les OLA et PLA peuvent accidentellement être ingérés par les vers, mais n'ont probablement pas de sapidité en eux-mêmes. La texture de l'ingestat est très importante. L'OLA, très souple, est facilement ingéré. Au contraire le PLA, très rigide, ne peut être ingéré que s'il est fragmenté. Ceci laisse espérer que les vers de terre joueront un rôle dans la bioassimilation des PLA sans présumer ni de l'importance de ce rôle, ni à quel stade de la dégradation ils interviendront.

Donc, pour que les vers de terre ingèrent les polymères, il faudra les réduire en petits fragments, ou mieux en poudre fine pour empêcher les lombriciens de faire le tri entre la

matière « naturelle » et les polymères. Le compostage ou un vieillissement en milieu humide ou aqueux devraient faciliter l'ingestion en transformant le polymère de hautes masses en oligomères.

Chapitre III

DEGRADATION DANS DIFFERENTS MILIEUX MODELES EN L'ABSENCE DE VERS DE TERRE

Chapitre III

Dégradation dans différents milieux modèles en l'absence de vers de terre

Le but de ce chapitre préalable à l'étude de la bioassimilation des polymères de type PLA par les vers de terre est de suivre le comportement de ces polymères dans deux milieux modèles : un compost et un milieu synthétique (le biosynthésol).

La littérature a montré que les divers essais de compostage de plastiques ont été réalisés avec des composts de compositions totalement différentes (cf. I-4). Nous utiliserons dans cette étude des ordures ménagères (OM) modèles, de composition sélectionnée pour être reproductible et être la plus proche possible de la composition moyenne d'ordures ménagères françaises, ordures dans lesquelles se trouvent en général les objets susceptibles d'être dégradés et dont nous voulons étudier la matière de base (sacs, emballages..).

Dans un compost, le dégagement de chaleur métabolique provenant de l'activité microbienne produit une élévation importante de la température qui peut atteindre 75°C (Bouché et Nougaret, 1997). La température diminue ensuite progressivement. Afin de nous placer dans des conditions correspondant à une certaine réalité industrielle, nous avons choisi de reproduire dans notre compost modèle les variations de température observées en moyenne depuis 1992 dans l'unité de lombricompostage d'ordures ménagères exploitée par la SOVADEC (Bouché et Nougaret, 1997), c'est-à-dire des températures variant entre 20°C et 75°C. Or, les PLA sont sensibles à la chaleur, cette dernière accélérant leur hydrolyse. Le comportement de différents PLA à 37°C a déjà été examiné en milieux aqueux modèles de fluides biologiques par Li (1990a et c) dans le cadre d'études liées aux applications médicales de ces polymères. Le compostage étant exothermique, il était intéressant d'étudier le comportement des PLA à des températures élevées comparables à celle rencontrées en compostage. Nous nous proposons donc, dans une étude préliminaire, de suivre le devenir de composés PLA soumis aux températures suivantes : 70°C, 60°C et 50°C.

A l'aide du compostage modèle nous avons choisi d'étudier la dégradation de deux polymères, PLA 50 et 96, tous deux de hautes masses molaires. Un milieu témoin négatif

stérile, constitué de tampon phosphate, sera soumis aux mêmes conditions de température. Dans le compost modèle, le matériau sera dégradé dans des conditions « réelles » mais plus ou moins bien maîtrisées, comme c'est généralement le cas lorsque des milieux biologiques sont impliqués. C'est pourquoi nous avons décidé de mettre également au point un milieu totalement synthétique de composition reproductible afin de suivre de manière mieux contrôlée la dégradation des PLA. Ce milieu, appelé « biosynthésol », servira à suivre la dégradation des polymères et à vérifier la bioassimilation de ces derniers par les vers de terre.

Dans ce chapitre, nous considèrerons ces objectifs par étapes, en partant du plus simple (hydrolyse en milieu tamponné stérile à différentes températures) pour passer au compostage modèle et en milieu synthétique, l'objectif étant d'essayer de différencier les influences des principaux facteurs intervenant dans la dégradation (hydrolyse, température, micro-organismes).

III-1 Etudes de dégradation hydrolytique de PLA en tampon phosphate

III-1-1 Matériel et méthodes

Nous avons étudié les polymères suivants :

- PLA 50 ($\overline{Mp}$=112000, $\overline{Mn}$=65000, I=1,7) pour les études à 70°C et 50°C, et PLA 50 ($\overline{Mp}$=84000, $\overline{Mn}$=58000, I=1,45) pour la série 60°C
- PLA 96 : $\overline{Mp}$=97000, $\overline{Mn}$=54000, I=1,8

Ces PLA ont été conditionnés sous forme de tigettes cylindriques de 3 cm de long et 1 mm de diamètre obtenues par extrusion (cf. PE-II-2). Les PLA 50 étaient amorphes tandis que le PLA 96 était semi-cristallin.

Le protocole expérimental suivant a été retenu : des éprouvettes de PLA sont placées par 2 dans des piluliers après avoir été pesées. 15 ml de tampon phosphate 0,05 M à pH 6,8 et 2 g/l de NaN_3 (agent antibactérien) sont ajoutés. Un lot de plusieurs piluliers est préparé pour chaque température et placé dans une étuve à la température voulue. Les vitesses de dégradation aux températures choisies n'étant pas connues, nous avons été amenés à retirer les éprouvettes du milieu de dégradation selon une appréciation visuelle de l'évolution. Au retrait les éprouvettes récupérées sont séchées sous vide. Quand elles sont trop dégradées, c'est-à-dire quand elles deviennent difficilement récupérables, le surnageant est déversé dans

un pilulier propre, les éprouvettes étant laissées dans le pilulier initial pour y être séchées *in situ*. Le tout est ensuite congelé pour analyse ultérieure.

L'apparition de produits de dégradation solubles dans le surnageant a été suivie par HPCE, les variations de masse molaire et de température de fusion ont été suivies par SEC et par DSC respectivement. La perte de poids et l'absorption d'eau ont aussi été mesurées.

III-1-2 Résultats de dégradation du PLA 50

L'examen visuel de l'état des tigettes de PLA après passage dans le tampon phosphate (figure III-1) montre qu'une différenciation coeur-surface apparaît à partir d'un certain temps de dégradation, lui-même fonction de la température. Ainsi, la comparaison entre les figures III-1A et B traduit l'influence du temps entre 3 et 8 jours à 50°C. La comparaison entre III-1A et C montre l'influence de la température entre 50°C et 70°C pour un temps de 3 jours.

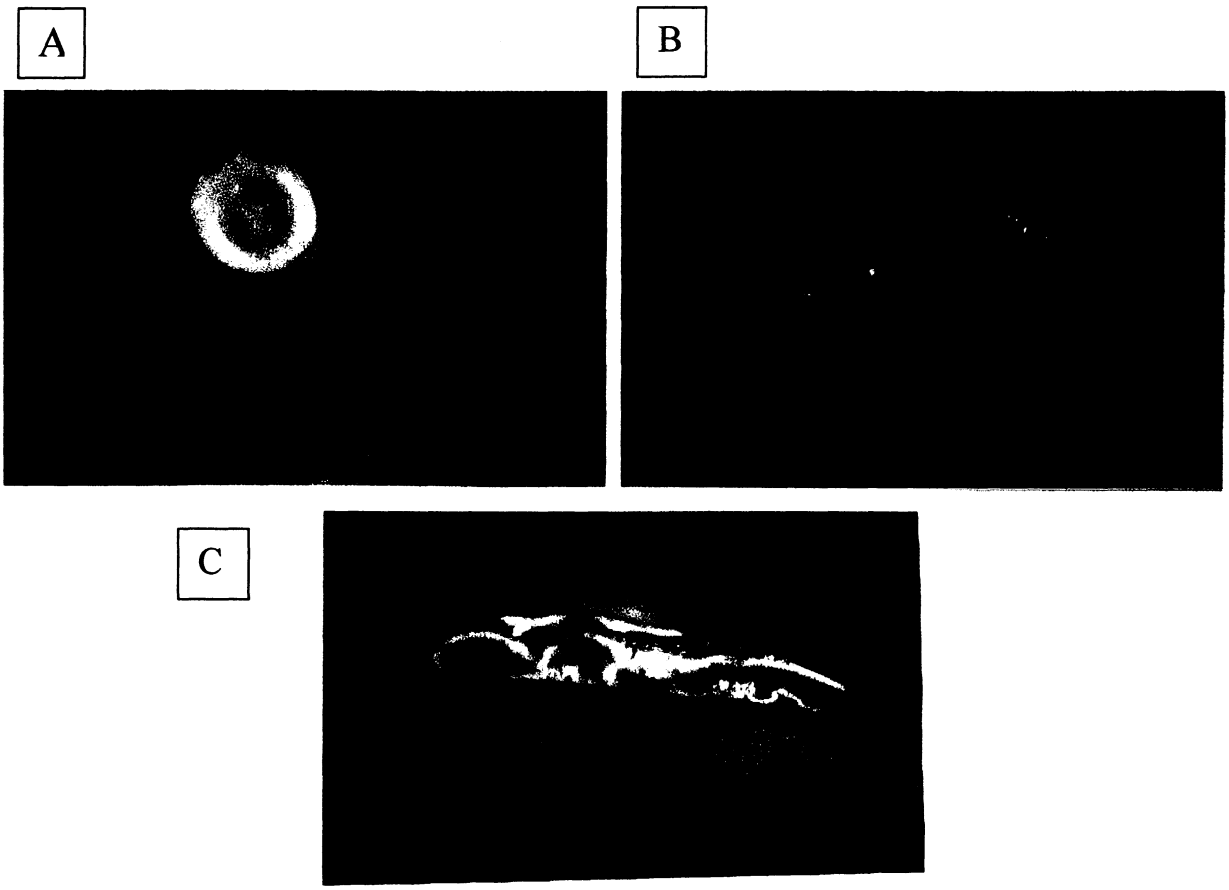


Figure III-1 : Photos du PLA 50 en tampon phosphate soumis à différentes températures: A) 50°C après 3 jours (*27), B) 50°C après 8 jours (*10), C) 70°C après 3 jours (*30).

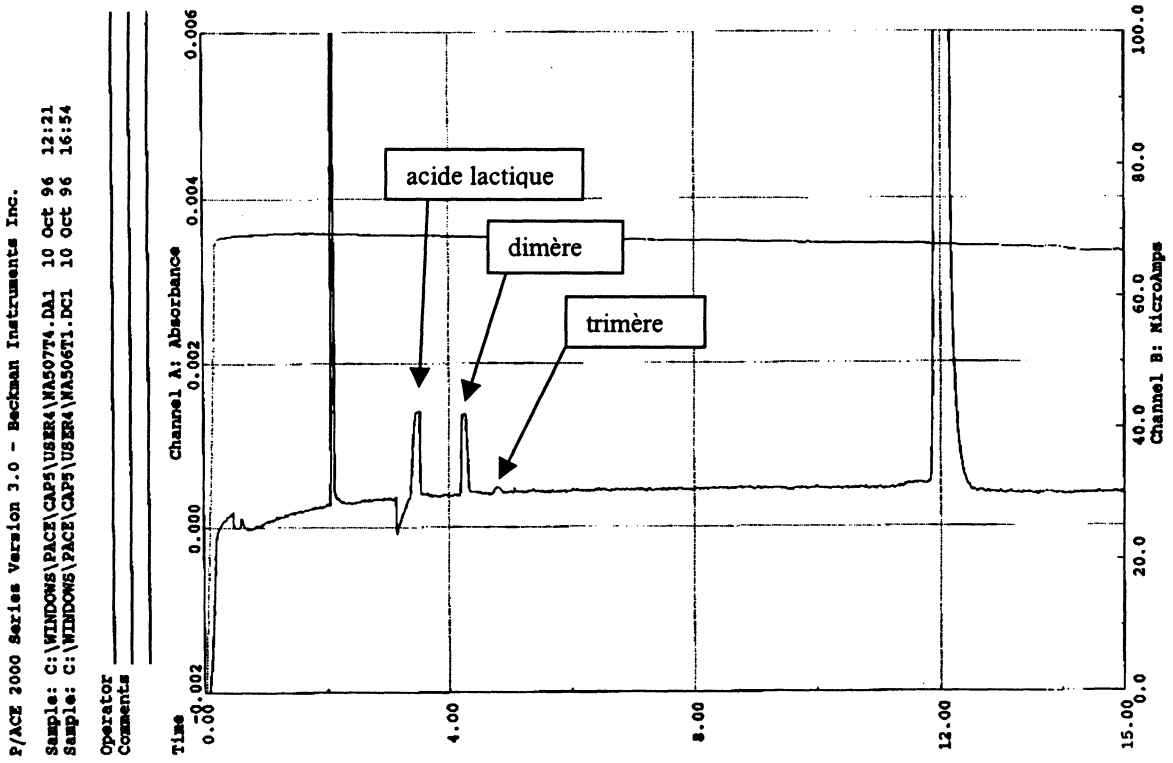


Figure III-2: Electrophorégramme d'une solution aqueuse (en tampon phosphate) de PLA 50 après 4 jours de dégradation à 70°C.

Pour chacun des échantillons, il y a aussi aplatissement et déformation en même temps qu'apparaît la différenciation coeur-surface. Ces déformations sont d'autant plus marquées que la température à laquelle est soumise le PLA est au-dessus de sa T_v.

Les produits de dégradation détectés en HPCE (figure III-2) sont l'acide lactique, le dimère et le trimère pour le PLA50. Le suivi de la dégradation de PLA 50 à 37°C par HPCE a déjà été étudiée par Braud *et al.* (1996) qui ont détecté les oligomères formés jusqu'au nonamère. Ce n'est pas le cas ici, ce qui peut s'expliquer par la température très élevée qui dégrade très rapidement les plus grands des oligomères. Les figures III-3A, B et C présentent les évolutions de la proportion des différents petits oligomères détectés dans des milieux de dégradation aux trois températures testées. On constate que l'acide lactique croît régulièrement tandis que le dimère passe par un maximum très prononcé, le trimère existant à l'état de trace. Ces tendances sont conformes à celles observées pour une dégradation menée à 37°C (Braud *et al.*, 1996).

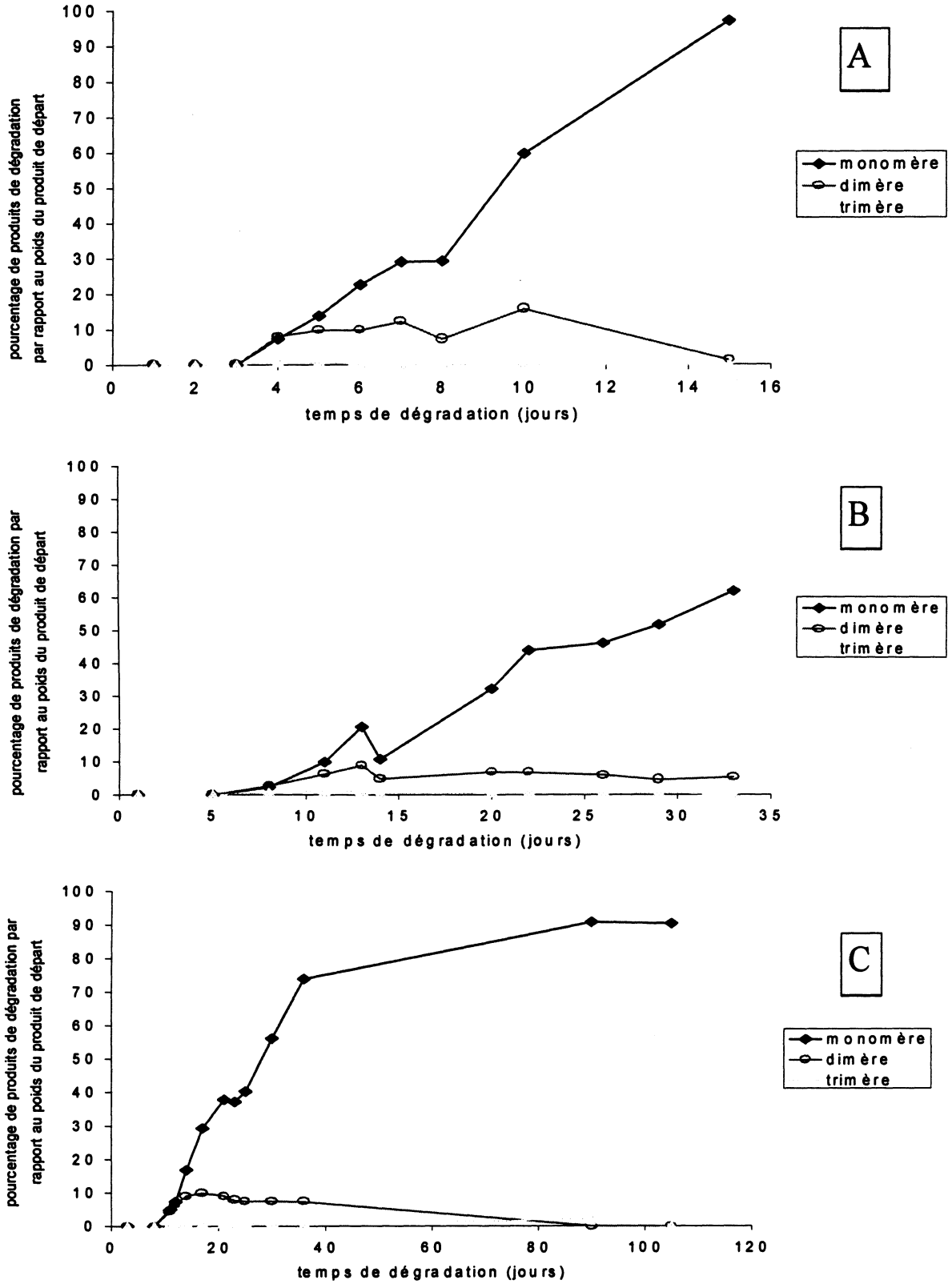


Figure III-3 : Cinétique d'apparition de produits de dégradation du PLA 50 soumis à différentes températures dans du tampon phosphate:
A: à 70°C
B: à 60°C
C: à 50°C

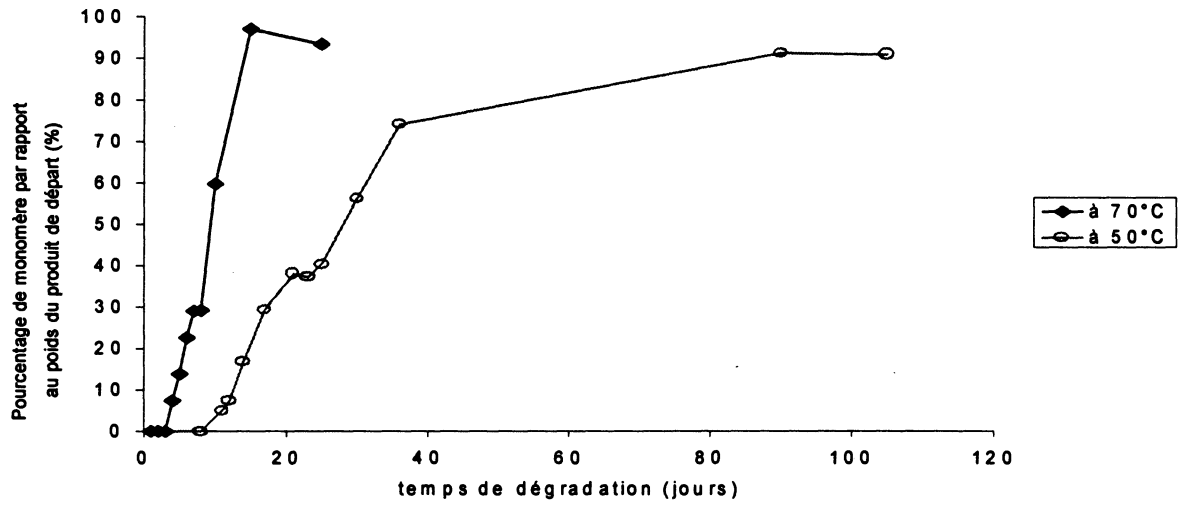


Figure III-3 D : Apparition du monomère de PLA 50 à différentes températures.

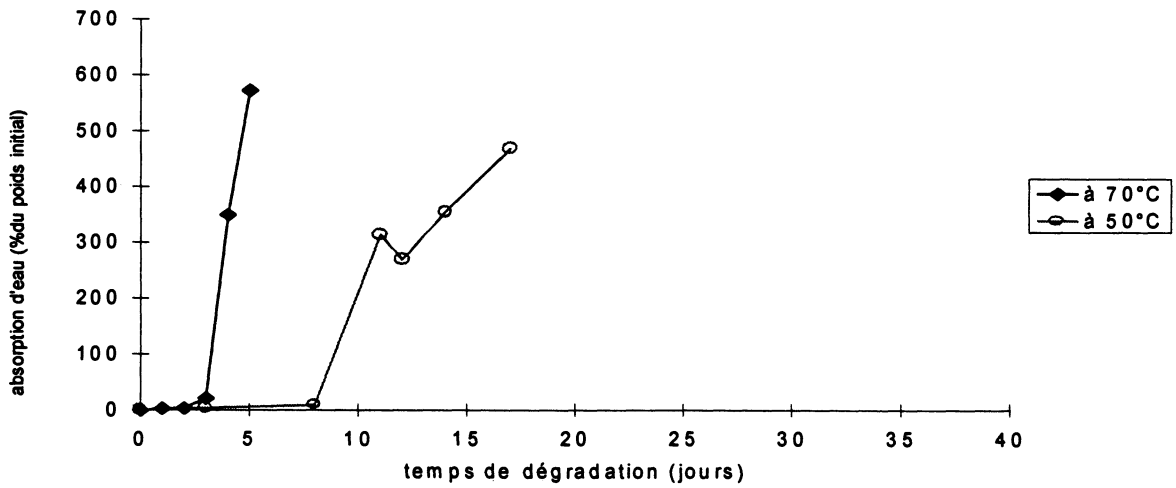


Figure III-4 : Absorption d'eau du PLA 50 dans du tampon phosphate à différentes températures.

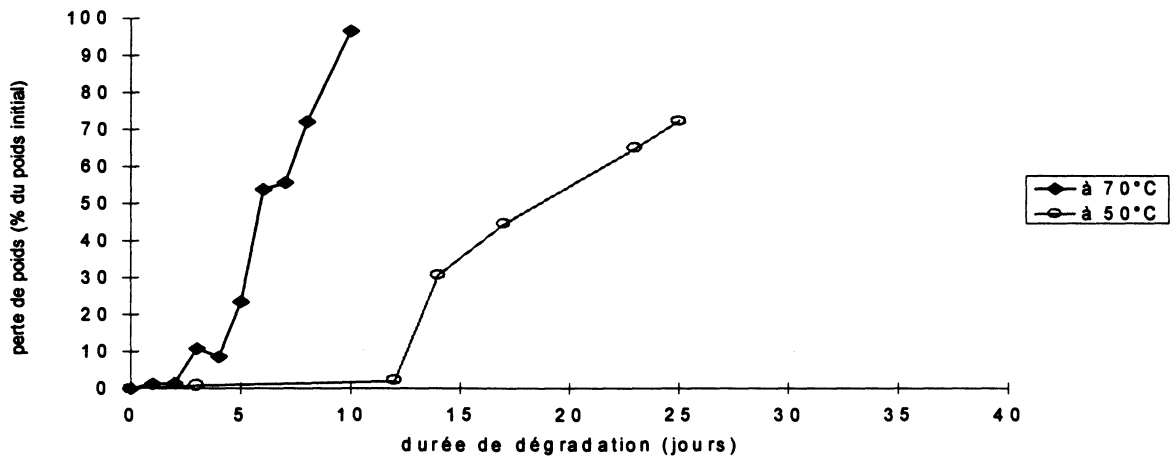


Figure III-5 : Perte de poids du PLA 50 dans du tampon phosphate à différentes températures.

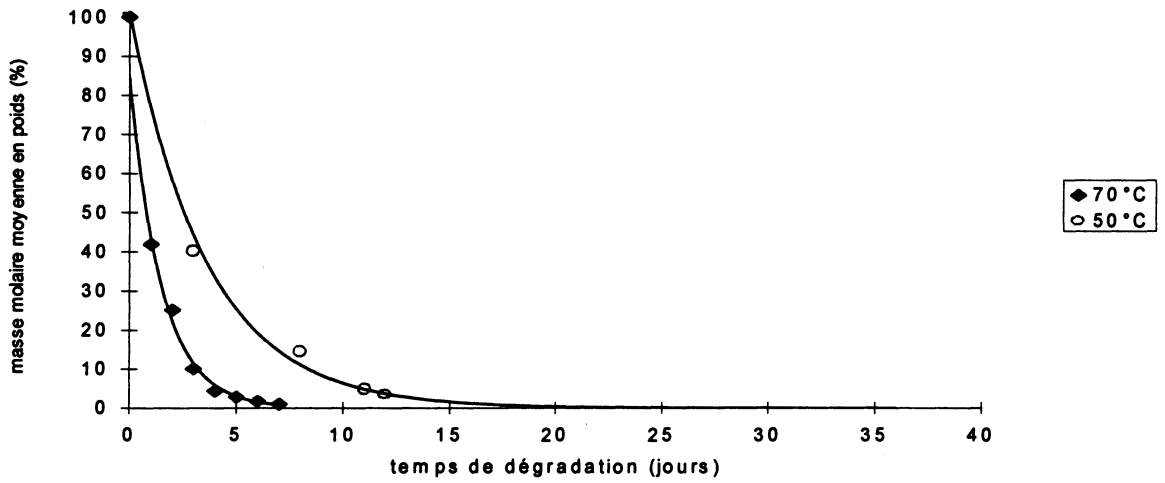


Figure III-6 : Variation de la masse molaire du PLA 50 en tampon phosphate soumis à différentes températures.

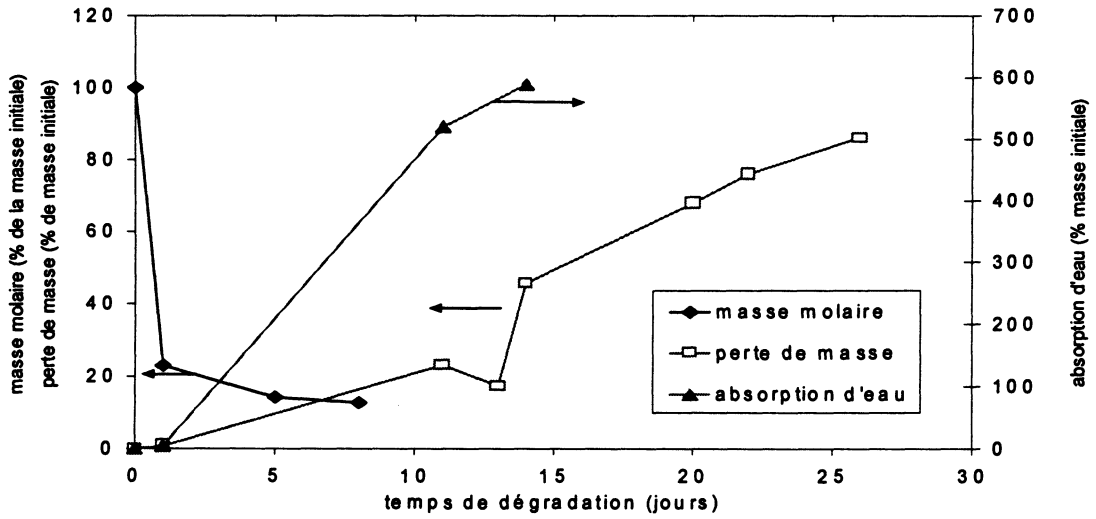


Figure III-7 : Variation de masse, de masse molaire et absorption d'eau pour le PLA 50 à 60°C.

D'après la figure III-3D, l'acide lactique apparaît plus tôt à 70°C qu'à 50°C, et la quantité de monomère atteint son maximum plus rapidement à 70°C qu'à 50°C.

L'absorption d'eau (figure III-4) et la perte de masse (figure III-5) sont très rapides. L'échantillon de PLA 50 prend du poids et absorbe de l'eau d'autant plus tôt que la température est élevée (à partir du 3è jour à 70°C).

La diminution de la masse molaire dépend de la température à laquelle le PLA est soumis (figure III-6). La masse molaire du PLA 50 diminue plus rapidement à 70°C qu'à

Tableau I-2 (suite) : Présentation des différents résultats de dégradation de polymères en compost d'après la littérature.

Auteurs	***composition du compost***	***molécules testées***	***dégradation***		***remarques particulières***	
			% perte de poids	durée nécessaire à la dégrada-tion (jours)		
Gross et al, 1995*	F2	CA (DS 1.7)	100	7	disparu	la perte de poids des films dépend de la composition du compost
	F1	CA (DS 2.5)	100	18	disparu	
	A, B, C, F1, F2	CA (DS 1,7)	100	7	disparu	
	D, E *polymères sous forme de films*	CA (DS 1.7)			peu de perte de poids, met plus longtemps à disparaitre	
Gilmore et al, 1992	compost municipal de feuilles mortes *durée du compost : 186 jours* *durée de la phase thermophile: 3 semaines à 40°C* *polymères sous forme de feuilles*	amidon (6%)/PP	0.3	186		
		amidon(12%)/LLDPE	1	186		
		PCL(30%)/LLDPE	2	186	la perte de poids est surtout due au PCL	
		PHB/V	58.8	186	en 3 mois: colonisation par les champignons. commence à se désintégrer après 6 mois	
Yue et al, 1995	feuilles de chêne et d'érable broyées 37g papier broyé13g bouse de vache sèche 4g déchets de viande 5g verre 1.9g urée 1.4g sciure 1.4g déchets alimentaires(pois et carottes 6g,miettes de pain de mie 4.5g, lait écrémé en poudre 1.5g) extrait de compost 1g 90 ml d'eau pour 100g *55°C pendant toute l'expérience (21 jours pour leP(3HB) et 15 jiours pour l'autre) ,humidité 54%* *C/N=20* *Polymères sous forme de films*	P(3HB-co-20%-3HV)	300mg/ mm^2	12		
		P(3HB)	120mg/ mm^2	18		

Tableau I-3: Composition des composts artificiels utilisés par Gross *et al.*, 1995.

	Formulation des composts						
Nature des composants	mix 1	mix2	A	B	C	D	E
feuilles d'arbre	45,0	47,0					
papiers broyés	16,5	17,0	17,0	33,0	33,0	33,0	33,0
déchets alimentaires	6,7	7,0	7,0				
déchets de viande	5,8	6,0	6,0				
bouse de vache	17,5	18,0	18,0	15,0	15,0		10,0
sciure	1,9	2,0	2,0				
copeaux d'aluminium et d'acier	2,4						
billes de verre	1,3						
urée	1,9	2,0	2,0				3,0
bois explosé à la vapeur			47,0	33,0	33,0	33,0	33,0
thym séché				18,0			
alfalfa séché					18,0		
crottes de lapin						33,0	
amidon							20,0
inoculum de compost	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
rapport C/N	14,0	13,9	21,2	61,4	38,2	49,9	24,7

I.5-Tests et normes relatifs à la dégradation et à la biodégradation des "plastiques"

Notre but dans cette partie n'est pas de faire une étude exhaustive des normes existantes, sachant que la plupart sortent du cadre de notre étude. Il s'agit d'avoir une vue d'ensemble de celles qui concernent le compost et plus particulièrement le lombricompost. Nous allons dans un premier temps évoquer les normes de biodégradation des matériaux plastiques faisant intervenir les micro-organimes. Nous parlerons ensuite des normes qui font intervenir les vers de terre.

50°C, ce qui est en concordance avec la perte de poids et l'apparition de produits de dégradation.

La perte de poids, l'absorption d'eau et la déformation des éprouvettes ne sont détectables que lorsque la différenciation coeur-surface commence à apparaître (entre le 2e et le 3e jour à 70°C), la dégradation conduisant à une plastification de la matière constituant les échantillons.

La figure III-7 montre les résultats obtenus avec le PLA 50 à 60°C concernant la perte de masse, l'absorption d'eau et la perte de masse molaire. Les polymères utilisés pour la série à 60°C étaient issus d'un lot différent de ceux pour les séries 70°C et 50°C. Nous ne pouvons donc pas vraiment comparer entre eux les résultats obtenus avec ces deux lots. En effet, Vert *et al.* (1981) ont montré que des lots différents d'acide poly-L-lactique donnaient des résultats différents lors d'expériences de résorption de ce matériau. Cependant les variations à 60°C suivent des tendances comparables à celles observées pour les autres températures.

On peut donc constater que la dégradation des PLA 50 HMM est d'autant plus rapide que la température est élevée. Ce sont des résultats auxquels on pouvait s'attendre étant donné que le PLA 50 est très sensible à la chaleur et à l'humidité. De plus, un polymère amorphe au-dessus de sa T_v devient complètement mou, les coefficients de diffusion des composés solubles augmentent. Ainsi nous avons constaté qu'à 70°C dans un milieu aqueux stérile le PLA 50 est déjà quasi entièrement dégradé en 6 jours. Il est possible qu'en compost la vitesse de dégradation soit au moins aussi rapide. Cependant, l'eau est un peu moins disponible dans un compost que dans du tampon phosphate ; ce dernier est un milieu liquide aqueux, alors que le compost est un milieu solide seulement humide, la diffusion de l'eau dans le polymère sera donc plus lente. De même dans un compost la diffusion des oligomères solubles en milieu aqueux sera défavorisée. Les deux phénomènes ont des effets opposés sur la vitesse de dégradation intra-échantillon. Le bilan dépendra de l'importance relative de chaque contribution, ce qui n'est pas prévisible simplement.

III-1-3 Résultats de dégradation de PLA 96

L'examen visuel de l'état des tigettes de PLA 96 après passage dans le tampon phosphate (figure III-8) nous montre qu'il n'y a aucune différenciation coeur-surface, le PLA

96 devient blanc et se fendille lorsqu'on le sèche. L'absence de coeur translucide est conforme à la semi-cristallinité du PLA 96. La différenciation coeur-surface doit avoir eu lieu mais n'est pas observable visuellement compte tenu de la nature solide des résidus oligomères formés, conformément à ce qui a été observé par Li et al. (1990c) à 37°C.

Figure III-8 : Tigettes de PLA 96 soumis à 70°C en tampon phosphate. A) Temps de dégradation : 0 jour. B) Temps de dégradation : 3 jours.

L'acide lactique et le dimère sont les produits de dégradation du PLA 96 détectables en HPCE. La quantité d'acide lactique libéré au cours du temps est plus importante à 70°C qu'à 50°C et 60°C (figure III-9). Il y a peu de différence entre ces deux dernières températures. Nous sommes probablement au niveau des incertitudes expérimentales.

L'absorption d'eau (figure III-10) et la perte de masse (figure III-11) sont d'autant plus rapides que la température est élevée. Le PLA 96 absorbe moins d'eau et perd de la matière beaucoup moins rapidement que le PLA 50 aux mêmes températures (figures III-4 et III-5)

La masse molaire (figure III-12) diminue presque à la même vitesse à 70°C qu'à 60°C. Cependant, Agarwal *et al.* (1998) ont montré que la masse molaire de l'EcoPLA (~PLA 97,5) dans un environnement abiotique après 360 heures de dégradation à 60°C, 50°C et 40°C est d'autant plus basse que la température est élevée. La T_f diminue très faiblement (figure III-13 A et B), ce qui nous permet d'augurer du devenir du PLA 96 en compostage. Nous aurons en effet dans un compost les deux mêmes facteurs, à savoir la température et l'humidité, mais il y aura en plus des micro-organismes, et dans un lombricompostage il y aura des vers de terre. La diminution drastique de la masse molaire que l'on observe dans du tampon phosphate à 70°C devrait se poursuivre à 60°C et à 50°C, même si c'est avec une intensité moindre.

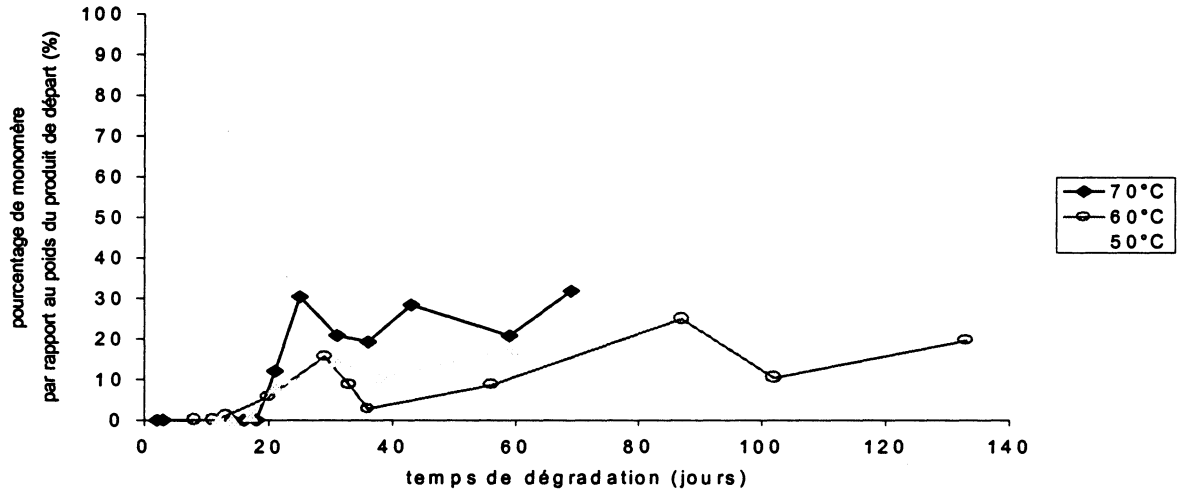


Figure III-9 : Apparition du monomère après dégradation du PLA 96 soumis à différentes températures dans du tampon phosphate.

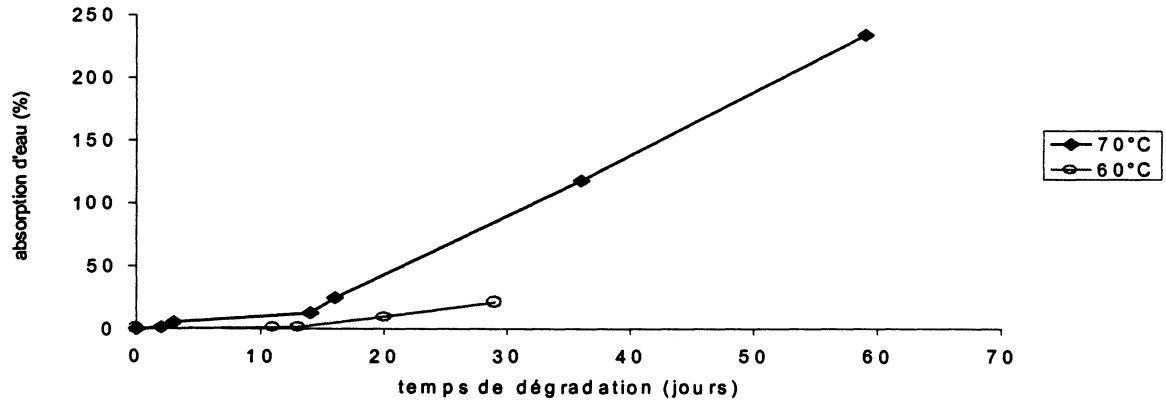


Figure III-10 : Absorption d'eau du PLA 96 dans du tampon phosphate à différentes températures.

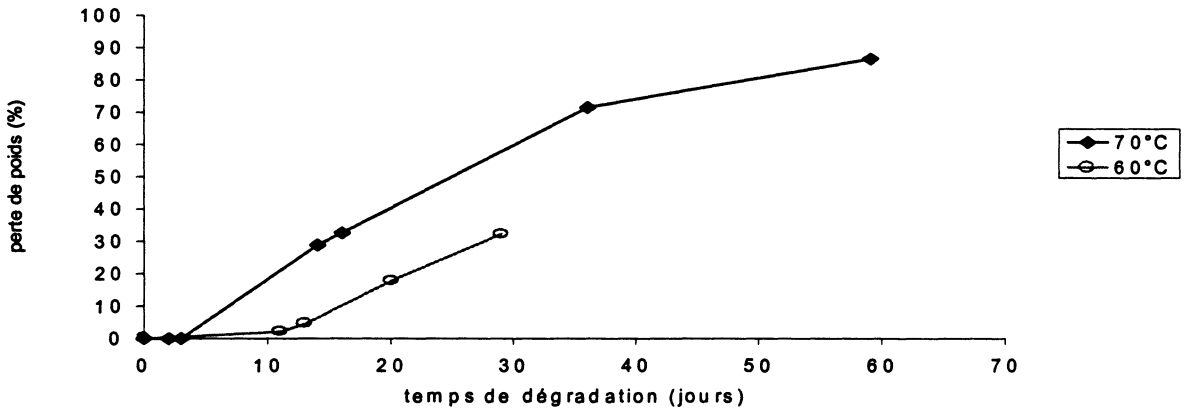


Figure III-11 : Perte de poids du PLA 96 dans du tampon phosphate à différentes températures.

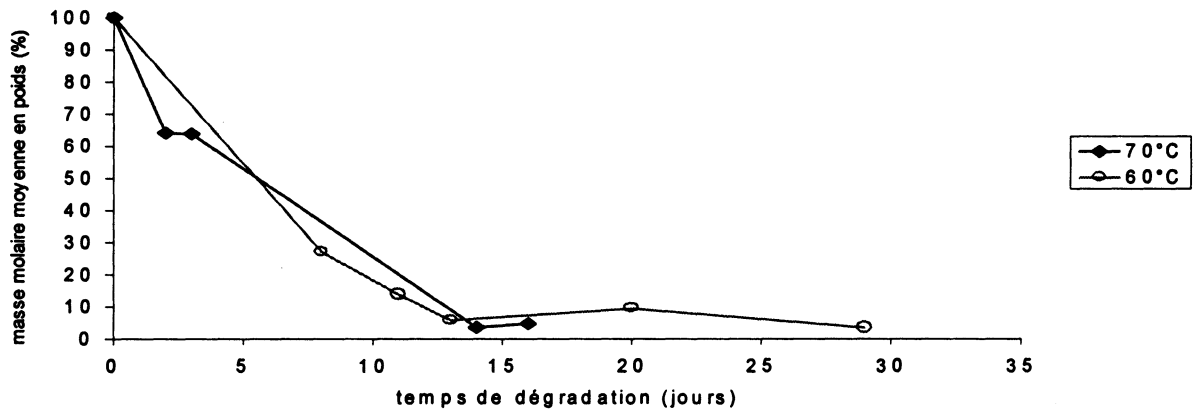


Figure III-12 : Variation de la masse molaire du PLA 96 en tampon phosphate soumis à différentes températures.

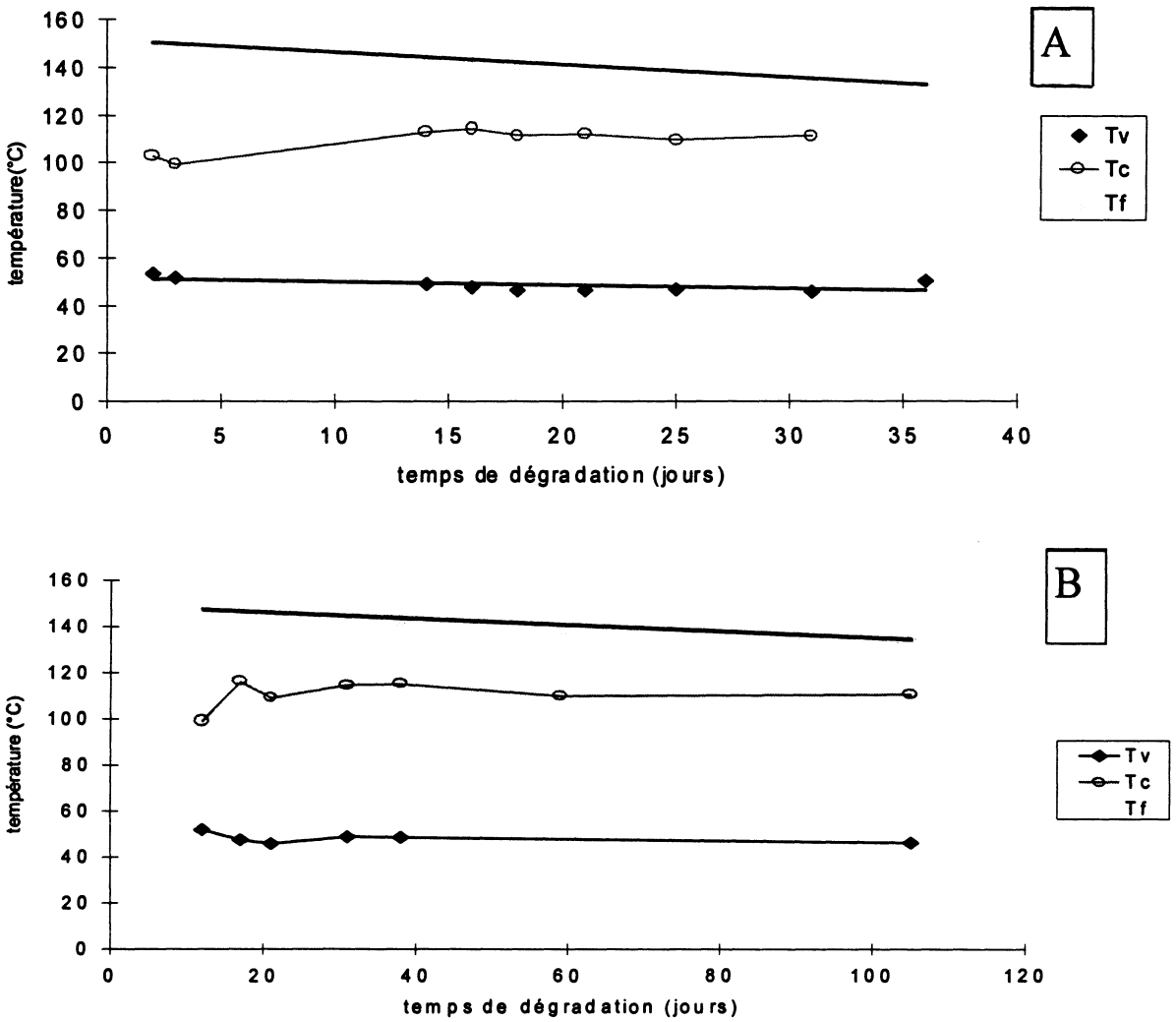


Figure III-13 : Variations des températures de fusion, de transition vitreuse et de cristallisation du PLA 96 en tampon phosphate soumis à différentes températures
A: à 70°C, B: à 50°C.

On peut donc anticiper que le PLA 96 sera assez rapidement arrivé au stade d'oligomères, car il arrive en moins de 15 jours à une valeur inférieure à 10000 Da à 70°C et à 60°C. Cependant, le PLA 96 conserve sa forme de tigette pendant un temps d'autant plus long que la température est basse. On peut donc s'attendre à ce qu'il reste ainsi dans le compost. L'eau étant moins disponible dans un compost que dans du tampon phosphate, la diffusion de l'eau dans le polymère y sera plus lente.

III-2 Etude de dégradation en compost modèle

D'après l'ANRED, citée par Bouché et Nougaret (1997), la composition moyenne des ordures ménagères en France est :

Tableau III-1 : Composition moyenne des ordures ménagères en France (d'après Bouché et Nougaret, 1997).

Catégorie	**Poids brut (%)**
Matériel décomposable (végétaux,...)	25
Papier et cartons (décomposables)	30
Chiffons (décomposables)	2
Plastiques (inertes)	10
Métaux (inertes)	6
Verre (inertes)	12
Divers (y compris médicaments, piles...)	15

Si on veut mettre au point un modèle d'ordures ménagères reproductible suffisamment proche de la composition des ordures ménagères moyennes, il faut trouver des substituts d'ordures représentatifs, tout en choisissant le moins de substituants possibles afin de permettre un meilleur contrôle. Nous avons donc remplacé le matériel décomposable et les chiffons par de la luzerne qui est très proche des déchets végétaux, et par du sang séché qui simule les déchets de viande. Le papier et les cartons ont été remplacés par le seul papier, et les matières dites "inertes", c'est-à-dire n'étant théoriquement pas susceptibles d'être dégradées, ont été remplacées par une seule matière inerte, le verre. Les piluliers utilisés nous

ont contraint, pour éviter de les briser, à augmenter quelque peu la fraction inerte dans le modèle.

Nous avons donc proposé le compost modèle suivant:

Tableau III-2 : Composition du compost modèle pour la simulation de la dégradation des PLA et OLA.

Composition		**Simulant:**
Luzerne	27%	Matériels décomposables
Papier (administratif)	22,5%	Papiers et cartons
Sang séché (Fertiligène)	0,5%	Viande
verre (piluliers)	50%	"Inertes"
eau	qsp saturation	

D'un point de vue pratique, la luzerne et le papier sont mélangés dans un grand bac, puis de l'eau est ajoutée jusqu'à saturation voire jusqu'à un excès, qui est éliminé ensuite. Le sang séché est alors saupoudré et le tout est brassé à la main. Le verre est ajouté sous forme de piluliers eux-mêmes remplis des autres constituants du compost. Le tout est alors déversé dans un dessiccateur. Le dessiccateur permet d'arroser le compost sans qu'il y ait excès d'eau car l'eau s'écoule dans le fond grâce à la plaque de porcelaine perforée. Ainsi on exclut toute macération. En effet, une macération entraînerait le développement d'une microflore anaérobie qui serait néfaste pour le compostage et pour les vers de terre. Un dessiccateur contient environ 1 kg de compost .

Afin de définir la modélisation des phases thermophiles et de maturation d'un compost réel nous avons fait appel aux données disponibles d'après le lombricompostage industriel. Les variations thermiques en ont été étudiées par Bouché et Nougaret (1997), le profil standard est présenté figure III-14. D'après cette courbe, la phase thermophile est à 70°C et dure environ une semaine. La phase de maturation, quant à elle, commence après 5 semaines et correspond à une diminution de température jusqu'à la température ambiante.

Dans notre compostage modèle, la phase thermophile a été fixée à 5 semaines, le dessiccateur étant placé dans une étuve thermostatée aux températures retenues pour simuler

la décroissance progressive observée en compostage réel. Les températures choisies sont alors:

-1 semaine à 70°C

-1 semaine à 60°C

-1 semaine à 50°C

-1 semaine à 40°C

-1 semaine à 30°C

A la fin de la 5e semaine, la température a été fixée à 20°C pour simuler la phase de maturation correspondant à la période de fermentation secondaire lente. Pour cette étude, la phase de maturation a été maintenue à 20°C pendant 8 semaines.

Le profil complet de température est présenté sur la figure III-15.

Selon le protocole retenu, le compost est préparé sans soin particulier. Il n'est pas stérile et n'a pas été inoculé. Le compostage est donc assuré par la microflore présente initialement ou acquise.

A l'aide du compost modèle mis au point, nous avons examiné les comportements de deux des polymères étudiés en tampon phosphate :

- PLA 50 : 112200, $\overline{Mn}$ =65400, I=1,7,
- PLA 96 : 96800, $\overline{Mn}$ =54000, I=1,8,

Ces PLA étaient également sous forme de tigettes cylindriques de 3 cm de long et 1 mm de diamètre (cf PE-II-2).

Les tigettes de PLA sont placées dans les piluliers remplis avec du compost pré-conditionné pour être en début de phase thermophile (T=0, figure III-15).

Le témoin négatif, c'est-à-dire exempt de micro-organismes, a été placé exactement dans les mêmes conditions de variation de température, mais dans du tampon phosphate stérile, c'est-à-dire sans compost.

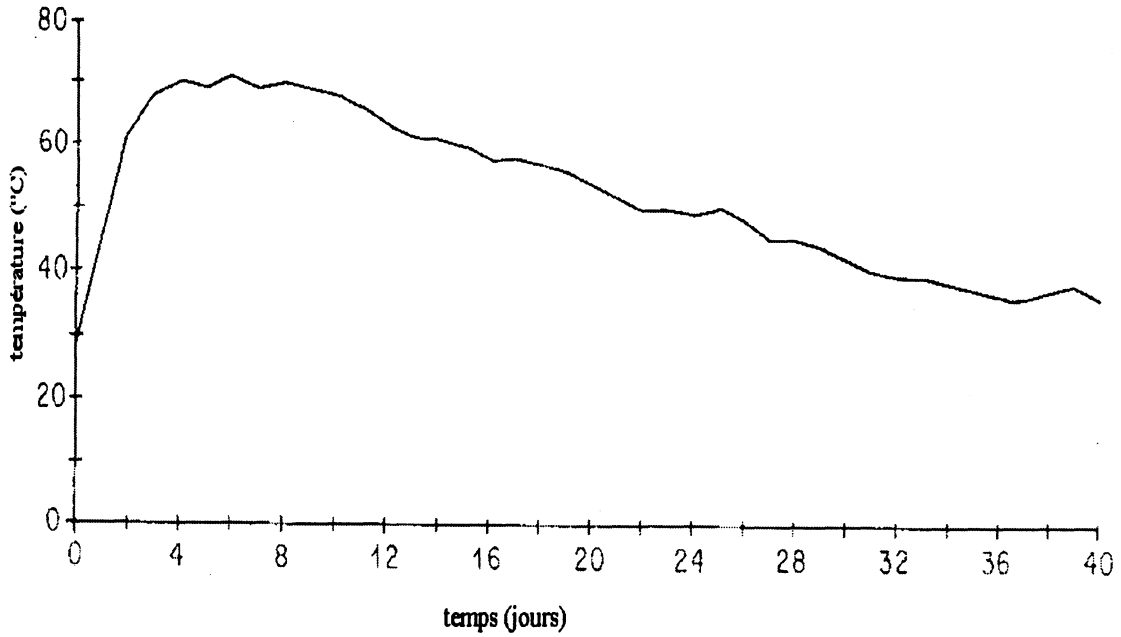


Figure III-14 : Profil de température du lombricompost de la SOVADEC, d'après Bouché et Nougaret, 1997.

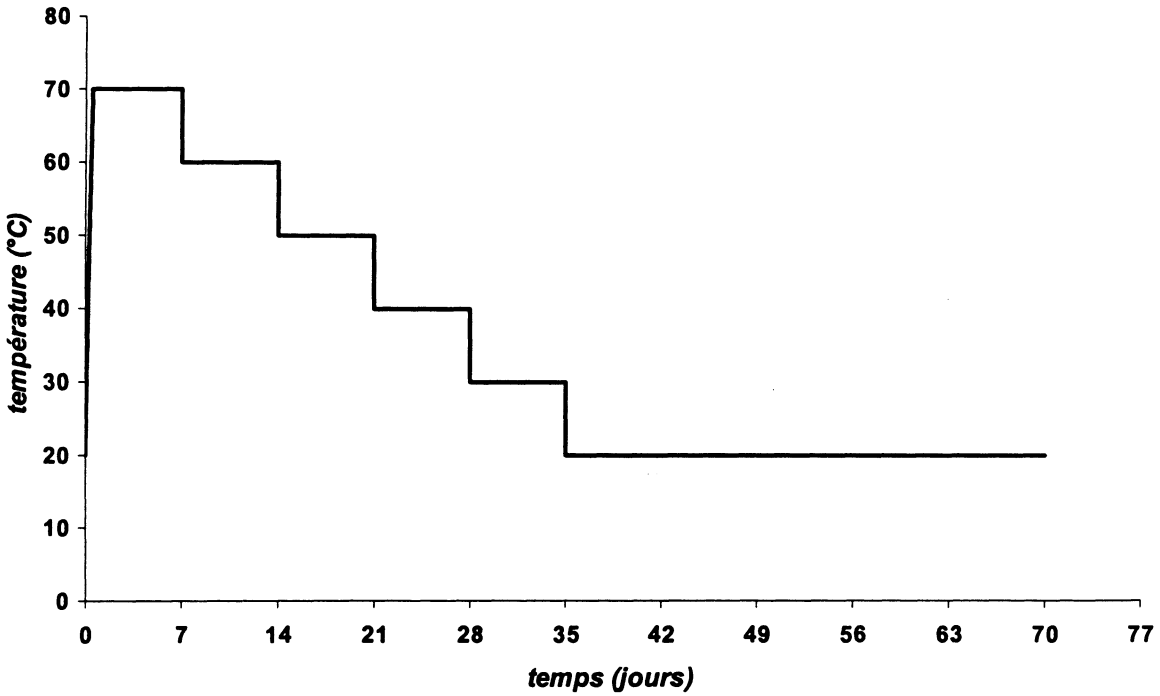


Figure III-15 : Profil de température utilisé pour le lombricompost modèle.

A intervalles réguliers, un pilulier est prélevé et les éprouvettes qu'il contient sont récupérées à l'aide d'une pince et séchées. Si elles ne sont pas récupérables, elles sont laissées dans le compost, séchées et dissoutes dans du solvant (THF).

L'estimation de la variation des masses molaires résulte d'une analyse par SEC.

III-2-1 Résultats de la dégradation du PLA 50 en compostage modèle

Au début de la phase thermophile du compost, c'est-à-dire à 70°C, le PLA 50 se ramollit et se déforme (figure III-16) car la température à laquelle il est soumis est au-dessus de sa T_v. Il se colle contre les autres constituants du compost, et n'est plus récupérable à partir du 6è jour (invisible à l'oeil nu). Sa masse molaire a diminué très vite (figure III-17).

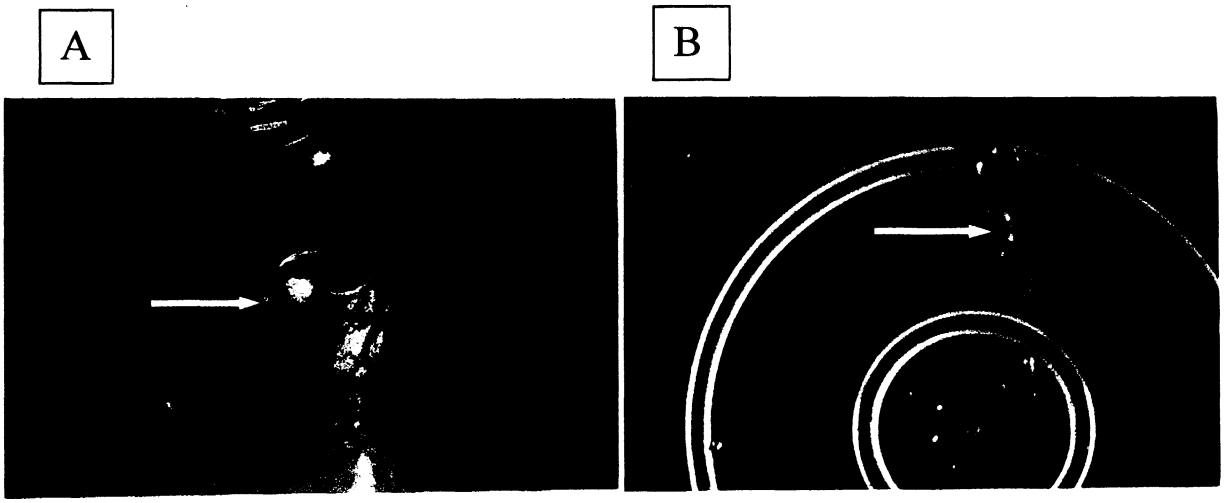


Figure III-16 : Tigettes de PLA 50 soumises à un compostage artificiel. A) après 2 jours de dégradation. B) après 5 jours de dégradation.

Ces résultats concordent avec le témoin négatif de biodégradation (tampon phosphate stérile) sur le PLA 50 (figure III-18). Les vitesses de diminution de la masse molaire dans le compost ou dans le témoin sont très proches, ce qui laisse penser que le principal responsable de la dégradation du PLA 50 dans un compost pendant le début de la phase thermophile est l'hydrolyse, fortement accélérée par la température.

Ceci nous permet déjà de dire que les objets faits à partir de PLA 50, que ce soit des sacs en plastique ou d'autres emballages, pourront être traités rapidement car ils se dégraderont dès les premiers jours de compostage, sauf si des additifs particuliers s'opposaient à ce comportement.

III-2-2 Résultats de la dégradation du PLA 96 en compostage modèle

Le PLA 96 que nous avons utilisé était semi-cristallin. Placé dans un compost en phase thermophile, il est devenu blanc au bout du 2e jour. Ce changement d'aspect est connu et est dû à la mise en contact prolongée avec l'eau. Le PLA récupéré entre 4 et 7 jours commence à se craqueler et prend une couleur jaune-orange entre 7 et 12 jours, certainement due aux composés phénoliques végétaux du compost. Cependant, il garde sa forme de tigette, plus ou moins cassée, pendant toute la phase thermophile (figure III-19), contrairement au PLA 50.

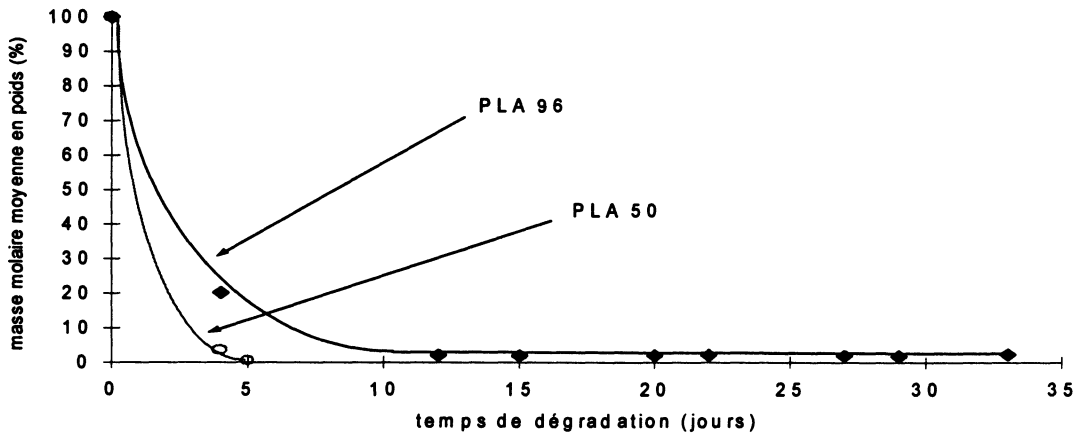


Figure III-17 : Variation de la masse molaire du PLA 96 et du PLA 50 en compost artificiel.

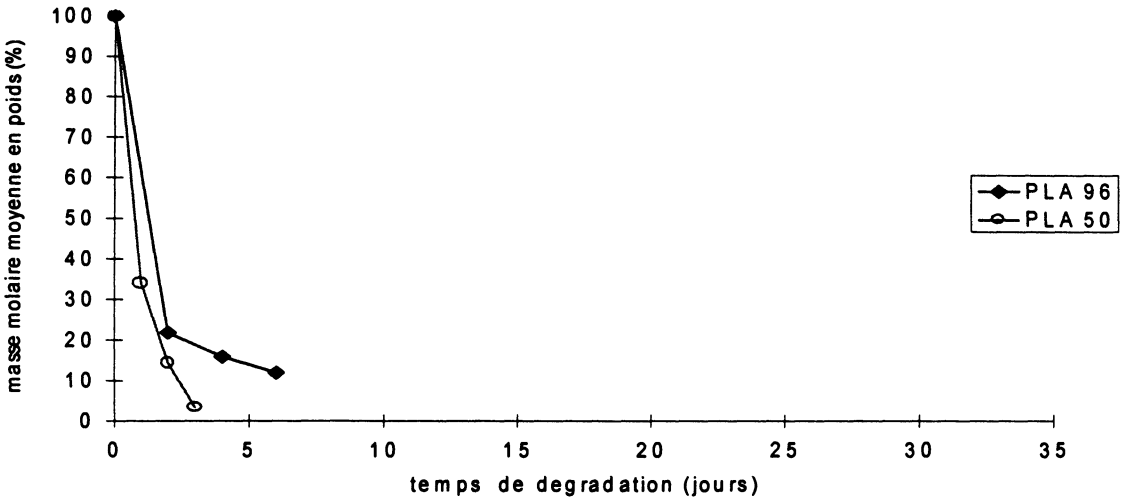


Figure III-18 : Variation de la masse molaire des PLA 50 et 96 dans le témoin négatif de dégradation.

Figure III-19 : Tigettes de PLA 96 soumises à un compost artificiel. A) après 4 jours de dégradation. B) après 27 jours de dégradation.

Les PLA 96 ont pu être récupérés pendant la phase thermophile, et leur masse molaire a pu être analysée par SEC. Nous constatons (figure III-17) que la masse molaire diminue fortement pendant la première semaine de la phase thermophile jusqu'à atteindre $\overline{Mn}$ =2000 au 11è jour environ, en accord avec les observations dans le tampon phosphate et dans le milieu témoin négatif. Comme pour le PLA 50, ces résultats suggèrent que le principal responsable de la dégradation du PLA 96 dans la phase thermophile du compost est l'hydrolyse. Il n'y a pas d'évidence significative que les micro-organismes interviennent à ce stade. Agarwal *et al.* (1998) sont arrivés à la même conclusion après avoir dégradé de l'EcoPLA (~ PLA 97,5) dans des environnements biotique et abiotique à 60°C, 50°C et 40°C. Ces auteurs ne trouvent pas de différences significatives de dégradation entre les milieux biotiques et abiotiques aux températures correspondantes.

Après avoir atteint une masse molaire de l'ordre de 2000, l'état du PLA 96 semble se stabiliser, puisqu'on le voit encore sous forme de bâtonnet jusqu'à la fin du compost. Sa structure a l'air assez rigide, mais la surface est molle : les pinces de microscopie y laissent une empreinte. Encore une fois on trouve là des caractéristiques semblables à celles observées à 37°C pour des PLA semi-cristallins (Li *et al.*, 1990c).

III-3 Etude de la dégradation de PLA en biosynthésol

Le milieu synthétique d'incubation a été adapté à partir de celui mis au point par Abdul Rida et Bouché (1997) à partir d'artisol (Ferrières *et al.*, 1981) additionné de milieu de Winogradsky et de source de carbone et d'azote, appelé "biosynthésol". La composition de ce milieu est :

- 90 g de lévilite pure
- 1425 g de billes de verre (~ 45 billes)
- 225 ml d'une solution de Winogradsky simplifiée (composition en annexe 1)
- 1 g de glucose (sucre à assimilation rapide, pour stimuler les microorganismes)
- 4 g de cellulose (sucre à assimilation lente, à remplacer par du PLA)
- 1 g d'extrait de levure (source d'azote)

Le tout est préparé dans des bocaux d'environ 1 l (figure II-1), qui sont ensuite agités avec un agitateur rotatif, puis laissés à 20°C.

III-3-1 Mise au point du biosynthésol

Le biosynthésol utilise une quantité de lévilite de 90 g par bocal de 1 l. Or d'après les travaux de Bouché et Qiu (1998), il est possible de descendre jusqu'à 30 g de lévilite par bocal, pour 10 vers de terre, sans que ce soit préjudiciable pour ces derniers. Nous avons pour notre part modifié les quantités de biosynthésol par bocal, la composition du milieu devenant:

- 45 g de lévilite pure,
- 45 billes de verre,
- 112 ml d'une solution de Winogradsky simplifiée,
- 0,5 g d'extrait de levure,
- 2 g de cellulose (sucre à assimilation lente, à remplacer par du PLA),
- 0,5 g de glucose.

Le biosynthésol étant complexe (il a un composant non standard : l'extrait de levure), nous avons voulu le rendre entièrement synthétique avec une source d'azote définie. Nous avons choisi NH_4NO_3 car ce composé induit un effet tampon dans le milieu. En supposant que dans 0,5 gramme d'extrait de levure on a 0.08 g d'azote (16% d'azote dans les protéines), les quantités choisies pour mettre le milieu au point sont : 0,05 g, 0,1 g, 0,15 g de NH_4NO_3. On complète à 0,5 g avec du glucose pour conserver l'ordre de grandeur du rapport C/N. Le témoin est le milieu défini par Abdul Rida et Bouché (milieu « lev »).

quantité (en g/bocal)	milieu "0,05"	milieu "0,1"	milieu "0,15"	milieu "lev"
extrait de levure	-	-	-	0,5
NH_4NO_3	0,05	0,1	0,15	-
glucose	0,95	0,9	0,85	0,5
cellulose	2	2	2	2
C/N	40	20	13	nd

Le milieu est laissé septique vu que les vers de terre apportent leurs micro-organismes. Il est à noter que l'inoculation (cf. PE-IV-2) n'est pas standardisée car la microflore des fèces de vers de terre est dépendante de divers facteurs, donc est susceptible de variations. Ces conditions sont proches d'un environnement réel.

Le paramètre suivi pour la mise au point est la stabilité du pH (d'après Abdul Rida et Bouché). En effet, le pH doit être stable et le plus proche possible de la neutralité car l'intestin des vers est à pH 6,8 (Van Gansen, 1963). Le pH a donc été mesuré à intervalles réguliers et les valeurs reportées sur la figure III-20. On constate qu'il y a assez peu de différences entre les courbes correspondant aux différentes concentrations. Néanmoins, une teneur de 0,1 g/bocal apparaît la plus proche du témoin extrait de levure. Il est à noter que le pH ne se stabilise que vers le 13e jour. Etant donné que les vers de terre ont besoin, d'une part, que leur nourriture soit prédigérée par les micro-organismes et, d'autre part, d'évoluer dans un milieu biologiquement stable (équilibre biologique), il faut attendre un certain temps que cet équilibre soit atteint et que les micro-organismes aient eu le temps de prédigérer la nourriture. L'équilibre est considéré comme atteint lorsque le pH est stabilisé. Donc, on ne peut rajouter les lombriciens que vers le 13e jour environ. Il est à noter que dans un milieu solide complexe comme le biosynthésol, il n'est pas possible de suivre le poids sec des micro-organismes.

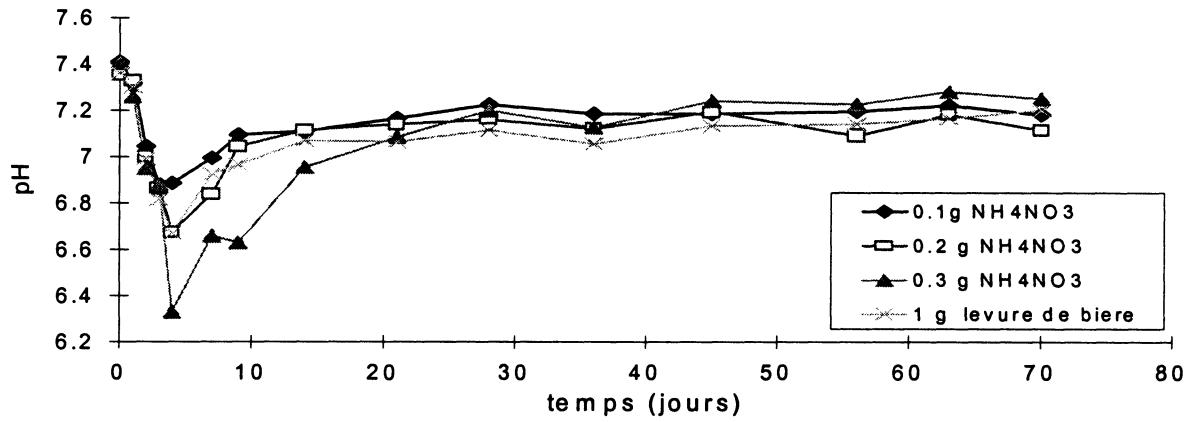


Figure III-20 : Cinétique de variations de pH dans le biosynthésol contenant de l'extrait de levure ou du NH_4NO_3 comme source d'azote, pour la mise au point du biosynthésol définitif.

Le milieu choisi en fin de compte est le milieu "0,1" contenant 0,1 g de NH_4NO_3 par bocal de 90 g de Lévilite. La source d'azote est complétée par une source de carbone. 0,4 g de glucose est ajouté. Le milieu doit être laissé 13 jours à 20°C pour mûrissement, les vers n'étant rajoutés qu'au 13e.

Nous avons utilisé ce milieu pour tester la dégradation d'OLA 50 de masse molaire $\overline{Mp}$=825, $\overline{Mn}$=500, I=1,7 obtenus par polycondensation directe de l'acide lactique. Les polycondensats ont été débarrassés de leurs fractions de plus faibles masses molaires par extraction à l'eau à partir d'une solution dans le CH_2Cl_2, afin de ne pas fausser l'étude en fournissant aux vers de terre et aux micro-organismes une quantité importante d'oligomères facilement assimilables.

L'OLA 50 est dispersé dans la lévilite par imprégnation par une solution d'OLA 50 dans l'acétone suivie d'une évaporation du solvant. On prépare des bocaux contenant 2 g d'oligomères et 10 vers de terre dans le biosynthésol modifié. Le milieu ainsi obtenu est inoculé par 1 ml de suspension de fèces de vers de terre de nos élevages ; la flore microbienne est donc spontanée.

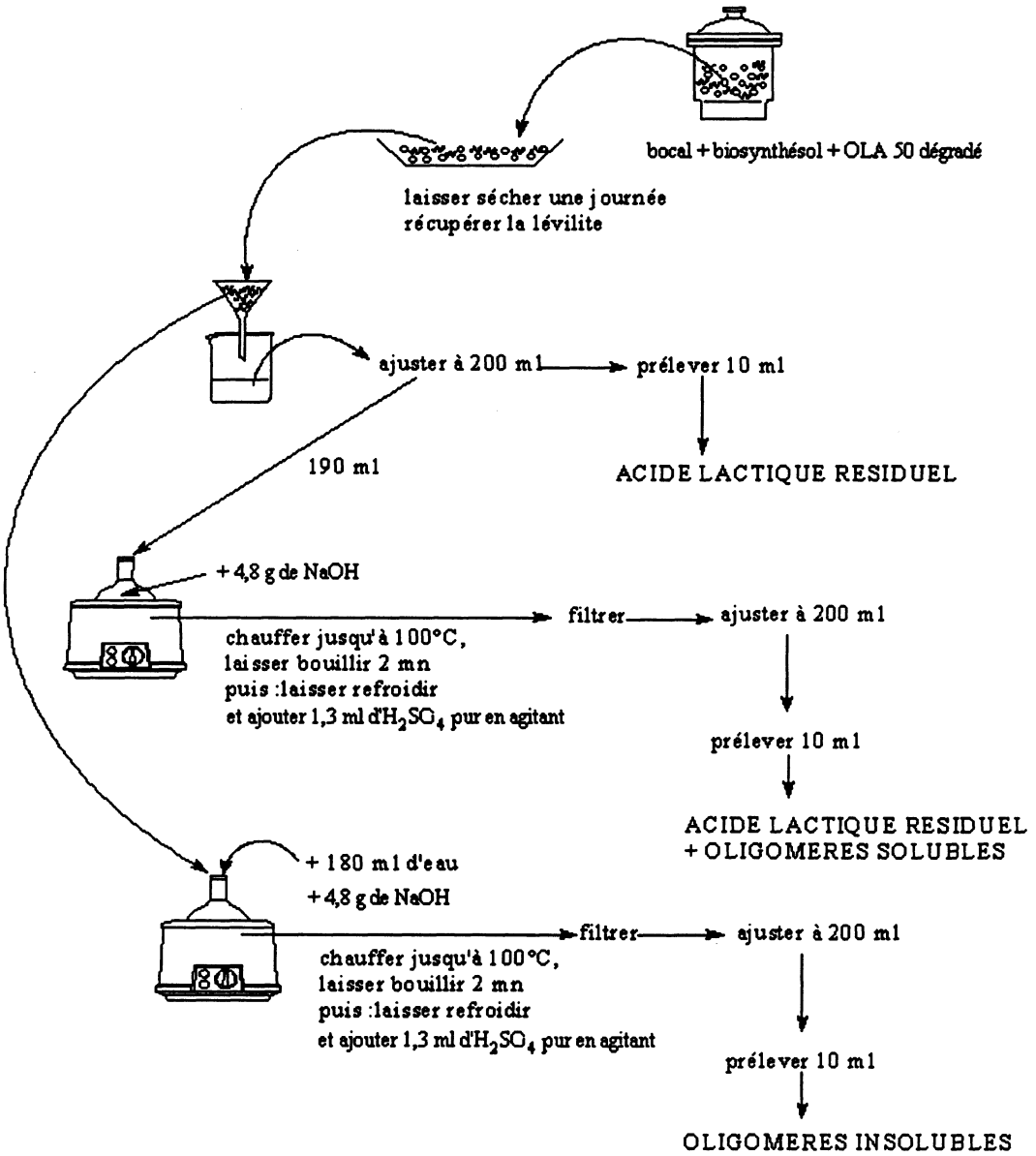


Figure III-21 : Schéma du traitement des éprouvettes pour suivre la dégradation microbienne des OLA 50 en biosynthésol

Pour chaque prélèvement, 3 paramètres sont évalués (figure III-21 et PE-IV-6) :

- la quantité d'acide lactique restant, obtenue directement par lavage à l'eau de l'échantillon, et dosage enzymatique.

- la quantité d'oligomères solubles dans l'eau (n<9). Il faut d'abord les dégrader en acide lactique par action de la soude à chaud, puis les doser enzymatiquement. Si on effectue la dégradation sur l'eau de lavage, on obtient la concentration en oligomères solubles. La partie solide séparée par filtration est conservée pour la suite des études.

- la quantité d'oligomères insolubles dans l'eau. Pour l'obtenir, on soumet la partie solide à une dégradation à la soude à ébullition.

L'acide lactique présent dans les solutions récupérées après dégradation est ensuite analysée à l'aide d'un kit enzymatique à base de L-lactate oxydase (SIGMA).

III-3-2 Résultats de la dégradation d'OLA 50 en biosynthésol

La quantité d'acide présent sous forme de résidus acide lactique permet de calculer le taux de dégradation des OLA 50 initiaux. Le bilan de l'acide lactique présent dans les bocaux sous forme soluble ou solide (1,4 g/bocal) est inférieur à celui auquel on s'attendait (2g/bocal, quantité introduite sous forme OLA 50). Ceci peut être imputé à la non-prise en compte de l'hydrophilie de la lévilite, l'eau absorbée initialement pouvant fausser la prise d'essai de biosynthésol contenant les OLA 50 introduits antérieurement à l'aide d'une solution dans l'acétone évaporée par la suite. Une telle explication peut difficilement justifier l'important écart observé. Une autre possibilité est qu'il y ait pu avoir absorption des OLA 50 ou de l'acide formé par hydrolyse dans la lévilite relativement poreuse.

Néanmoins, les analyses montrent que les OLA sont entièrement dégradés au bout de 80 à 100 jours (figure III- 22 A). Les oligomères solubles se dégradent plus rapidement que les oligomères insolubles (figure III-22 B), ce qui indique que, plus les oligomères sont courts, plus ils se dégradent rapidement. L'acide lactique n'est détecté qu'à l'état de traces dans le milieu : il est donc consommé au fur et à mesure de sa formation par dégradation par les micro-organismes. Ceci nous montre que les micro-organismes capables de dégrader l'acide lactique sont ubiquitaires et présents dans le milieu. La dégradation rapide d'un OLA de faibles masses molaires nous indique que, dans un compost après la phase thermophile, la dégradation se fera très rapidement à température ambiante puisque le PLA aura atteint une masse molaire suffisamment faible pour être biodégradable et assimilé, en particulier pour le PLA 50.

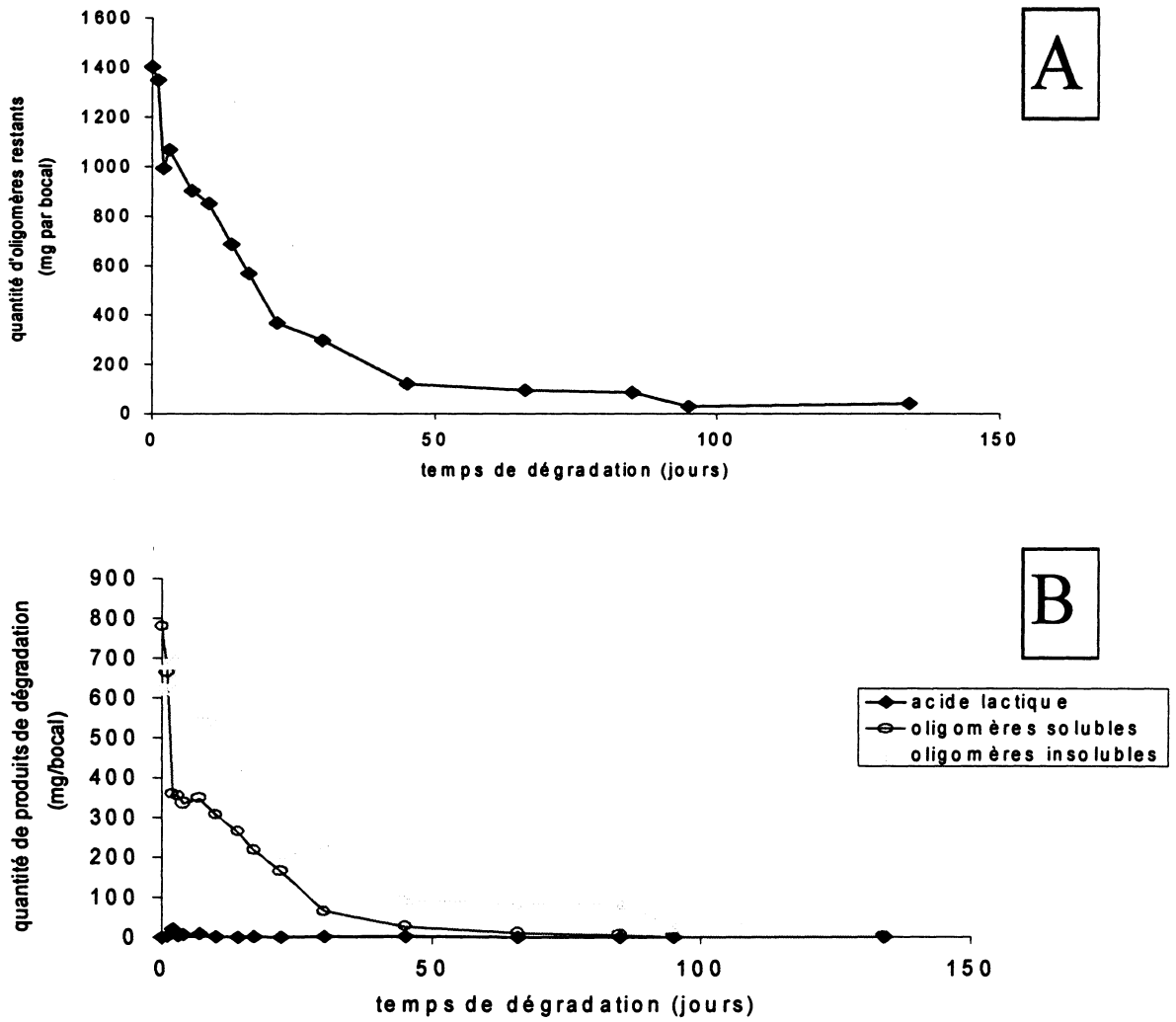


Figure III-22 : Cinétiques de dégradation d'OLA 50 en biosynthésol.
A) Suivi de la quantité totale d'oligomères restants
B) Suivi de la quantité d'acide lactique, d'oligomères solubles et insolubles restants.

III-4 Conclusions

Le PLA 50 est très rapidement dégradé dans du tampon phosphate à 70°C, 60°C et 50°C, ainsi que dans un compost modèle. Il n'est plus visible après 6 jours. Sa masse molaire a diminué très vite en dessous de 2000 Da, ce qui correspond au stade oligomères. Lorsqu'il est sous forme OLA 50, il se dégrade rapidement dans un biosynthésol aseptique, sous l'action conjuguée de l'hydrolyse et des micro-organismes.

La masse molaire du PLA 96 a beaucoup diminué pendant la phase thermophile, même si le PLA garde encore une forme de bâtonnet à la fin de la phase, et atteint le stade

oligomères, en dessous de 2000 Da, au bout de 11 jours. Les résidus sont cristallins et se dégraderont relativement lentement pendant la phase de maturation.

La dégradation du PLA 50 et du PLA 96 en phase thermophile de compost semble plutôt due à l'hydrolyse qu'à l'action des micro-organismes.

Globalement, le PLA de hautes masses molaires, mis en compost, est dégradé jusqu'au stade oligomères de basses masses (inférieur à 2000) grâce à la chaleur et à l'humidité de la phase thermophile. Puis le reste, si reste il y a, sous forme de OLA, peut être éventuellement bioassimilé par les micro-organismes d'après ce que nous venons de voir et d'après Torres (1996).

La question est maintenant de savoir si, dans un lombricompost, les vers de terre sont capables d'intervenir dans la dégradation des PLA. Peuvent-ils assimiler les PLA ou les OLA issus de leur dégradation –que ce soit directement ou indirectement- ? Ces deux points font l'objet du chapitre suivant.

Chapitre IV

LES VERS DE TERRE SONT-ILS CAPABLES DE BIOASSIMILER LE PLA ET SES PRODUITS DE DEGRADATION?

Chapitre IV
Les vers de terre sont-ils capables de bioassimiler le PLA et ses produits de dégradation ?

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les PLA HMM peuvent être dégradés en OLA par hydrolyse lors de la phase thermophile du compost. La question se pose maintenant de savoir si les oligomères OLAX peuvent être bioassimilés par les vers de terre. Une des façons de le vérifier est d'utiliser les PLA et les OLA comme seules sources de carbone dans un milieu synthétique modèle reproductible tel que le biosynthésol.

Pour cela, nous examinerons d'abord si la présence de vers de terre affecte la dégradation des composés de type PLA en compost modèle et en biosynthésol. Dans la deuxième partie, nous déterminerons si les vers peuvent utiliser les PLA comme seule source de carbone et les assimiler.

La méthode la plus classique de vérification de la bioassimilation est la respirométrie fondée sur l'analyse des gaz libérés et notamment du CO_2. Cependant, l'application de cette méthode à un lombricompost s'avère inadaptée en raison de la présence simultanée de vers de terre et de micro-organismes susceptibles eux aussi d'assimiler les polymères ou leurs fragments. C'est la raison pour laquelle nous avons cherché une méthode plus directe fondée sur un paramètre propre au seul ver de terre.

IV-1 Influence de la présence de vers de terre sur la dégradation de PLA en lombricompostage modèle et en biosynthésol

IV-1-1 Dégradation en lombricompostage modèle

A- Matériel-Méthodes

Les caractéristiques du lombricompost (composition, variations de température et durée des phases thermophile et de maturation) sont les mêmes que celles du compost modèle décrit en III-2 mise à part la présence des vers de terre.

Les substances étudiées sont les mêmes que précédemment, c'est-à-dire:

- PLA 50 : $\overline{Mp}$=112200, $\overline{Mn}$ =65400, I=1.7,
- PLA 96 : $\overline{Mp}$=96800, $\overline{Mn}$ =54000, I=1.8,

Sur le plan expérimental, les piluliers contenant le compost et le PLA ayant subi la phase thermophile sont sortis au commencement de la phase de maturation lorsque la température est fixée à 20°C. Au contenu de chaque pilulier sont additionnés 4 vers de terre. Les piluliers sont alors fermés par un plastique non-dégradable pour éviter que les vers ne s'échappent. Enfin, ils sont placés séparément dans des bocaux de 1 litre. L'humidité est vérifiée régulièrement. Lors d'un prélèvement, le contenu d'un pilulier est étalé sur un papier filtre et les morceaux de PLA sont cherchés à l'œil nu, récupérés et lavés. Leur masse molaire est déterminée par SEC.

Le compost tel qu'il se présente en début de phase thermophile est montré figure IV-1 A. Les figures IV-1 B et C représentent respectivement des vues du compost et du lombricompost après 5 semaines de phase thermophile et 8 semaines de phase de maturation. Le lombricompost est *de visu* plus homogène et plus tassé que le compost, il ne contient plus de papier contrairement au compost puisque ce dernier a été mangé par les vers de terre ; il mûrit donc plus vite.

B- Résultats concernant les PLA 50

Traité comme indiqué précédemment, le PLA 50 se trouve dégradé pendant la phase thermophile, c'est-à-dire avant que les vers de terre ne soit rajoutés, comme nous l'avons vu

lors de la dégradation en compostage simple (figure III-17). Aucune information complémentaire n'a pu être obtenue pendant la phase de maturation du lombricompostage, les échantillons étant devenus inaccessibles.

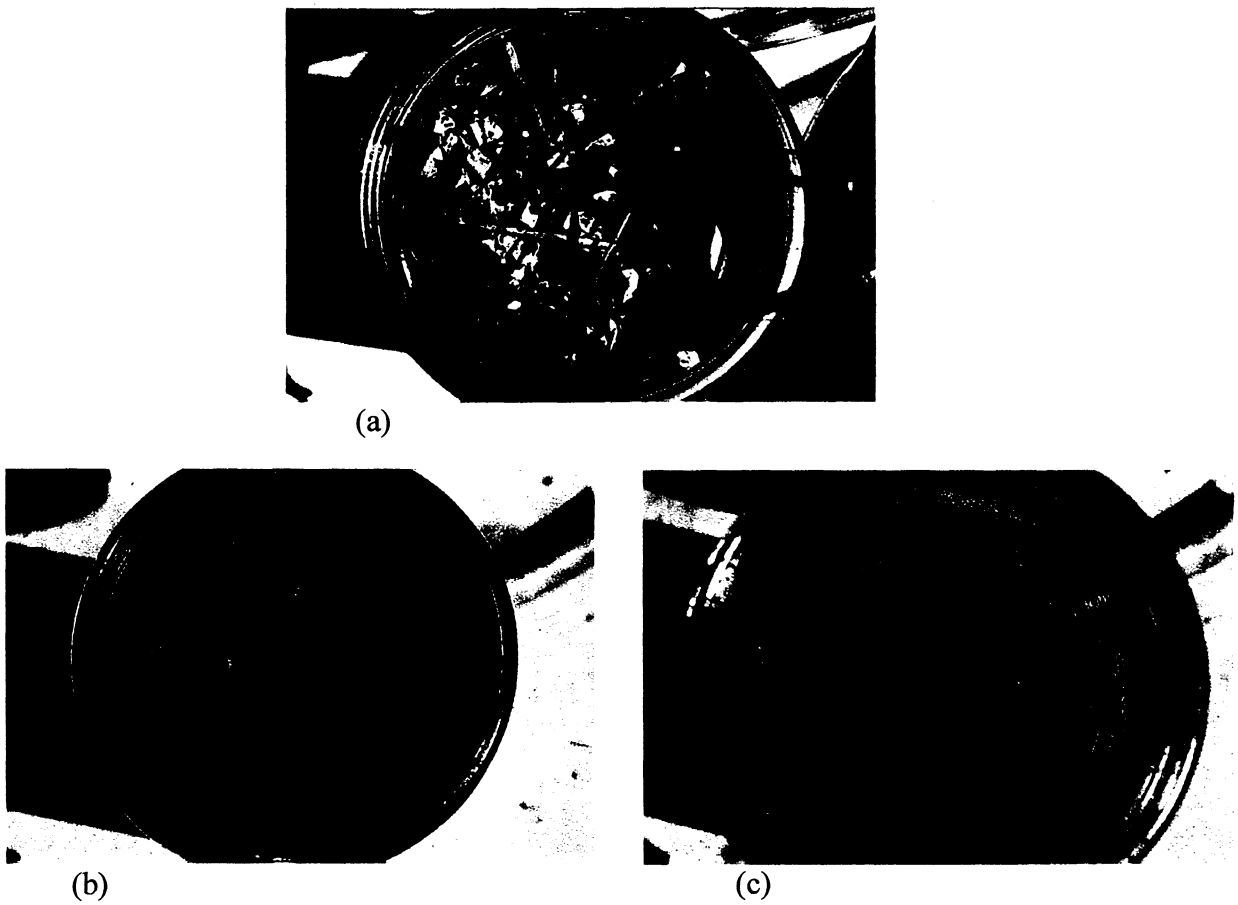


Figure IV-1 : (a) Compost au début de la phase thermophile. (b) Compost après 3 mois de maturation. (c) Lombricompost après 3 mois de maturation.

C- Résultats concernant les PLA 96

Lors du compostage simple, les échantillons de PLA 96 avaient pu être récupérés pendant la phase thermophile et leur masse molaire avait pu être analysée par SEC (figure III-17). Bien que les échantillons de PLA 96 soient plus résistants que ceux de PLA 50, il a été également difficile de les récupérer dans le lombricompost. Pour pallier cette difficulté, nous avons cherché à détecter leur présence dans les fèces en dispersant ceux-ci dans du THF qui est le solvant utilisé en SEC. Nous avons obtenu un produit bleu qui n'a pas pu être purifié avec du noir de carbone. L'origine de cette coloration n'ayant pas été identifiée, il a été

impossible d'analyser les fèces de vers de terre par SEC pour cause de respect des colonnes de phase stationnaire.

Pendant la phase de maturation, les échantillons ont été systématiquement cassés en petits morceaux du fait du brassage par les vers. Leur structure est restée rigide, mais leur surface s'est ramollie. Dans le lombricompost au 76è jour de la phase de compostage, un fèces a été trouvé qui contenait du PLA 96 (figure IV-2). Ceci nous permet de dire que l'"assouplissement" des tigettes de PLA 96 par les divers facteurs qui interviennent dans un lombricompost (chaleur, humidité, micro-organismes, brassage par les vers de terre,...) peuvent jouer en faveur de l'ingestion de ces PLA par les vers de terre. Cependant, la partie de notre étude présentée dans ce chapitre n'a permis de mettre en évidence que la possibilité d'ingestion des tigettes de PLA 96 par les vers de terre. L'ingestion de ces PLA est ici limitée non pas du point de vue biologique, mais du point de vue mécanique. Lorsqu'ils sont sous forme de tigettes ou sous forme de feuilles (cf. II-2), les PLA apparaissent difficilement ingérables tels quels. Par contre, vieillis *in situ*, ils deviennent mous et sont ingérables. Ces résultats sont intéressants car il est possible de penser que les objets faits de PLA 96 (emballages divers,...) pourront se retrouver dénaturés à la fin de la phase thermophile d'un compostage ou d'un lombricompostage, ce qui devrait faciliter leur biodégradation, le cas échéant.

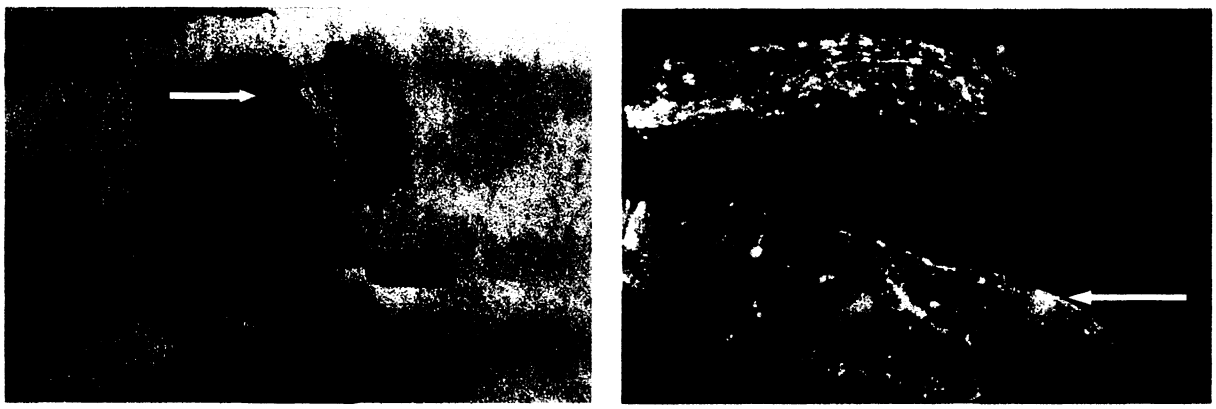


Figure IV-2 : Fèces contenant du PLA 96 au 76e jour de lombricompost.

IV-1-2 Dégradation en biosynthésol

A- Matériel-Méthodes

Le biosynthésol est celui mis au point dans le chapitre précédent. La composition du milieu est la même. Par contre, la proportion des vers de terre et les conditions de leur introduction ont été changées. En effet, nous avons vu que le pH dans le biosynthésol se stabilise seulement à partir du 10/12è jour (figure III-20). Par conséquent, les vers de terre ont été systématiquement introduits le 13è jour pour éviter tout problème de pH.

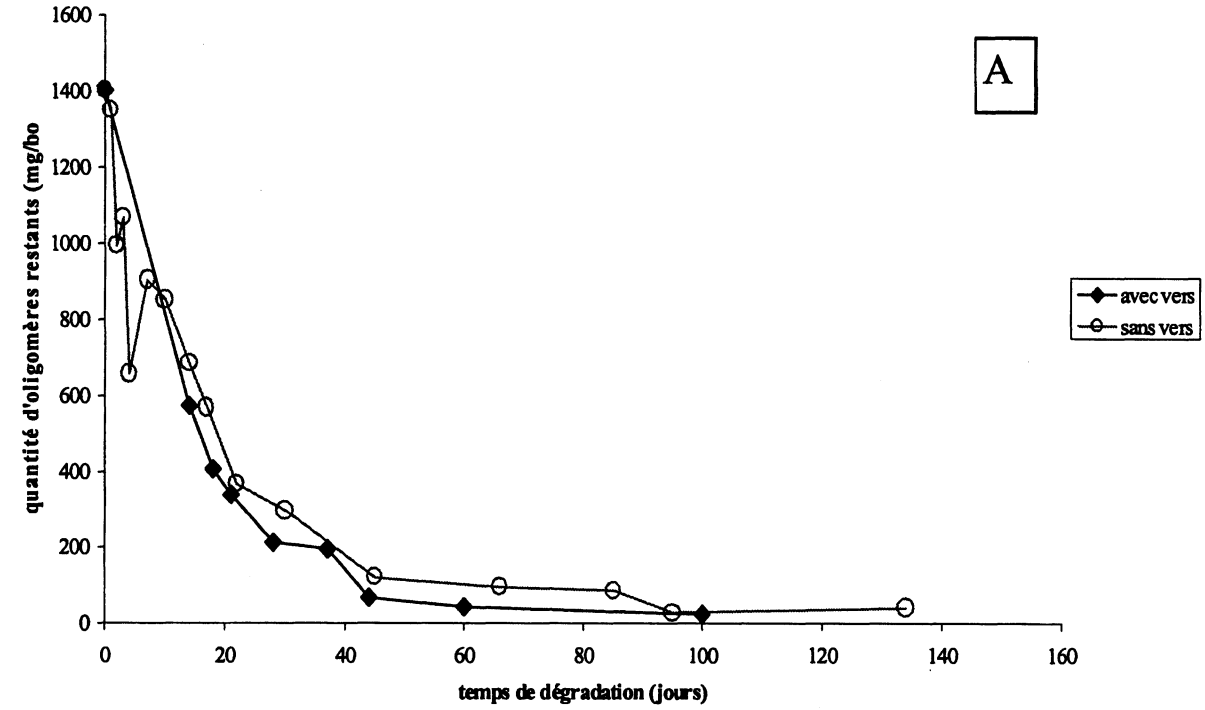
Dans la pratique, 10 *E. andrei* sont ajoutés par bocal. Ce sont des vers adultes qui ont été laissés jeûner pendant 62 jours à 20°C dans de la lévilite seule. Pendant ce jeûne, on a constaté une perte de 50% du poids de la population.

L'étude a été limitée au cas des OLA 50 susceptibles d'être plus facilement bioassimilables que les polymères de hautes masses.

B- Résultats concernant les OLA 50

La figure IV-3 montre les variations de la quantité d'oligomères restants déterminée par la méthode décrite au chapitre III-3-1 (figure III-21) pour des échantillons comparables mis dans du biosynthésol avec et sans ver de terre. Les deux courbes correspondantes sont quasiment identiques. Dans le biosynthésol, la dégradation des OLA 50 se poursuit donc au même rythme après introduction des vers de terre. Il faut noter que dans ce dernier cas, le biosynthésol contient des micro-organismes.

Le bilan en acide lactique, oligomères solubles et oligomères insolubles a été effectué. Les résultats sont présentés à la figure IV-3 B. Comparées à la figure III-22 B, les courbes de la figure IV-3 B montrent que les oligomères solubles et insolubles se dégradent à la même vitesse avec et sans vers de terre, l'acide lactique n'étant détecté dans les deux cas qu'à l'état de trace.



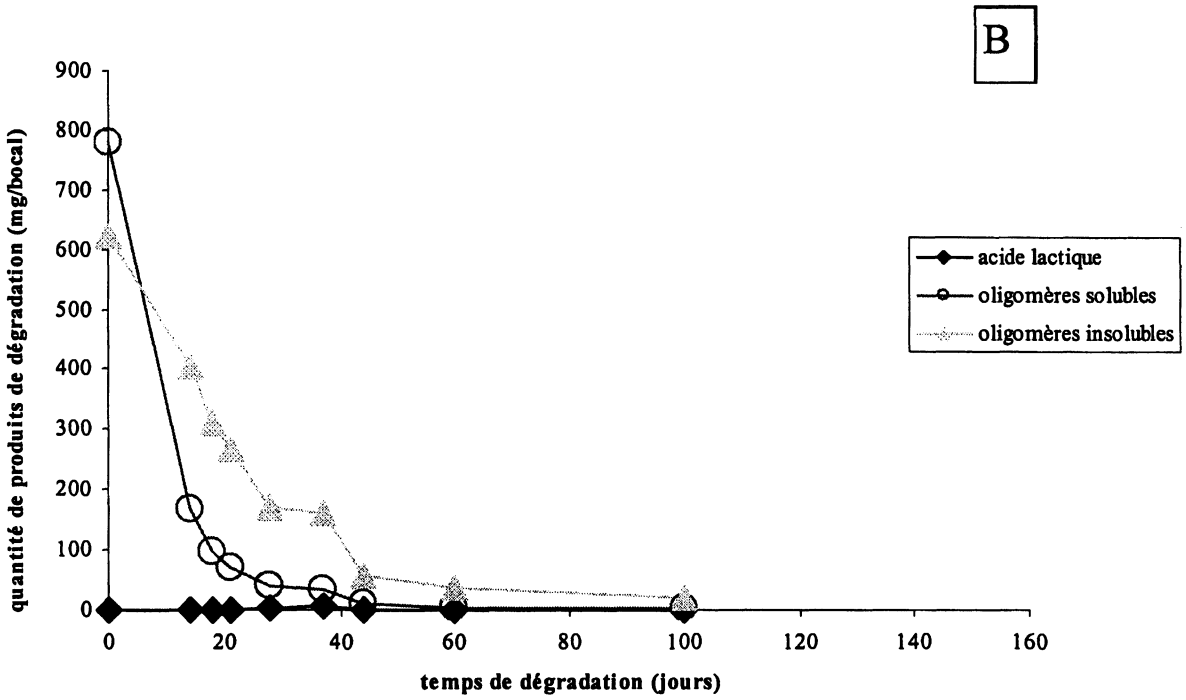


Figure IV-3 : Dégradation d'OLA 50 en biosynthésol en présence et en absence de vers de terre.
A) suivi de la quantité totale d'OLA 50 restant
B) suivi de la quantité d'acide lactique, d'oligomères solubles et insolubles restants en présence de vers de terre.

IV-1-4 Conclusion sur la dégradation

Le PLA 96 de hautes masses, mis en lombricompost, est dégradé jusqu'au stade oligomères de basses masses (inférieures à 2000) grâce à la chaleur et à l'humidité de la phase thermophile. L'avantage du lombricompostage par rapport au compostage, à ce stade de notre étude, est que la présence des vers de terre permet un brassage du compost, ce qui entraîne un émiettage des morceaux de PLA partiellement dégradés par la chaleur et l'humidité. Cet émiettage facilite alors l'ingestion de petits morceaux de PLA par ces mêmes vers quand un stade avancé de dégradation physique et de contamination bactérienne est atteint.

Nous savons que les OLA, résultant de la dégradation de PLA peuvent être bioassimilés par les micro-organismes (Torres, 1995), donc dans un compost il est tout à fait probable que les OLA seront bioassimilés. Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'assimilation des OLA, directement ou indirectement, par les vers de terre.

Il ne semble donc pas y avoir de différence de cinétique entre la dégradation en présence de micro-organismes et celle en présence de vers de terre. L'absence de différence montre que les lombriciens n'interviennent pas à ce stade de dégradation ultime des oligomères. Quant à l'éventuelle contribution des seuls micro-organismes, sa mise en évidence aurait nécessité la comparaison entre une dégradation en biosynthésol stérile et biosynthésol "naturel". Il s'est avéré difficile de disposer d'un biosynthésol stérile, c'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'aborder le problème de la bioassimilation par les vers de terre au niveau même de ces derniers en examinant leur devenir en présence de polymères de type PLA comme seule source de carbone.

IV-2 Utilisation des PLA et de leurs produits de dégradation comme seule source de carbone par les vers de terre

Nous avons vu qu'il était assez difficile de vérifier si les vers de terre sont capables d'ingérer un PLA lorsque celui-ci se présente sous forme de tigette, que ce soit par manque de sapidité ou plus probablement à cause d'un problème mécanique. Par rapport au deuxième cas, il est beaucoup plus probable que les vers de terre parviennent à ingérer le polymère si celui-ci est sous forme de poudre, notamment si celle-ci est mélangée à la lévilite.

Nous avons signalé précédemment que la respirométrie, et notamment la mesure du volume de CO_2 produit dans des conditions de restrictions nutritionnelles telles que la seule source de carbone disponible pour un être vivant (micro-organisme, animal,...) provienne du substrat potentiel à étudier, est mal adaptée au suivi de la bioassimilation des composés de type PLA par les vers de terre. Afin de pallier l'insuffisance de la respirométrie, nous avons envisagé la possibilité d'exploiter le fait que des vers de terre jeunes à fort potentiel de croissance et privés de nourriture ne peuvent croître en présence d'un composé carboné que si ce dernier est bioassimilable.

Le compost modèle mis au point précédemment (§ III-2) contient beaucoup de sources de carbone et n'est pas exploitable. Nous avons donc préféré utiliser un milieu de culture synthétique qui sera le biosynthésol modifié en substituant les sources de carbone standards (glucose et cellulose) par du PLA.

IV-2-1 Mise au point de l'expérimentation

-tests avec des vers de terres juvéniles

Les juvéniles ont normalement une croissance pondérale jusqu'au stade adulte. Ce type de vers de terre a été sélectionné selon 2 critères : l'absence de puberculum et le poids. Les adultes pesant en général entre 300 et 400 mg, on a pris dans la pratique des juvéniles entre 150 et 200 mg pour avoir une population homogène et une marge de croissance suffisante. Ils ont été laissés 4 jours à 20°C dans de la lévilite seule pour leur vider l'intestin. Puis, ils ont été transférés 10 par 10 dans des bocaux contenant la source de carbone à tester dans du biosynthésol modifié et mûri 13 jours. Dans un premier temps, les lombriciens ont été mis en présence de cellulose et de lactate de calcium, un témoin exempt de composé carboné étant constitué comme essai négatif. Dans un deuxième temps, une population de 10 vers de terre a été mise en présence de PLA 50 de haute masse molaire ($\overline{Mp}$=165000, $\overline{Mn}$=99000, I=1,66). Si cette population de juvéniles est capable d'assimiler un composé donné comme seule source de carbone, une simple pesée en fonction du temps devrait pouvoir refléter la bioassimilation.

Les résultats sont présentés figure IV-4. On constate que la cellulose induit une prise de poids des vers jusqu'à 170% sans apparition du clitellum. Le maximum de prise de poids

dans le milieu nutritif avec le témoin positif cellulose se situe à 30 jours après introduction des lombriciens puis il y a un retour vers la masse initiale. Cet amaigrissement est probablement dû à la disparition de la cellulose entièrement consommée et le retour à une situation d'absence de nutriments.

Pour le lactate, le maximum de prise de poids se situe beaucoup plus tôt (5è jour) mais ne va que jusqu'à 120% du poids initial. Contrairement à la cellulose qui exige une phase de prédigestion microbienne avant d'être assimilée par les vers de terre, le lactate est un produit très rapidement assimilable. Il est même possible que les micro-organismes l'aient totalement métabolisé avant même que les vers de terre soient introduits dans le milieu au 13e jour. Dans ce cas-là, les vers de terre ne font que se nourrir des micro-organismes qui se sont nourris de lactate. De plus, le pH dans le milieu avec lactate de calcium augmente jusqu'à 8.5 à partir du 12e jour (figure IV-5), ce qui est trop élevé pour des vers de terre. D'ailleurs, trois vers de terre sont morts 5 jours après la mise en contact des lombriciens avec le milieu. Leur perte de poids pourrait donc être également expliquée par le stress lié à la hausse du pH (figure IV-5).

Par contre, il semble que le PLA 50 de hautes masses molaires ne puisse pas permettre la croissance des vers de terre, la courbe obtenue étant quasi identique à celle du témoin négatif.

D'après ces résultats, la cellulose est un bon témoin positif pour la méthode proposée puisqu'elle permet la croissance des juvéniles presque jusqu'à leur poids théorique d'adulte, au moins dans un premier temps. Cependant, notre méthode de sélection des juvéniles n'est pas assez fiable. Il est en effet assez malaisé de distinguer les juvéniles des adultes stressés ou vieux qui ont maigri et ont perdu leur puberculum. Il est possible d'avoir des juvéniles à développement synchronisé (Bouwman, 1998), mais la technique est lourde à mettre en oeuvre.

Il nous a donc paru intéressant de prendre des adultes et des subadultes (critères : poids entre 300 et 400 mg, présence de puberculum et/ou de clitellum), de leur faire perdre du poids avant de les mettre en présence de composés carbonés.

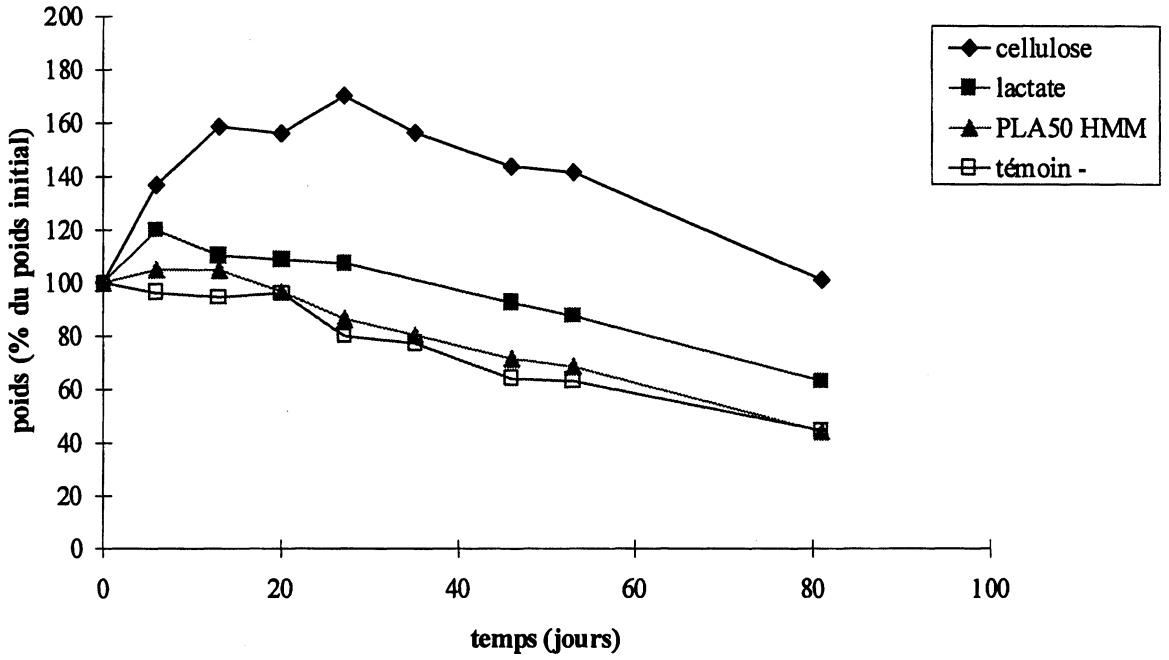


Figure IV-4 : Cinétiques des variations de poids des vers de terre juvéniles ayant comme seule source de carbone du PLA, des produits de dégradation ou de la cellulose.

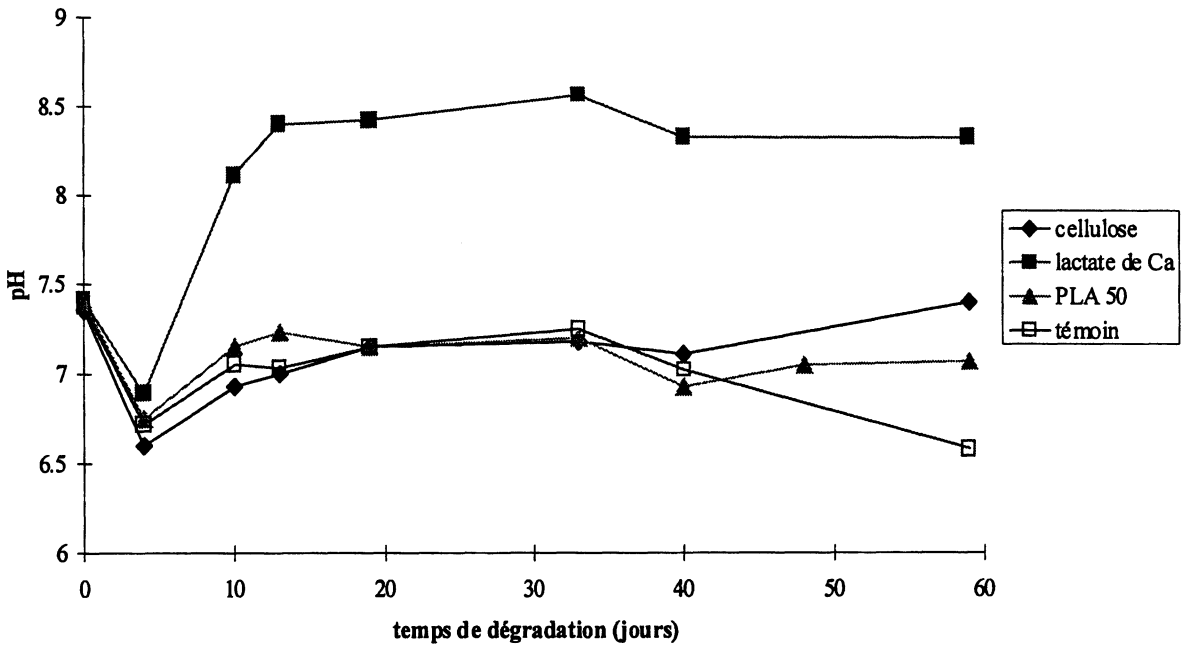


Figure IV-5 : Cinétiques des variations de pH dans du biosynthésol contenant du PLA ou des produits de dégradation, avec ajout de vers de terre juvéniles au 13e jour.

-tests avec des vers de terre adultes

Afin de savoir combien de temps il faut faire jeûner les vers de terre adultes pour avoir une perte de poids de 50% environ, 10 vers de terre ont été laissés dans un bocal contenant 30 billes de verre et 30 g de Lévilite, et leur perte de poids a été régulièrement suivie. La figure IV-6 nous montre cette perte de poids et la survie des vers de terre subadultes et adultes dans de la lévilite seule. On peut constater que les vers de terre sont encore vivants au 140e jour de jeûne. Ils perdent environ 50% de leur poids en 62 jours. Cette perte de 50% a été considérée comme suffisante pour permettre de constater une reprise de poids dans le cas où une source de carbone disponible est mise à la disposition de la population de lombriciens. Nous avons donc choisi de laisser les vers dans de la lévilite pure pendant 62 jours pour leur faire perdre 50% de leur poids puis, comme pour les juvéniles, nous les avons mis dans du biosynthésol enrichi en une source de carbone.

Dans un premier temps, les lombriciens amaigris ont été mis comparativement en présence de cellulose, de lactate de calcium, et d'un témoin négatif exempt de source carbonée. La figure IV-7 présente les résultats. Lorsque la seule source de carbone est la cellulose ou le lactate, on note que pendant environ 20 jours, la population de lombriciens reprend du poids. Au-delà, on observe un nouvel amaigrissement. Lorsque la source de carbone est la cellulose, la remontée du poids des vers va jusqu'à 85% du poids initial après 20 jours de contact. Le lactate conduit à une remontée équivalente du poids jusqu'à 80% du poids de départ au cours de la même période. Au-delà, le poids redescend lentement avec la cellulose, tandis que les vers de terre meurent rapidement après autotomie dans le cas du milieu lactate. La mort des vers de terre (un seul a survécu) est attribuée à un stress brutal lié au pH du milieu. En effet on a observé une remontée assez forte du pH (voir figure IV-8), jusqu'à 8,5, ce qui est excessif pour des vers de terre. Le même problème de pH a été observé avec les juvéniles, par contre pour ces derniers la mortalité a été plus faible (3/10 contre 9/10) mais plus précoce (5 jours de contact contre 20).

Les résultats précédents montrent qu'une population de lombriciens amaigris répond d'une manière très sensible à la mise à disposition de composés assimilables. La méthode résultante peut donc être appliquée à l'étude des composés de type PLA.

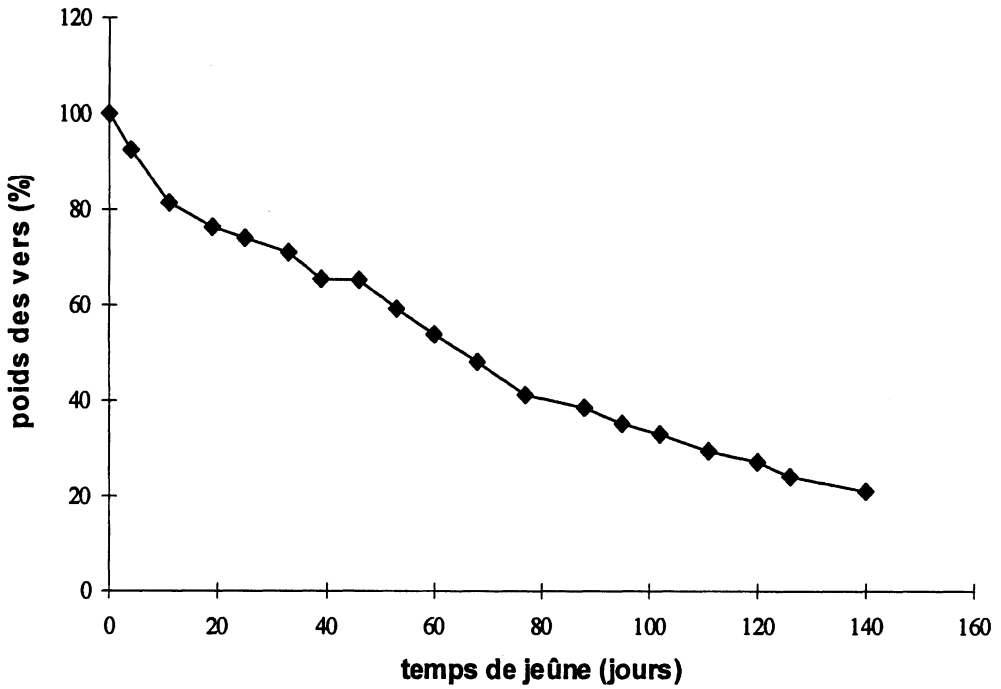


Figure IV-6 : Variation de poids des vers de terre subadultes et adultes dans la lévilite

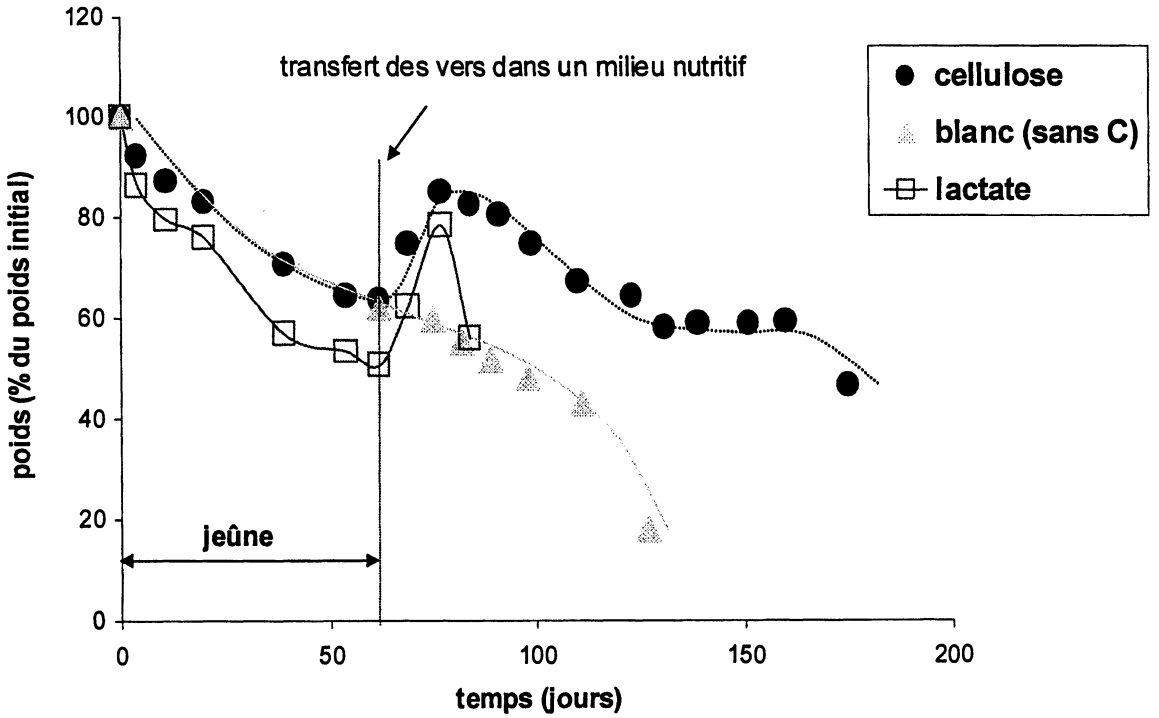


Figure IV-7 : Variation de poids des vers de terre adultes et subadultes ayant jeûné 62 jours et mis dans du biosynthésol avec comme seule source de carbone de la cellulose ou du lactate

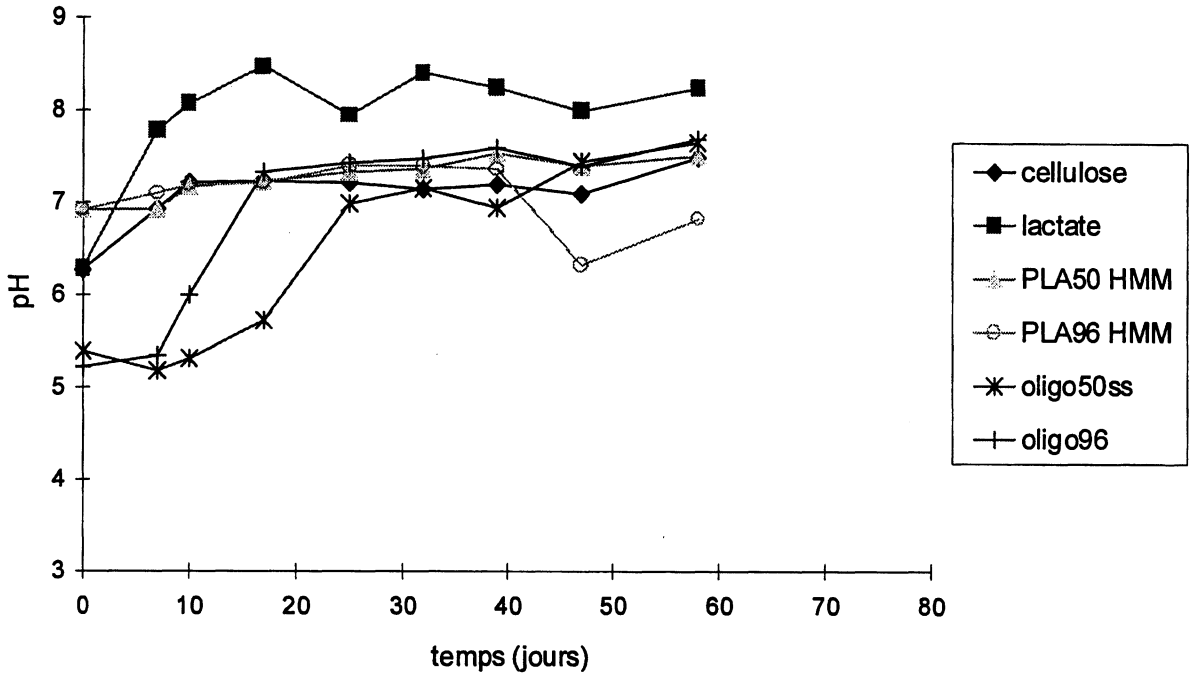


Figure IV-8 : Variation de pH dans du biosynthésol contenant du PLA ou des produits de dégradation, avec ajout de vers de terre subadultes et adultes au 13e jour

IV-2-2 Application de la méthode aux composés de type PLA

Les composés suivants ont été étudiés :

- OLA 50, $\overline{Mp}$=825, $\overline{Mn}$ =500, I=1,68
- OLA 96, $\overline{Mp}$=730, $\overline{Mn}$ =460, I=1,55
- PLA 50 HMM, $\overline{Mp}$=165000, $\overline{Mn}$ =99000, I=1,66
- PLA 96 HMM, $\overline{Mp}$=97000, $\overline{Mn}$ =54000, I=1,79

a) Apports de PLA 50 et 96

Les résultats sont montrés figure IV-9. En absence d'augmentation de poids, on peut conclure que les composés PLA de hautes masses molaires, PLA 50 ou PLA 96, ne permettent pas la croissance des vers de terre.

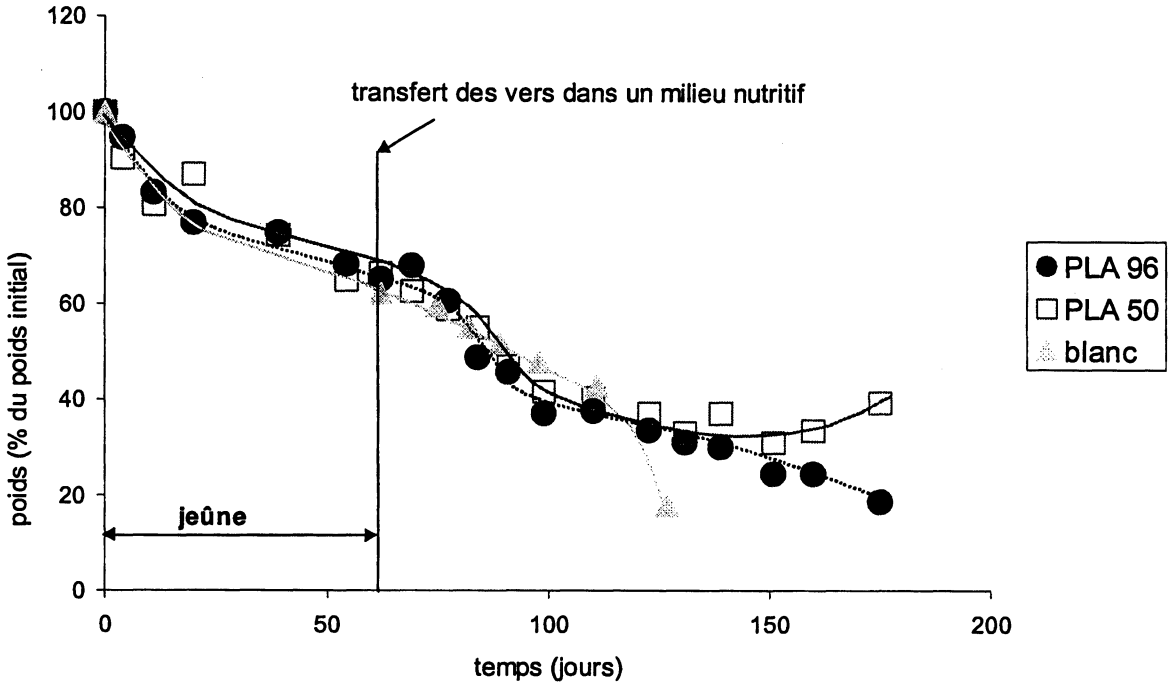


Figure IV-9 : Variation de poids des vers de terre adultes et subadultes ayant jeûné 62 jours et mis dans du biosynthésol avec comme seule source de carbone du PLA 50 et 96.

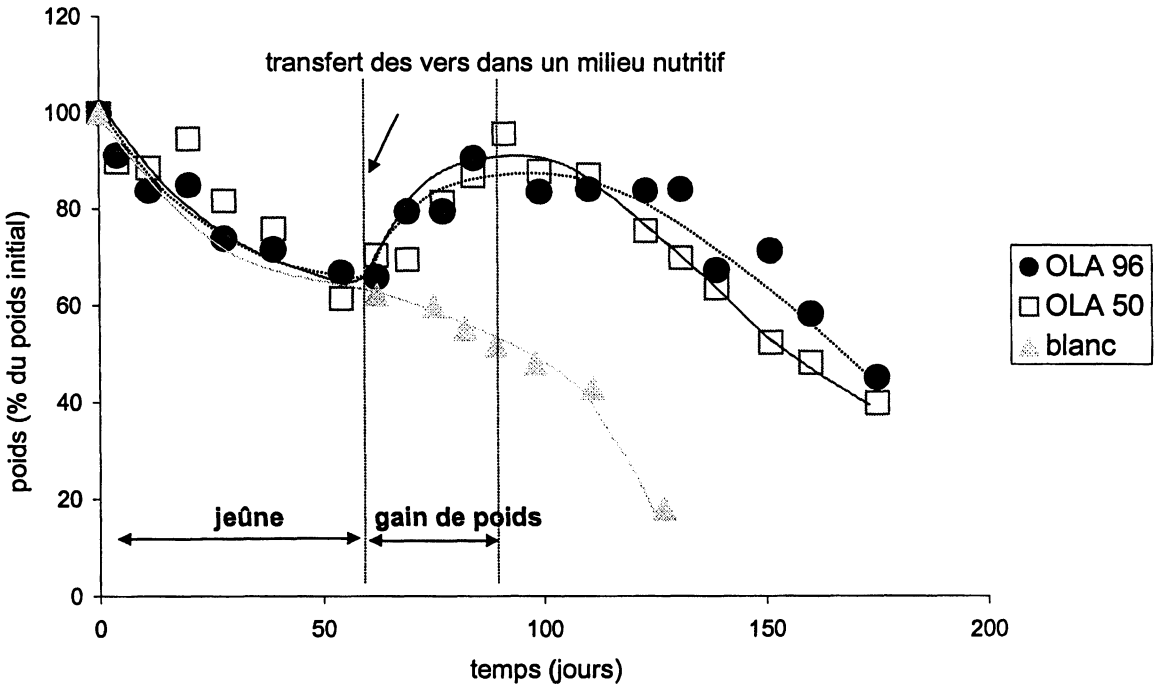


Figure IV-10 : Variation de poids des vers de terre adultes et subadultes ayant jeûné 62 jours et mis dans du biosynthésol avec comme seule source de carbone de l'OLA 50 et 96.

Dans le biosynthésol contenant du PLA 50 on constate au bout de 160 jours une légère remontée du poids des vers. Ceci est probablement dû à la dégradation hydrolytique du PLA 50 qui libère des sources de carbone directement ou indirectement -via les micro-organismes- assimilables par les vers de terre (monomères et oligomères de basses masses molaires,...). Il faut noter que les échantillons testés étaient sous forme de poudre. Compte tenu des travaux de Grizzi et al. (1995) ayant montré que plus un objet en PLA 50 est grand plus il se dégrade rapidement, on peut penser que la remontée en phase terminale serait survenue plus tôt dans le cas de tigettes ou d'objets encore plus gros.

b) Apport d'OLA 50 et 96

En ce qui concerne les oligomères soumis aux subadultes et contrairement au cas des PLA, les résultats sont positifs (figure IV-10). On constate une nette remontée du poids des vers après introduction dans du biosynthésol contenant des oligomères 50 ou 96. Le poids augmente jusqu'à 20 jours après introduction des vers de terre dans le biosynthésol, presque jusqu'au poids initial (100%) quel que soit l'oligomère, alors que lorsque la cellulose est utilisée comme source de carbone (témoin positif) le poids n'atteint que 85% du poids de départ. La vitesse de prise de poids est assez difficile à calculer en raison du manque de connaissance de l'incertitude, mais elle paraît pratiquement identique pour le témoin et pour les oligomères. Il semble n'y avoir que peu de différence entre les prises de poids dues à l'OLA 50 ou à l'OLA 96.

Cette prise de poids par les vers peut s'expliquer de 2 manières non exclusives l'une à l'autre :

- soit ils ont assimilé directement les OLA ou leurs produits de dégradation
- soit ils ont assimilé des micro-organismes qui eux-mêmes s'étaient nourris d'OLA. En effet, le milieu étant resté 13 jours en présence de micro-organismes, ces derniers ont pu dégrader les OLA et se multiplier.

Le deuxième mécanisme semble dominer d'après les résultats du chapitre IV, vu que les OLA se dégradent à la même vitesse avec et sans vers de terre.

Après ce pic à 100% du poids initial, le poids rediminue, à cause soit de l'épuisement de la source de carbone, soit de l'épuisement des micro-organismes qui servent de nourriture aux

vers de terre. La vitesse de diminution du poids semble être plus importante lorsque la source de carbone est l'OLA 96. Lorsque la source de carbone est la cellulose en poudre, elle semble être épuisée plus vite que lorsque la source est de l'OLA.

Le test mis au point est doublement intéressant, car il peut aussi servir de base à l'élaboration d'une norme de biodégradabilité des plastiques. Les tests de biodégradabilité des normes existantes (AFNOR X31-250, ISO 11268/1,...) n'évaluent que l'action des micro-organismes sur les matériaux, en particulier biodégradables, et qu'avec des substrats non standardisés. L'action de la faune tellurique n'est pas prise en compte. Les seules normes existantes prenant en compte les vers de terre ne font que déterminer l'effet des polluants sur les lombriciens (toxicité, effets sur la reproduction, etc...), sans tenir compte de leur effet sur la biodégradation des substances. Or les vers de terre constituent la première masse animale des terres émergées et participent activement au recyclage de la matière dans la nature (Bouché, 1972), et à ce titre il était intéressant de savoir s'ils peuvent participer à la biodégradation des substances xénobiotiques rejetées dans le sol.

IV-2-3 Conclusions

Les PLA HMM ne peuvent pas être directement bioassimilés par les vers de terre. On retrouve ici un résultat analogue à celui observé en présence de micro-organismes. Lorsque les PLA HMM sont soumis aux fortes températures et à l'humidité d'un compostage, ils se dégradent très rapidement en donnant des oligomères comme produits de dégradation.

Les oligomères pris comme modèle de ces produits de dégradation peuvent être bioassimilés par des vers de terre comme nous avons pu le montrer à l'aide de vers de terre amaigris. En effet ces derniers prennent du poids lorsque leur seule source de carbone est constituée par des OLA 50 ou 96.

Les OLA 50 se dégradent à la même vitesse en présence de micro-organismes qu'en présence de vers de terre, ce qui semble donc indiquer que ces derniers se nourrissent des micro-organismes ayant poussé grâce à ces OLA plutôt que directement des OLA eux-mêmes. En effet, si leur action avait été complémentaire à celle des micro-organismes, on aurait dû avoir une dégradation des OLA plus rapide en présence de vers.

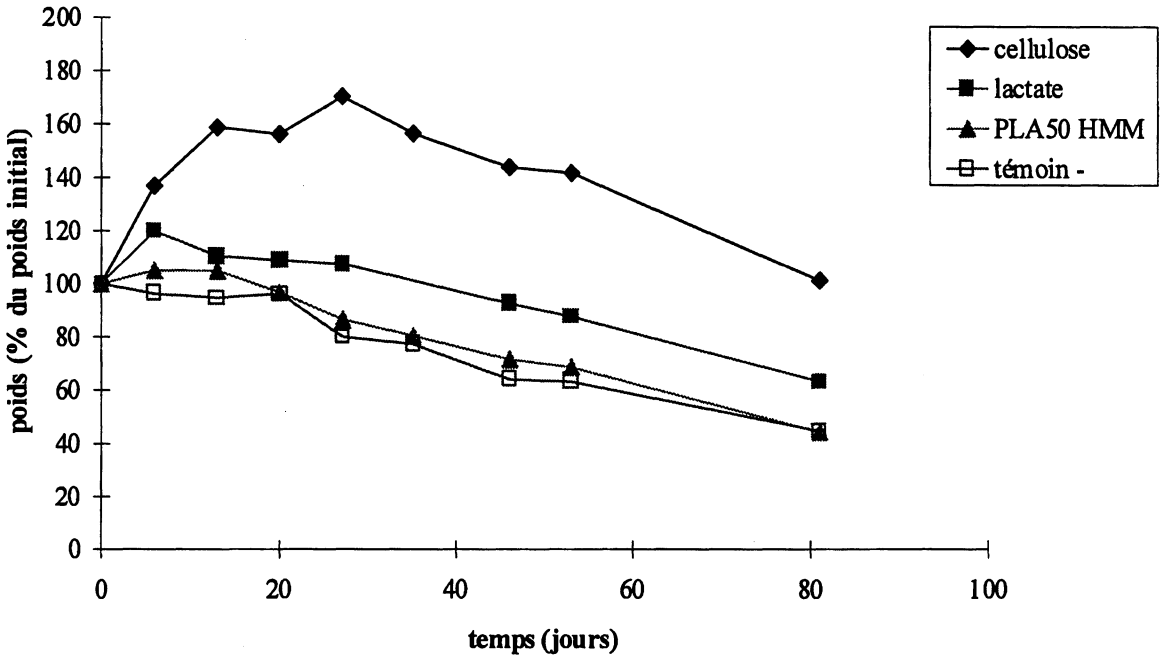


Figure IV-4 : Cinétiques des variations de poids des vers de terre juvéniles ayant comme seule source de carbone du PLA, des produits de dégradation ou de la cellulose.

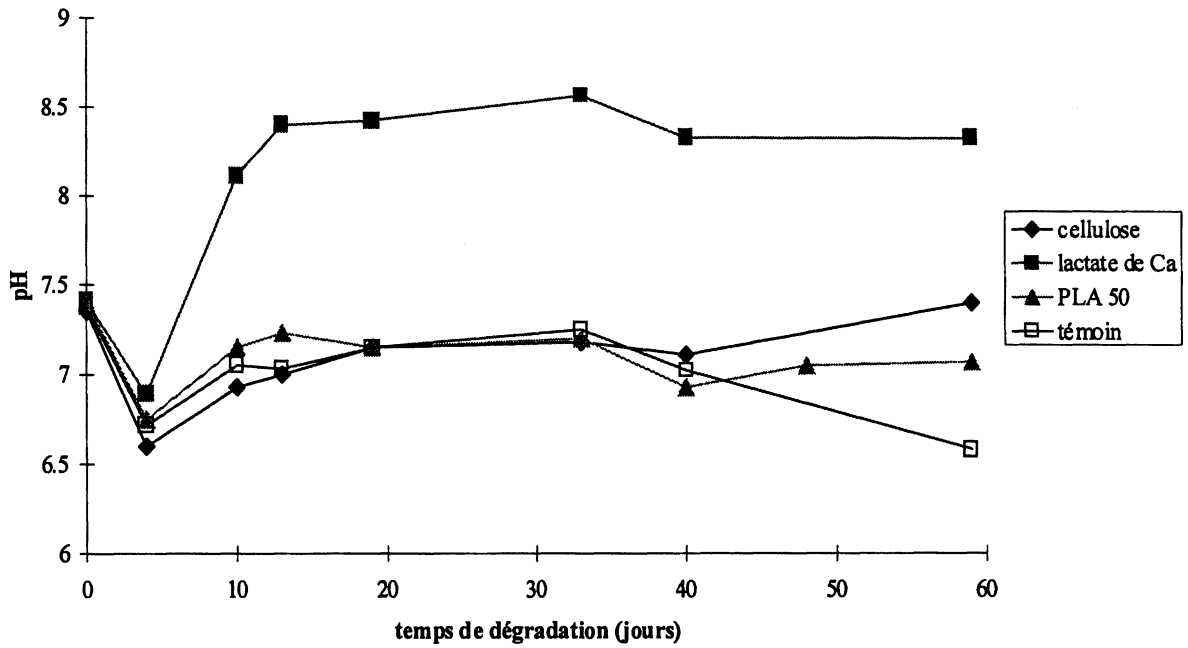


Figure IV-5 : Cinétiques des variations de pH dans du biosynthésol contenant du PLA ou des produits de dégradation, avec ajout de vers de terre juvéniles au 13e jour.

-tests avec des vers de terre adultes

Afin de savoir combien de temps il faut faire jeûner les vers de terre adultes pour avoir une perte de poids de 50% environ, 10 vers de terre ont été laissés dans un bocal contenant 30 billes de verre et 30 g de Lévilite, et leur perte de poids a été régulièrement suivie. La figure IV-6 nous montre cette perte de poids et la survie des vers de terre subadultes et adultes dans de la lévilite seule. On peut constater que les vers de terre sont encore vivants au 140e jour de jeûne. Ils perdent environ 50% de leur poids en 62 jours. Cette perte de 50% a été considérée comme suffisante pour permettre de constater une reprise de poids dans le cas où une source de carbone disponible est mise à la disposition de la population de lombriciens. Nous avons donc choisi de laisser les vers dans de la lévilite pure pendant 62 jours pour leur faire perdre 50% de leur poids puis, comme pour les juvéniles, nous les avons mis dans du biosynthésol enrichi en une source de carbone.

Dans un premier temps, les lombriciens amaigris ont été mis comparativement en présence de cellulose, de lactate de calcium, et d'un témoin négatif exempt de source carbonée. La figure IV-7 présente les résultats. Lorsque la seule source de carbone est la cellulose ou le lactate, on note que pendant environ 20 jours, la population de lombriciens reprend du poids. Au-delà, on observe un nouvel amaigrissement. Lorsque la source de carbone est la cellulose, la remontée du poids des vers va jusqu'à 85% du poids initial après 20 jours de contact. Le lactate conduit à une remontée équivalente du poids jusqu'à 80% du poids de départ au cours de la même période. Au-delà, le poids redescend lentement avec la cellulose, tandis que les vers de terre meurent rapidement après autotomie dans le cas du milieu lactate. La mort des vers de terre (un seul a survécu) est attribuée à un stress brutal lié au pH du milieu. En effet on a observé une remontée assez forte du pH (voir figure IV-8), jusqu'à 8,5, ce qui est excessif pour des vers de terre. Le même problème de pH a été observé avec les juvéniles, par contre pour ces derniers la mortalité a été plus faible (3/10 contre 9/10) mais plus précoce (5 jours de contact contre 20).

Les résultats précédents montrent qu'une population de lombriciens amaigris répond d'une manière très sensible à la mise à disposition de composés assimilables. La méthode résultante peut donc être appliquée à l'étude des composés de type PLA.

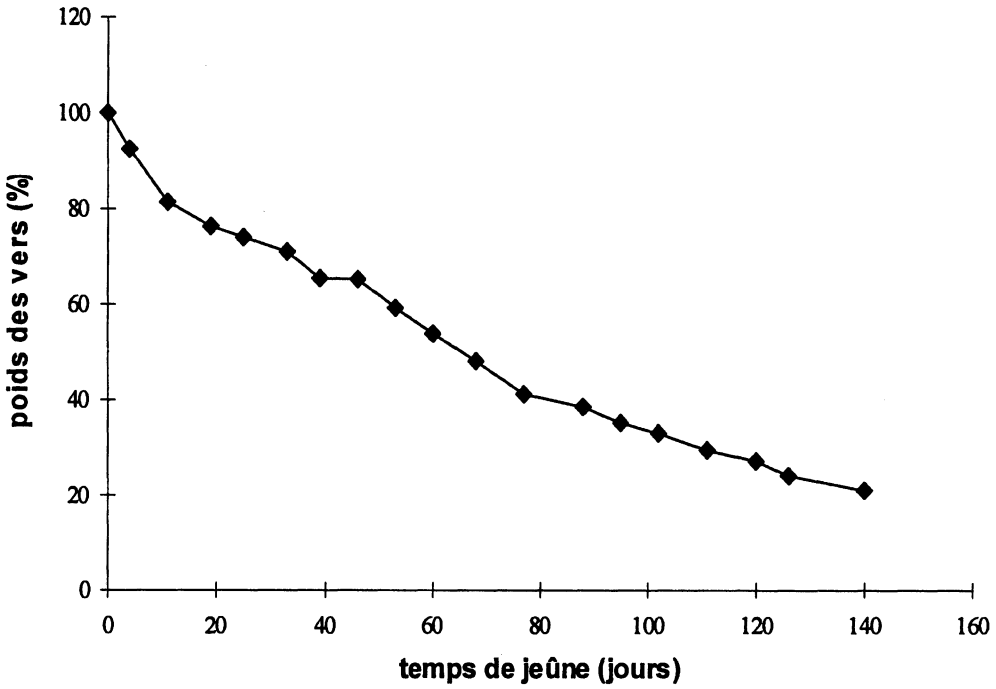


Figure IV-6 : Variation de poids des vers de terre subadultes et adultes dans la lévilite

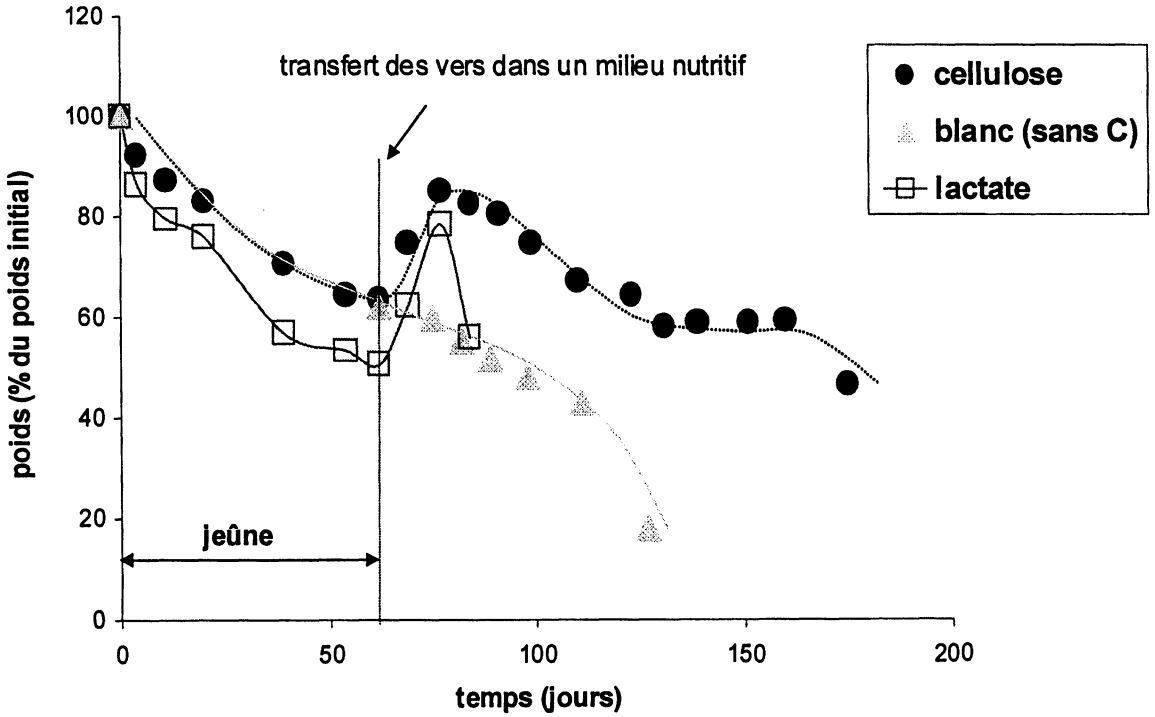


Figure IV-7 : Variation de poids des vers de terre adultes et subadultes ayant jeûné 62 jours et mis dans du biosynthésol avec comme seule source de carbone de la cellulose ou du lactate

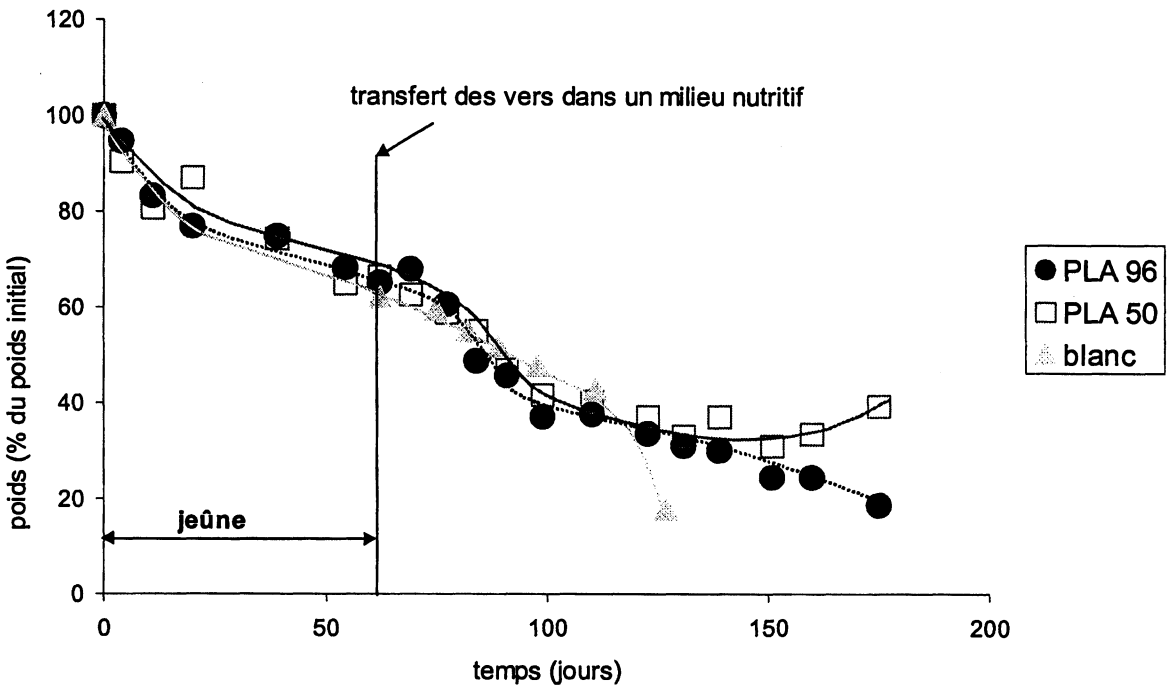


Figure IV-9 : Variation de poids des vers de terre adultes et subadultes ayant jeûné 62 jours et mis dans du biosynthésol avec comme seule source de carbone du PLA 50 et 96.

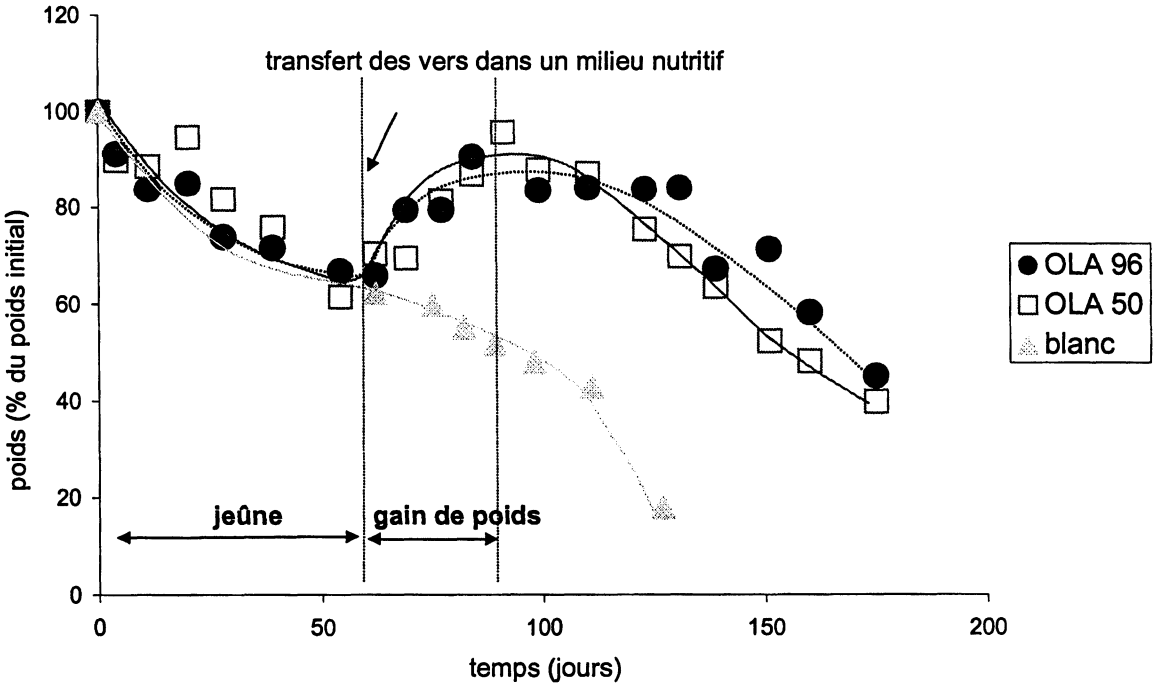


Figure IV-10 : Variation de poids des vers de terre adultes et subadultes ayant jeûné 62 jours et mis dans du biosynthésol avec comme seule source de carbone de l'OLA 50 et 96.

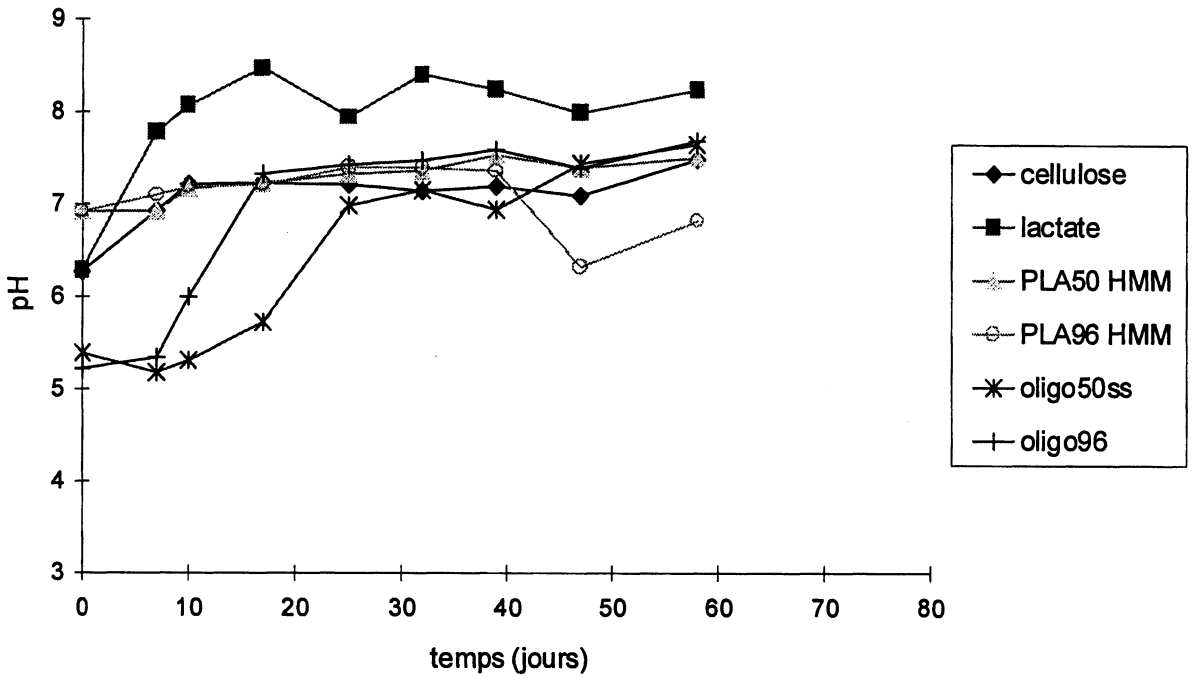


Figure IV-8 : Variation de pH dans du biosynthésol contenant du PLA ou des produits de dégradation, avec ajout de vers de terre subadultes et adultes au 13e jour

IV-2-2 Application de la méthode aux composés de type PLA

Les composés suivants ont été étudiés :

- OLA 50, $\overline{Mp}$=825, $\overline{Mn}$ =500, I=1,68
- OLA 96, $\overline{Mp}$=730, $\overline{Mn}$ =460, I=1,55
- PLA 50 HMM, $\overline{Mp}$=165000, $\overline{Mn}$ =99000, I=1,66
- PLA 96 HMM, $\overline{Mp}$=97000, $\overline{Mn}$ =54000, I=1,79

a) Apports de PLA 50 et 96

Les résultats sont montrés figure IV-9. En absence d'augmentation de poids, on peut conclure que les composés PLA de hautes masses molaires, PLA 50 ou PLA 96, ne permettent pas la croissance des vers de terre.

Dans cette partie de notre travail, une méthode a été proposée, testée et exploitée, fondée sur l'aptitude des lombriciens amaigris à grossir en présence d'une substance bioassimilable. Cette méthode proche de celle recommandée pour évaluer la toxicité pourrait tout à fait servir de base à l'élaboration d'une norme sur des tests de biodégradabilité de plastiques (ISO,...), tenant compte de la faune du sol.

Si la méthode permet de mettre en évidence l'assimilation des produits de décomposition des PLA, elle ne nous a aucunement renseigné sur leur devenir et notamment leur biodistribution au sein d'un organisme lombricien. Dans le chapitre suivant, nous essaierons d'apporter des éclaircissements sur ce point.

Chapitre V

SUIVI DU DEVENIR D'OLA SOUMIS A L'ACTION DES VERS DE TERRE. UTILISATION D'OLA RADIOACTIF

Chapitre V
Suivi du devenir d'OLA soumis à l'action des vers de terre- Utilisation d'OLA radioactif

Nous avons vu au chapitre II que du PLA peut se trouver dans des fèces de vers de terre. Au chapitre IV, nous avons montré que les lombriciens peuvent bioassimiler les oligomères. L'un des moyens de connaître plus précisément le devenir des produits de dégradation des oligomères dans les lombriciens est d'utiliser des oligomères radiomarqués pour localiser les résidus de PLA dans les tissus. Au laboratoire, Dos Santos *et al.* (1998) ont mis au point une méthode de radiomarquage du lactide fondée sur la substitution de l'atome d'hydrogène en α du carbonyle par du tritium (^3H). Il serait théoriquement possible d'utiliser des oligomères issus de ce radiomarquage mais lorsque l'acide lactique issu de la dégradation du PLA pénètre dans une cellule animale, la première transformation que subit la molécule donne du pyruvate en perdant l'atome d'hydrogène de son carbone en α et celui de la fonction alcool reliée à ce même carbone en α (voir figure V-1). Il est donc relativement peu intéressant d'utiliser le PLA marqué au ^3H car sa mesure n'est pas spécifique ; l'eau tritiée, produit le plus abondant de cette première transformation, sera le reflet de l'activité biologique en général, et ne résultera pas forcément du métabolisme lombricien.

Il est préférable d'utiliser du OLA uniformément marqué au ^{14}C. En effet, d'après le schéma d'assimilation du PLA (figure V-1), le ^{14}C issu de l'acide lactique devrait - en admettant la généralité inter-espèce de la biochimie de l'acide lactique - se retrouver soit sous forme de CO_2 (cycle de Krebs), soit assimilé dans les tissus lombriciens sous forme de glycogène (néoglucogenèse), de lipides ou de protéines, car le pyruvate est une molécule « carrefour ». On devrait pouvoir facilement suivre le devenir du squelette carboné des OLA par contrôle du ^{14}C dégagé et par autoradiographie des tissus lombriciens, ce qui devrait nous permettre de constater la bioassimilation des OLA.

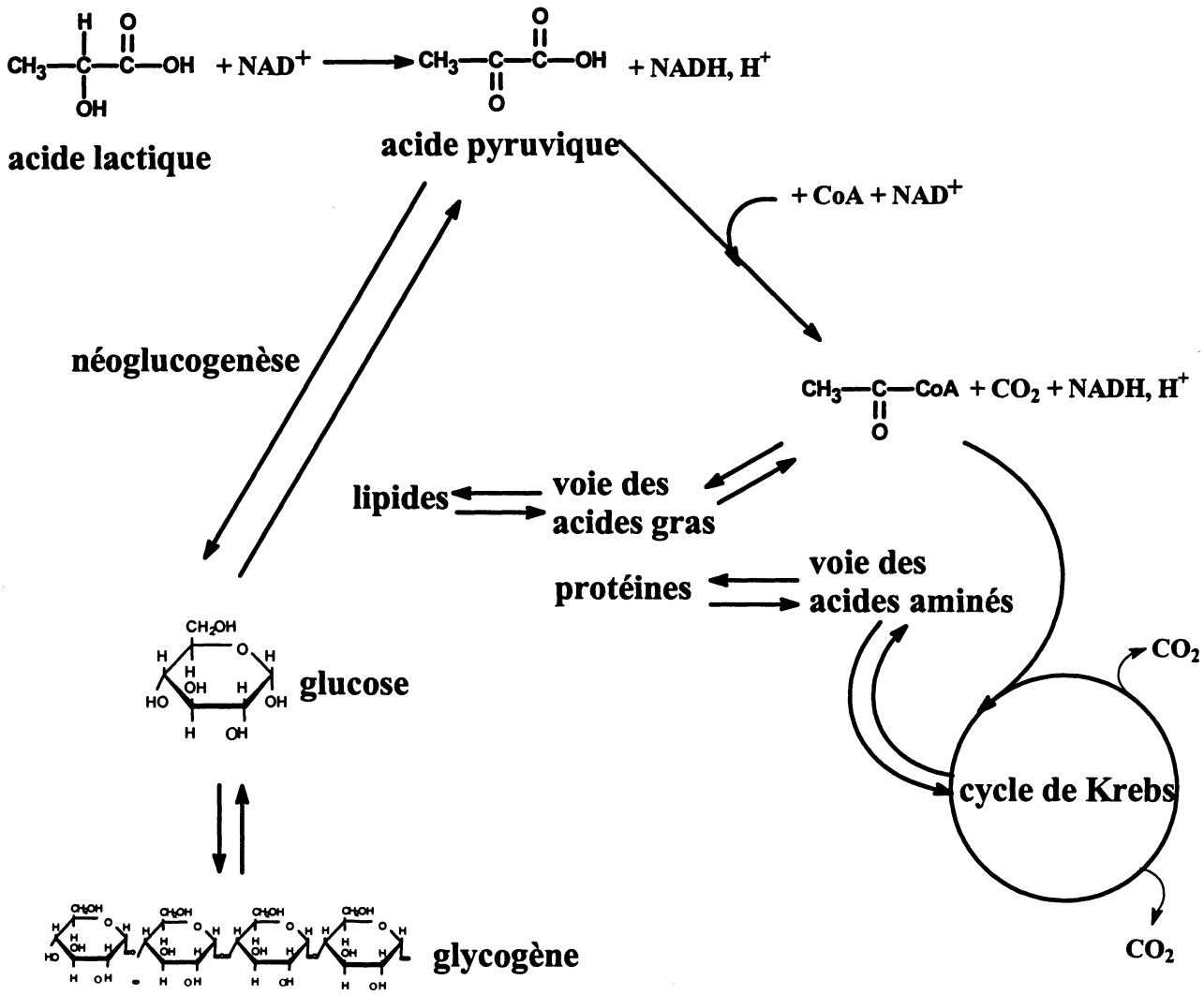


Figure V-1 : Schéma du métabolisme potentiel du lactate dans des tissus lombriciens. Cycle de Krebs, néoglucogenèse, autres voies métaboliques.

V-1 Matériel

Des oligomères radioactifs de PLA 50 marqués au ^{14}C ont été synthétisés au laboratoire à partir d'acide D,L-lactique radioactif (NEN Life Science Products, 50 µCi (1,85 MBq)/0.5 ml) uniformément marqué au ^{14}C. Les oligomères ont été synthétisés par polycondensation (voir partie expérimentale PE-V-1).

La masse molaire moyenne en nombre des oligomères obtenus a été déterminée par alcalimétrie rapide avec NaOH 5.10^{-3} M. Elle est de 415 g/mol, et la radioactivité spécifique obtenue est de 1,62 nCi/ mg (59,94 Bq/mg).

V-2 Préparation du montage

3 montages ont été exploités en parallèle pour accueillir des piluliers chargés en biosynthésol+OLA 50 (voir figure V-2). Chaque montage a été conçu dans un but spécifique :

- 1- Récupérer les vers de terre et étudier leur radioactivité intrinsèque pour vérifier si ces derniers ont effectivement assimilé l'OLA. Le bocal contenait alors 8 piluliers renfermant chacun 2 vers de terre. Un ver a été prélevé à intervalles réguliers.
- 2- Suivre la libération de $^{14}CO_2$ due aux micro-organismes seuls (blanc). Ce bocal contenait un pilulier de biosynthésol sans ver de terre.
- 3- Suivre la libération de $^{14}CO_2$ par les vers de terre. Ce bocal contenait un pilulier avec 2 vers de terre dans du biosynthésol.

Dans la pratique, pour chaque pilulier, 0,2 g (soit 324 nCi ou 11,99 KBq) de OLA 50 radioactif est dissous dans de l'acétone et mélangé à 5 g de lévilite puis le solvant est évaporé à l'air libre. La poudre est ensuite transférée dans un pilulier et additionnée de 12,5 ml de milieu de Winogradsky, lui-même inoculé de micro-organismes provenant de fèces de vers de terre. Les piluliers sont ensuite transférés dans des bocaux, eux-mêmes reliés aux montages décrits dans le schéma V-1. Ce transfert s'effectue au temps T_0. Les piluliers sont laissés 13 jours tels quels (temps de stabilisation du pH), puis 2 *E. andrei* juvéniles sont ajoutés dans les piluliers prévus (montages 1 et 3). Nous utilisons des juvéniles car nous cherchons à mettre en évidence la répartition des OLA dans les tissus, et des tissus en développement nous aideront à savoir où vont les métabolites issus de la nourriture.

Le principe des montages est le suivant : de l'air insufflé à débit constant mais non régulé permet d'entraîner le CO_2 formé vers un premier piège constitué de 200 ml de NaOH 0,2 N. Un second piège placé juste après (200 ml de NaOH 0,2 N) constitue une sécurité en cas de saturation du premier, le troisième piège commun aux trois circuits étant une ultime sécurité pour éviter au $^{14}CO_2$ de s'échapper. Juste avant le bocal contenant l'éprouvette, un piège à CO_2, qui consiste en un flacon de NaOH 0,5 M (200 ml), a pour fonction de piéger le CO_2 de l'air ambiant, afin que seul le CO_2 radioactif produit par la biodégradation soit piégé ultérieurement après balayage de l'air dans les bocaux.

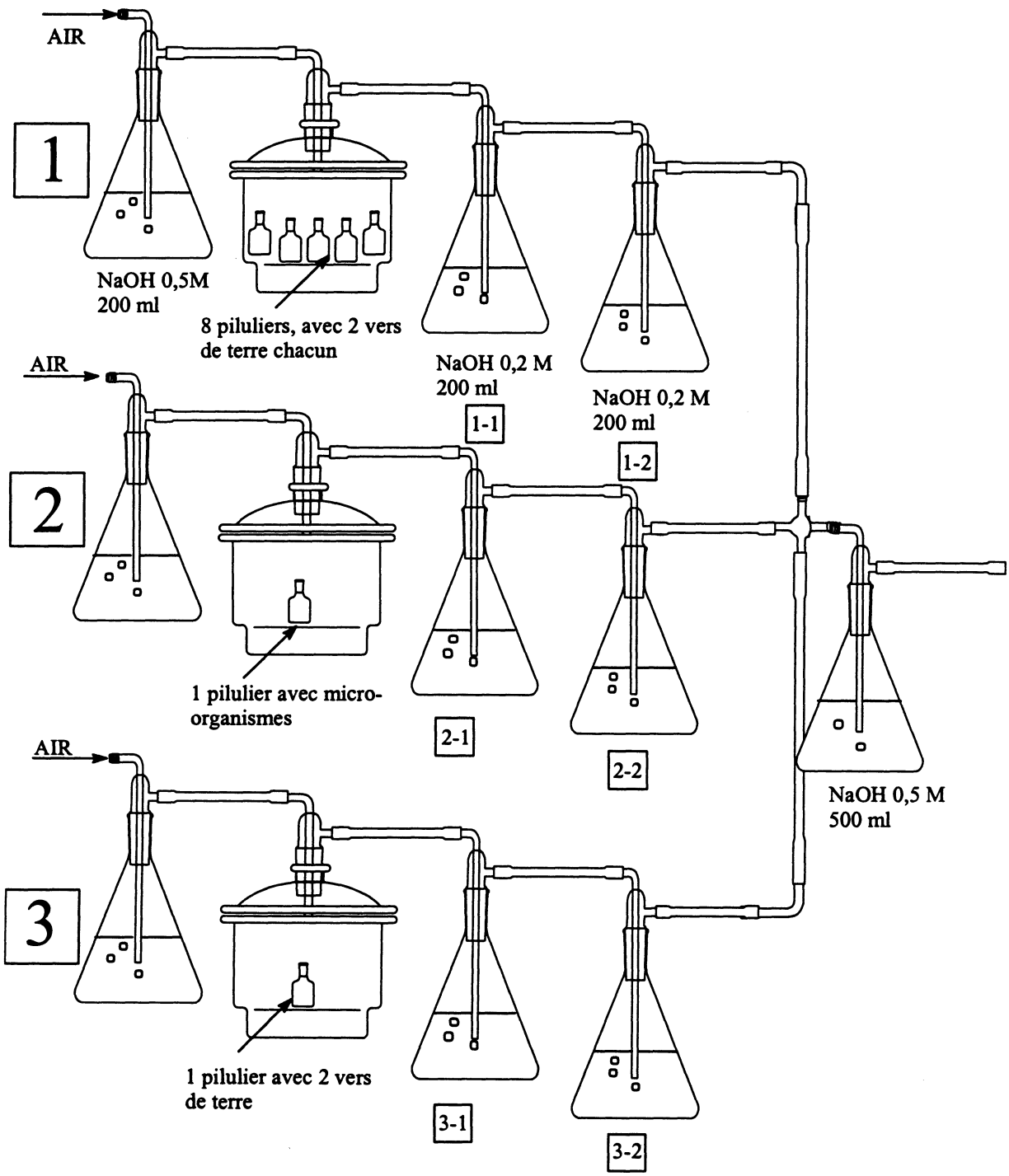


Figure V-2 : Schéma du montage tripartite utilisé pour le suivi du CO_2 radioactif et pour le suivi intratissulaire de l'OLA 50 soumis à la dégradation lombricienne et microbienne (débit d'air: 2,5 ml/mn dans les 3 montages).

V-3 Suivi et dosage de $^{14}CO_2$

Dans les montages 2- et 3-, la production de $^{14}CO_2$ provenant de l'OLA radioactif est suivie par prélèvement régulier de NaOH dans les flacons 2-1 et 3-1, ainsi que dans les flacons 2-2 et 3-2 (pièges) pour surveiller une saturation éventuelle des flacons 2-1 et 3-1. Il y

a théoriquement assez de NaOH pour piéger tout le CO_2. Le flacon 4 n'est vérifié qu'épisodiquement.

0,25 ou 0,5 ml de NaOH est prélevé dans les flacons, et additionné de liquide scintillant (6 ml) Ecolite® (ICN Biomedicals Inc.) dans des fioles de scintillation en verre, puis mesuré dans un compteur à scintillation liquide (Packard).

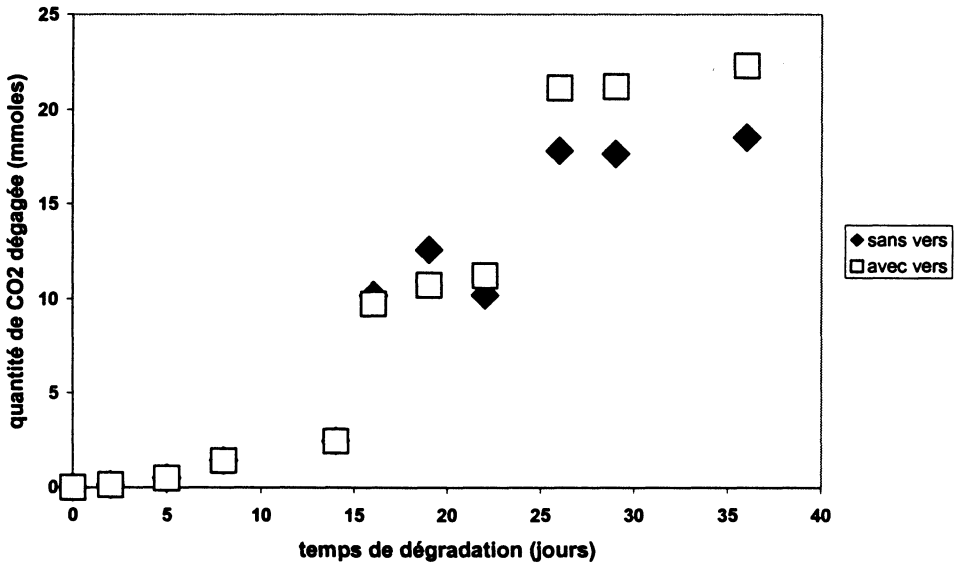


Figure V-3 : Comparaison entre le dégagement de CO_2 radioactif provenant de la dégradation d'OLA 50 en présence ou en absence de ver de terre.

La mesure du dégagement de $^{14}CO_2$ (figure V-3) permet de déterminer la quantité d'OLA 50 minéralisée par les micro-organismes ou/et par les vers de terre dans le biosynthésol. Le $^{14}CO_2$ provenant des OLA 50 augmente régulièrement jusqu'au 27e jour. Rappelons que les résultats du suivi de dégradation du OLA (chapitre III) ont révélé une dégradation jusqu'au 40e jour. Malgré cette légère discordance, la stagnation de la formation de CO_2 au-delà de 27 jours indique que les OLA sont entièrement minéralisés. Le maximum de $^{14}CO_2$ théorique correspondant à la quantité de OLA dans le milieu est de 15 mmol par bocal. Or, il se trouve que la quantité mesurée est supérieure à la quantité théorique au bout de 27 jours si on additionne les quantités de CO_2 des deux flacons (normal + piège).

On remarque aussi qu'il y a une très faible différence de minéralisation dans les bocaux contenant d'une part les micro-organismes et d'autre part les vers de terre+micro-

organismes, ce qui confirme l'absence de contribution propre des vers de terre trouvée au chapitre IV. Le bocal avec vers de terre semble avoir un taux de minéralisation légèrement plus élevé. Cette différence ne se manifeste qu'au niveau de la phase plateau, mais l'incertitude sur la mesure ne permet pas d'affirmer que cette différence est significative.

V-4 Suivi du devenir de l'OLA 50 dans les lombriciens

Un ver de terre est prélevé régulièrement dans les piluliers du montage 1-, lavé, ouvert à l'aide de petits ciseaux sur la face ventrale pour mettre à jour l'intestin, lequel est rincé pour éliminer le plus possible de fèces contaminés radioactivement. Le cadavre est alors dissous dans du Soluène® (Packard) et analysés par scintillation liquide.

S'il s'avère que le ver de terre contient de la radioactivité en quantité significative, l'autre ver du même pilulier est prélevé et disséqué de la même manière. Il est alors conservé dans une solution FAA (formol-alcool éthylique-acide acétique, voir annexe 2), en attendant d'être analysé par autoradiographie de tissu.

Il est aussi possible d'autoradiographier soit un ver de terre en entier, soit des coupes de ver de terre. Pour un lombricien, la coupe la plus informative est la coupe longitudinale. Avec cette coupe on peut en effet voir tous les tissus en limitant le nombre de tranches par rapport à une transversale. Le découpage se fait grâce à un microtome à -20°C. Les tranches sont posées deux par deux sur des lames de microscope, puis laissés au froid.

Lorsqu'il s'agit d'un ver de terre entier, ce dernier est aussi séché sur papier filtre et déposé sans colle sur une lame.

L'autoradiographie se fait à l'aide d'un Cyclone™ (Packard), qui est un système à accumulation de phosphorescence. Les lames sont disposées dans une chambre noire et laissées en contact avec un film radiosensible restauré (« érasé »). Le contact est maintenu pendant 6 jours pour un ver de terre entier, et pendant 7 semaines pour des tranches de ver de terre ; L'écran est alors analysé grâce au Cyclone™. Un blanc est fait en étalant sur une lame une quantité connue d'OLA radioactif, à 1000 et 5000 DPM.

Après dissolution des vers de terre en milieu organique, on a retrouvé de la radioactivité dans les tissus lombriciens (voir tableau V-1). Les résultats sont plutôt irréguliers, ce qui peut s'expliquer par la prise de nourriture discontinue des vers de terre. Si on se trouve à un moment où il se nourrit, il peut incorporer les OLA ou ses résidus dans ses tissus, et dans ce cas on a beaucoup de radioactivité. Si c'est dans une période où il ne se nourrit pas, il y a moins de radioactivité parce que, le métabolisme étant rapide, les molécules assimilées sont métabolisées dans le cycle de Krebs et se retrouvent sous forme de CO_2, sauf ce qui a été accumulé par néoglucogénèse.

Tableau V-1 : Quantité de radioactivité trouvée dans les vers de terre dissous dans le Soluène.

Durée de dégradation de l' OLA 50 (jours)	Temps de contact des vers de terre avec l'OLA 50 (jours)	Poids frais du ver de terre (g)	Quantité totale de radioactivité par ver de terre (dpm)
0	0	nd	nd
14	0	nd	nd
19	5	0.197	1003(1)
		0.252	1183(1)
		0.154	41
22	8	0.139	15183
26	12	0.162	3957
		0.170	*
29	11	0.186	395
		0.2965	*
42	2	1.567	27113
		0.183	*
	5	0.189	3831
	12	0.194	2316
29	28	0.143	2584
		0.144	*

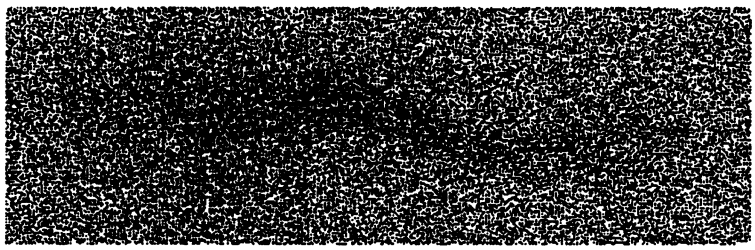
*: ces vers de terre ont été mis dans du FAA en attendant une autoradiographie

(1) : ces vers de terre ont été retrouvés morts dans leur pilulier

A partir des analyses autoradiographiques faites à l'aide du Cyclone™, on a trouvé de la radioactivité (6588 dpm) dans un ver de terre prélevé 26 jours après le début de l'expérience, c'est-à-dire 12 jours après avoir été mis en contact avec le biosynthésol (figure V-5). Il semble y avoir plus de radioactivité dans la partie antérieure du lombricien que dans sa partie postérieure.

Un autre ver de terre, resté 2 jours dans le biosynthésol, a été découpé au microtome. L'autre lombricien présent dans le même pilulier avait 27000 dpm répartis dans son organisme. Nous avons obtenu environ 80 coupes longitudinales de 20 µm, mais ceci ne nous indique pas l'épaisseur du lombricien car il n'était pas entièrement plat sur son support. Nous n'avons décelé aucune radioactivité dans ces coupes, la radioactivité trop diluée se confondant avec le bruit de fond.

Partie postérieure



Partie antérieure

Figure V-4 : Autoradiographie d'un ver de terre nourri pendant 12 jours d'oligomères uniformément marqués au ^{14}C.

Ces résultats montrent qu'un ver de terre est capable d'assimiler des résidus radioactifs issus d'OLA dans ses tissus. Le mécanisme exact n'est pas connu. Cependant, nous pouvons présumer du devenir du résidu ultime de la dégradation, l'acide lactique. Il peut suivre deux voies métaboliques (voir figure V-1) :

- il sert directement à la survie et au maintien de l'organisme. A partir du pyruvate, il peut se former selon les besoins de la cellule des acides aminés et des protéines, des acides gras, ou des acides nucléiques. Ces molécules après avoir rempli leur fonction finissent par entrer dans le cycle de Krebs et sont transformées en CO_2 en donnant de l'énergie sous forme d'ATP et de $NADH,H^+$. Il est possible de voir l'assimilation dans les tissus à condition de l'étudier assez tôt, avant que les molécules n'entrent dans le cycle de Krebs.

- il sert de réserve sous forme de glycogène. La majeure partie de l'acide lactique assimilé, au lieu de subir le cycle de Krebs, emprunte la voie de la néoglycogenèse. Il est alors stocké dans des globules de glycogène dans les cellules. On peut visualiser la présence de matières radioactives en autoradiographie. La réserve de glycogène n'est utilisée qu'en cas de jeûne prolongé. Les molécules de glycogène sont alors dégradées via le cycle de Krebs.

Cependant, les expériences n'ont pas prouvé que les vers étaient les responsables directs de la dégradation des OLA. Ces derniers peuvent avoir été dégradés par les micro-organismes commensaux de l'intestin des lombriciens.

V-5-Conclusion

La vitesse de dégradation des OLA 50 est la même que ce soit en présence des micro-organismes ou des vers de terre, ce qui montre que ces derniers ne les dégraderaient pas eux-mêmes. Dans le présent chapitre nous avons vérifié grâce au marquage au ^{14}C que des résidus provenant des oligomères OLA 50 se retrouvent bien dans les tissus lombriciens sans toutefois que nous ayons pu les localiser précisément, notamment par rapport aux oligomères.

Les résultats suggèrent à nouveau que les oligomères ont été dégradés par les micro-organismes commensaux de l'intestin des lombriciens, ou par les micro-organismes du milieu environnant. Il nous a donc paru intéressant de vérifier si des micro-organismes capables d'assimiler des oligomères OLA se retrouvent dans le biosynthésol et dans l'intestin des vers de terre.

Chapitre VI

EVOLUTION DE LA MICROFLORE EN LOMBRICOMPOSTAGE AVEC OLA 50 ET 96

Chapitre VI
Evolution de la microflore en lombricompostage avec OLA 50 et 96

Les vers de terre sont capables d'assimiler les oligomères de PLA 50, mais nous ne savons pas s'ils les assimilent directement ou par l'intermédiaire de micro-organismes. Torres (1995) a prouvé que certains micro-organismes (*Fusarium monoliforme* et *Pseudomonas putida*) sont capables de bioassimiler les OLA 50. Par ailleurs, les souches de champignons filamenteux *Aspergillus niger* et *Fusarium monoliforme* ont été identifiées comme capables de dégrader d'autres polyesters aliphatiques (Nishida et Tokiwa, 1993, Gonsalves et al, 1992, cités par Torres, 1995). Nous avons donc envisagé de déterminer si des champignons filamenteux sont présents dans le biosynthésol et dans l'intestin des vers de terre.

Nous allons, dans ce chapitre, suivre les variations quantitatives et qualitatives de la microflore dans les fèces de vers de terre en parallèle avec les micro-organismes présents dans le biosynthésol seulement. Les sources de carbone utilisées sont les oligomères OLA 50 et OLA 96 puisque nous avons vu que ces composés permettent la croissance des vers de terre.

VI-1- Dénombrement de la microflore épidermique

Avant de dénombrer la microflore des fèces de vers de terre, il est nécessaire de dénombrer la microflore épidermique puisque celle-ci va forcément se retrouver mêlée aux fèces. Nous pourrons ainsi corriger les données obtenues. La microflore épidermique a été dénombrée selon deux protocoles :

1- 10 vers prélevés dans le milieu d'élevage sont lavés 2 fois à l'eau physiologique stérile additionnée d'un détergent doux, le Tween 80, et rincés. Ils sont alors placés dans 50 ml d'eau physiologique stérile, agités manuellement pendant 3 mn, et retirés du flacon d'eau physiologique. La suspension ainsi constituée est la suspension mère. Les premières dilutions d'un facteur 10 (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) sont ensemencées sur le milieu de culture PCA (Plate Count Agar, Difco) additionné de cycloheximide (Sigma) à 0,05 g/500 ml pour dénombrement des bactéries, et sur le milieu PDA (Patate Dextrose Agar, Difco) additionné de Rose de Bengal (Sigma) à 0,025g/500 ml et de chloramphénicol (Sigma) à 0,05 g/500 ml pour dénombrer les

champignons. Les boîtes sont incubées à 25°C, et dénombrées 2 et 6 jours après ensemencement.

2- Trois vers sont lavés de la même façon, puis placés individuellement sur une boîte de Pétri contenant du PCA ou du PDA pendant 5 mn. La boîte est alors incubée telle quelle à 25°C.

Le dénombrement de la microflore épidermique est montré dans le tableau VI-1.

Tableau VI-1 : Dénombrement de la microflore épidermique des vers de terre.

Micro-organismes	Durée d'incubation	
	2 jours	6 jours
Bactéries	3.10^5	$1.4.10^6$
Champignons	6.10^3	8.10^3

Il est à noter que le deuxième protocole ne permet pas un bon comptage car les micro-organismes sont tassés les uns sur les autres. Les résultats des comptages de la microflore épidermique sont pris en compte dans les calculs de dénombrements de la microflore des fèces de vers de terre.

VI-2 Dénombrement de la microflore des fèces de vers de terre et du biosynthésol témoin sans ver

Le suivi de la microflore dans les fèces et dans le milieu témoin sans ver se fait sur 2 mois. Le milieu de culture est le biosynthésol utilisé précédemment, placé dans une étuve thermostatée à 25°C. Les sources de carbone utilisées sont:

- OLA 50, $\overline{M}p$=825, $\overline{M}n$ =500, I=1,68
- OLA 96, $\overline{M}p$=730, $\overline{M}n$ =460, I=1,55

Le dénombrement de la microflore consiste à faire des dilutions en série d'une suspension de fèces ou d'une suspension de biosynthésol, et à ensemencer ces dilutions sur des milieux de culture solides spécifiques des micro-organismes étudiés.

VI-2-1 Prélèvement des fèces

Des prélèvements sont effectués régulièrement. Les billes de verre sont d'abord enlevées stérilement avec une pince, les 10 vers de terre sont récupérés et lavés 3 fois avec de l'eau stérile. Le poids des fèces frais est déterminé par pesée des vers de terre avant et après défécation de la façon suivante : après lavage les vers sont pesés (P1) avant d'être placés dans une boîte de Pétri pendant 18 heures, récupérés et pesés de nouveau (P2), puis sont remis dans leur biosynthésol de départ. Le poids des fèces frais est donné par P2-P1.

Les fèces présents dans la boîte de Pétri sont ensuite récupérés dans un flacon avec 50 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0,9%), et homogénéisés à l'ultraturrax. Ceci constitue la suspension mère 10^0. A partir de cette suspension mère, des dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} sont effectuées, en utilisant pour chacune 1 ml de solution dans 9 ml d'eau physiologique stérile.

VI-2-2 Prélèvement dans le biosynthésol témoin sans ver

Dans le biosynthésol sans ver, environ 2 g de milieu sont prélevés stérilement. Pour diminuer le problème de l'hétérogénéité du milieu, celui-ci est râclé depuis le fond pour un échantillonnage optimum. Les 2 g sont alors séparés en deux lots :

- environ 1 g est pesé, mis à sécher à l'étuve à 105°C pendant 24 h, puis repesé pour déterminer le poids sec,
- le reste est aussi pesé, puis mélangé à 50 ml d'eau physiologique stérile et homogénéisé à l'ultraturrax. C'est la suspension mère à partir de laquelle les dilutions d'un facteur 10 sont réalisées.

VI-2-3 Ensemencement des dilutions

Pour chaque dilution (suspension de fèces ou de biosynthésol), 200 µl sont prélevés et ensemencés sur 2 milieux :

1- Plate Count Agar (PCA) + cycloheximide 0,05 g/500 ml, pour les dilutions 10^{-4} à 10^{-6}, pour compter les bactéries aérobies. Pour certains temps, les dilutions de 10^{-3} à 10^{-5} sont aussi ensemencées sur PCA, puis placées dans des jarres anaérobies, avec des plaques de Microcult A (Merck) pour une anaérobiose complète.

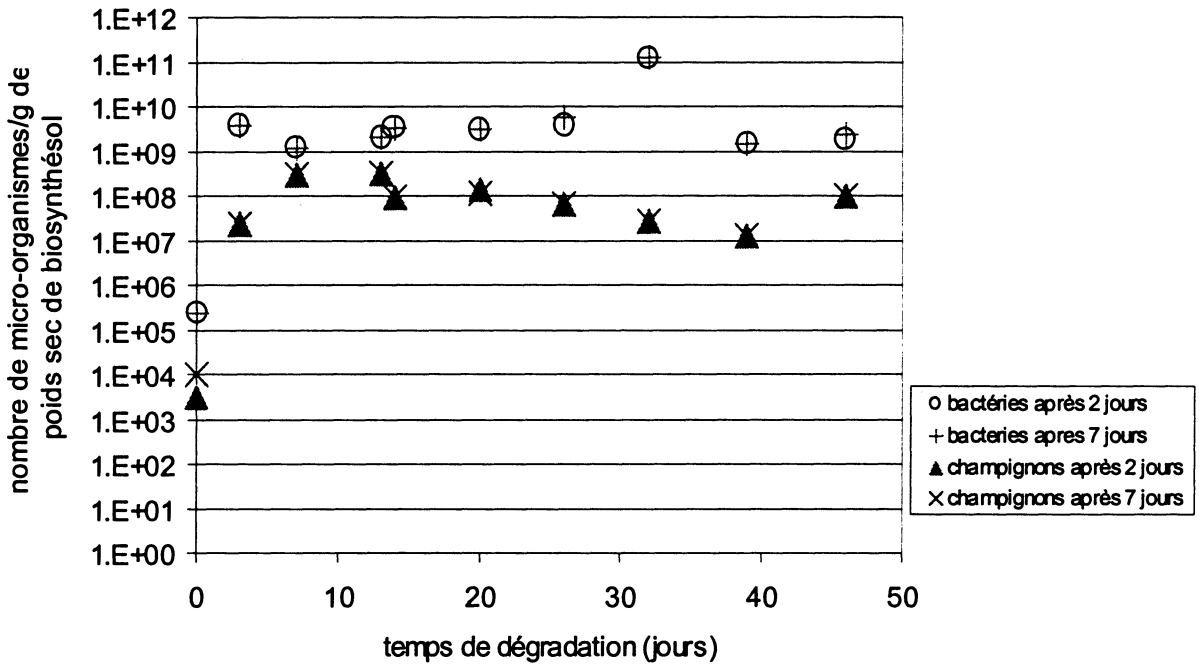
2- Patate Dextrose Agar (PDA) avec du Rose de Bengal à 0,025g/500 ml et du chloramphénicol à 0,05 g/500 ml, pour les dilutions 10^{-3} à 10^{-5} pour dénombrer les champignons.

Chaque essai est fait en double, les boîtes sont alors fermées avec du Parafilm et incubées à 25°C. Les comptages de la microflore sont effectués après 2 et 7 jours pour les boîtes de Pétri contenant entre 15 et 50 colonies. Les résultats sont donnés en nombre de micro-organismes par gramme de poids frais de fèces, ou en nombre de micro-organismes par gramme de poids sec de biosynthésol.

VI-2-3 Résultats des dénombrements de la microflore totale en biosynthésol sans lombricien et dans les fèces des lombriciens

Les dénombrements de bactéries et champignons directement dans le biosynthésol ou dans les fèces des lombriciens sont montrés figure VI-1. On peut apprécier la diversité bactérienne sur les photos de la figure VI-2. On peut déjà remarquer que le nombre de micro-organismes est à peu près le même, que le comptage soit effectué après 2 jours ou après 7 jours d'incubation à 25°C, on a donc affaire à des micro-organismes à croissance rapide. La phase de croissance est très courte pour les bactéries (inférieure à 3 jours), puis leur nombre atteint une phase plateau. Pour les champignons, la phase de croissance est un peu plus longue, jusqu'à 7 jours, puis leur nombre semble diminuer assez régulièrement.

A)



B)

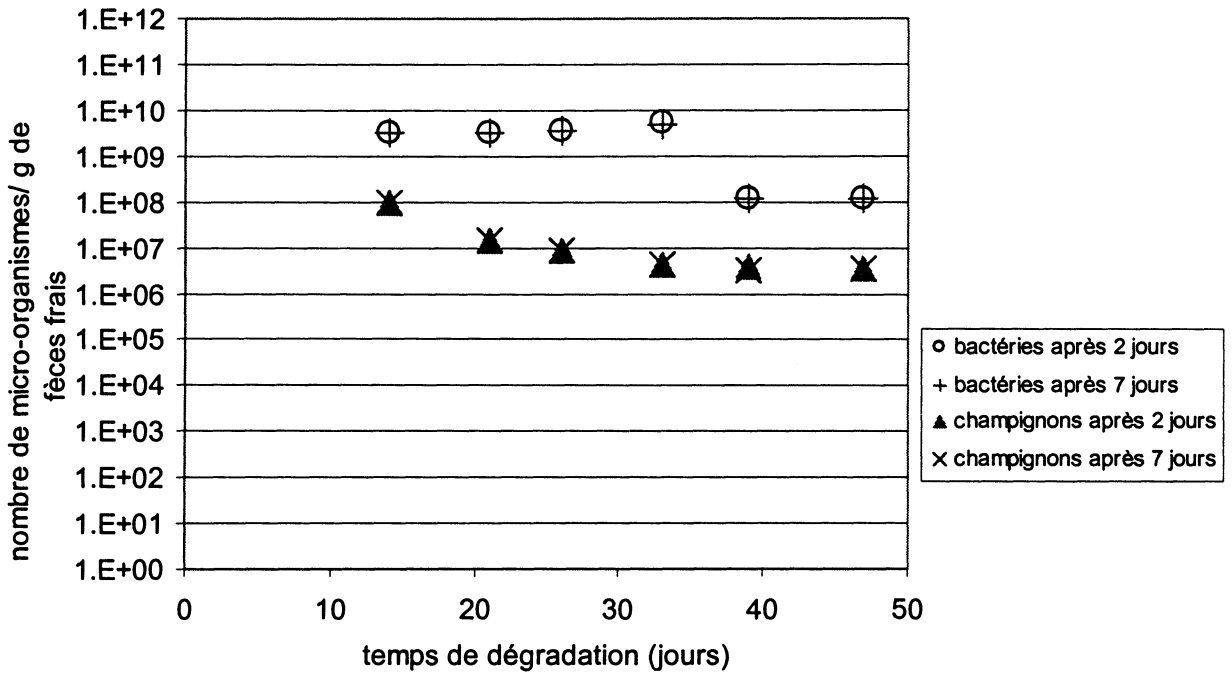
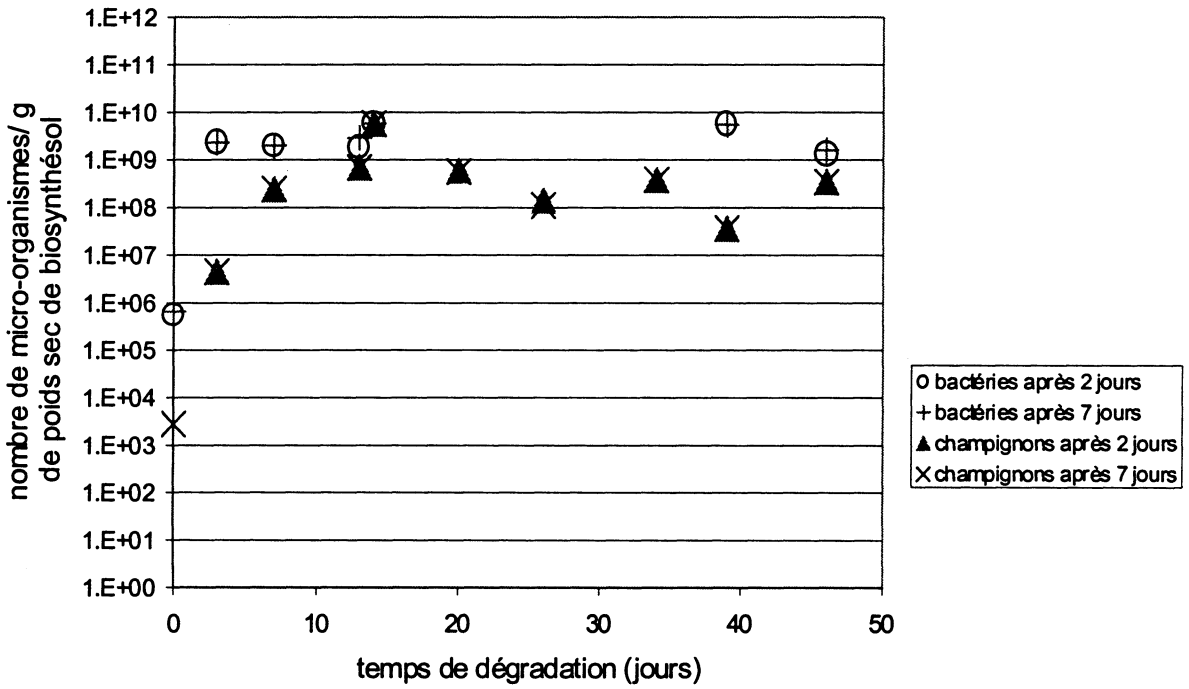


Figure VI-1: Dénombrement de micro-organismes en fonction du temps

A) dans du biosynthésol sans ver de terre, contenant du OLA 50

B) dans les feces d'*E. andrei*, avec OLA 50 comme source de carbone

C)



D)

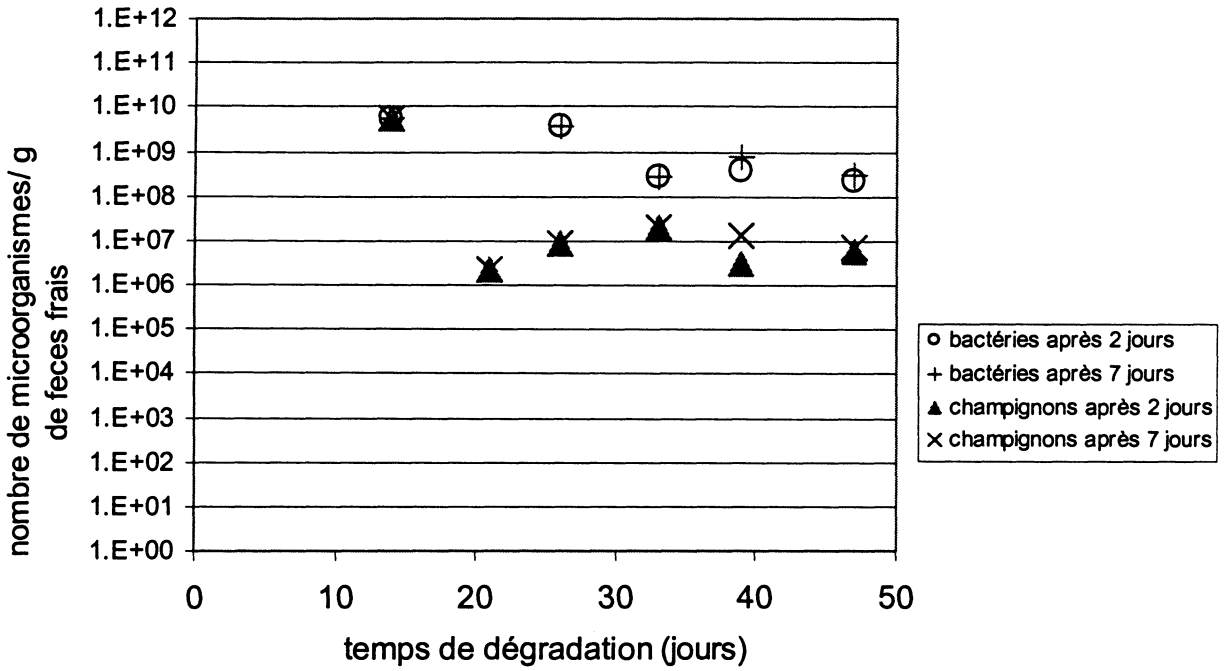


Figure VI-1 : Dénombrement de micro-organismes en fonction du temps

C) Dans du biosynthésol sans ver de terre, contenant du OLA 96

D) Dans les feces d'*E. andrei*, avec OLA 96 comme source de carbone

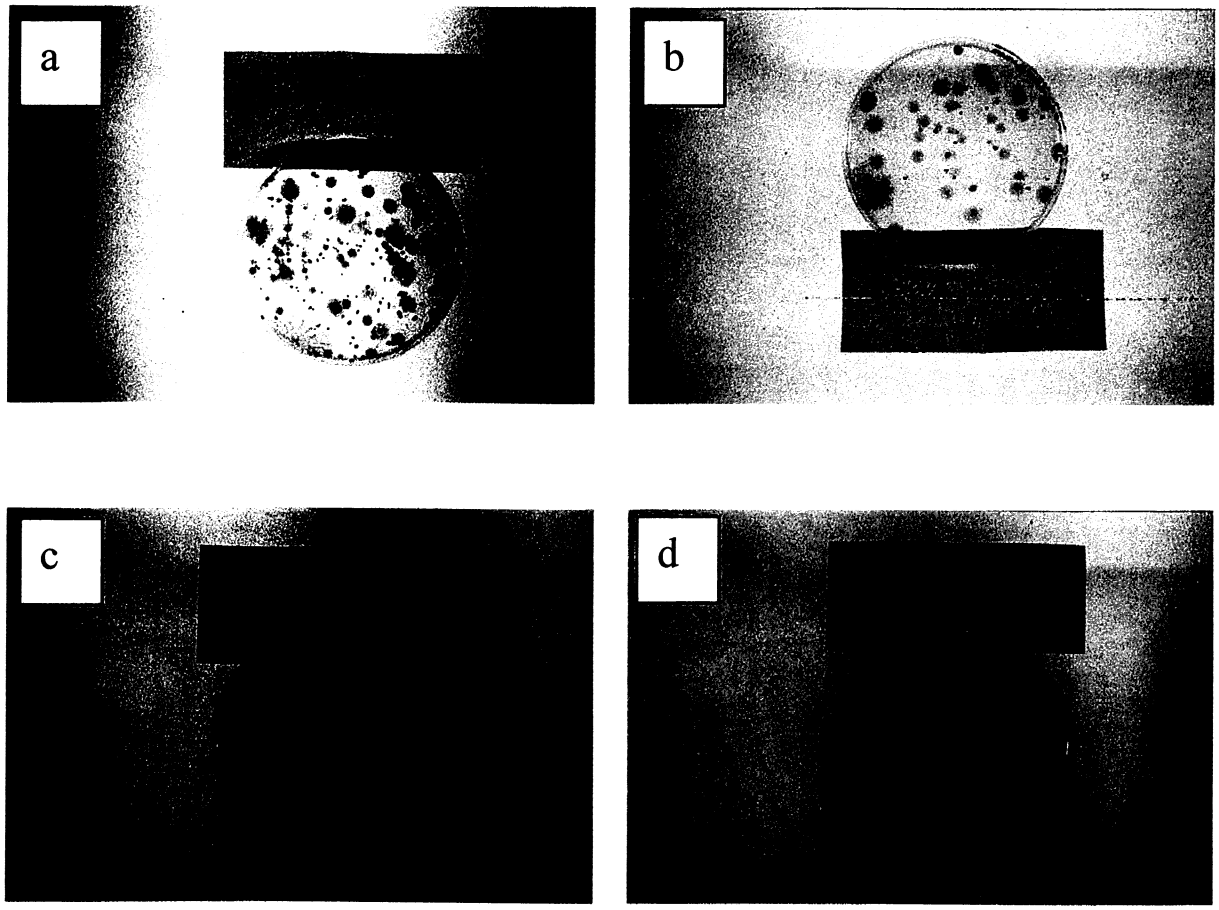


Figure VI-2 : Comptage de bactéries sur PCA.
a) dans les fèces d'*E.andrei*, dilution 10^{-4}, après 59 jours dans le biosynthésol + OLA 50 (7 jours d'ensemencement)
b) dilution 10^{-4}, après 59 jours dans le biosynthésol sans ver avec OLA 50 (7 jours d'ensemencement)
c) dans les fèces d'*E.andrei*, dilution 10^{-4}, après 59 jours dans le biosynthésol avec OLA 96 (7 jours d'ensemencement)
d) dilution 10^{-4}, après 59 jours dans le biosynthésol sans ver avec OLA 96 (7 jours d'ensemencement)

Nous avons pu également mettre en évidence la présence de micro-organismes anaérobies, autant dans le biosynthésol sans ver de terre que dans les fèces (figure VI-3).

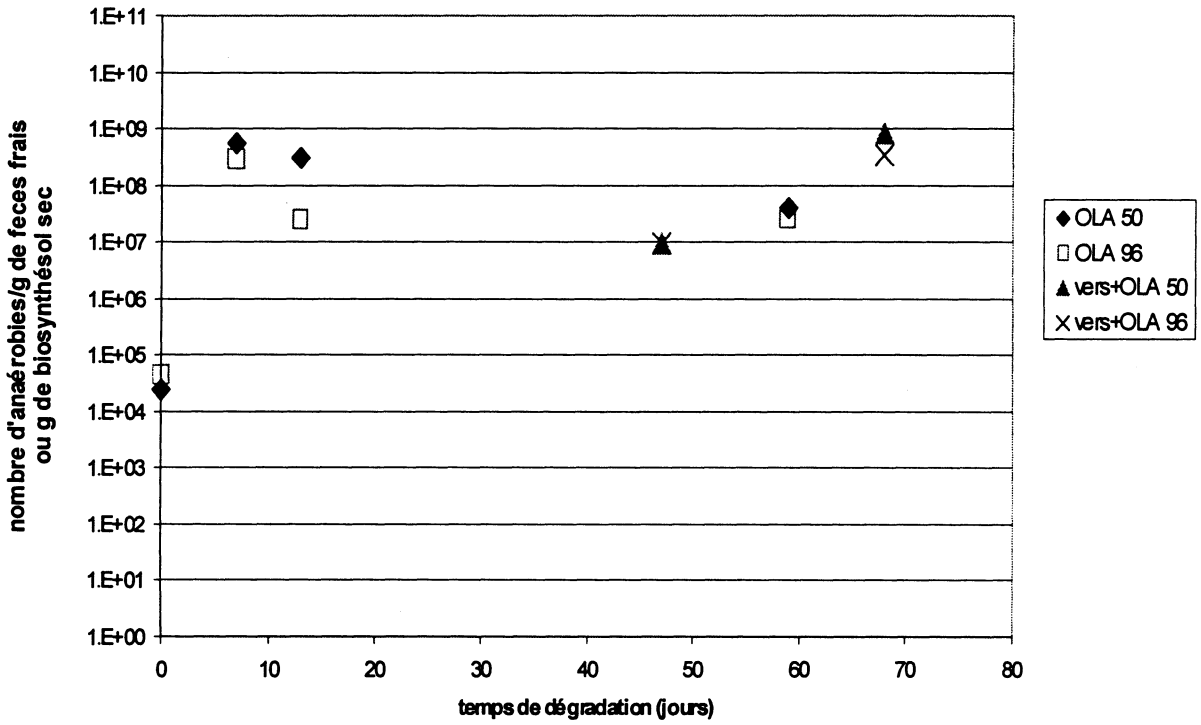


Figure VI-3 : Dénombrement de la microflore anaérobie dans le biosynthésol sans ver de terre et dans les feces d'*E.andrei*.

Dans le biosynthésol sans ver de terre, le nombre de bactéries et de champignons est plus elevé que dans un vrai sol :

-on trouve entre 10^9 et 10^{10} bactéries par gramme de biosynthésol, alors qu'on s'attendrait à 10^8-10^9 pour un vrai sol,

-pour les champignons, on en a 10^8 alors qu'on s'attendrait à 10^6.

Par contre, lorsqu'on regarde le nombre de bactéries et champignons après passage dans l'intestin des lombriciens, on constate que leur nombre est régulé grâce à ce passage, et se rapproche de leur nombre normal dans le sol : le nombre de champignons diminue jusqu'à 10^6 assez rapidement, et celui des bactéries diminue aussi, après un certain temps jusqu'à 10^8. Les vers de terre semblent réguler le nombre de micro-organismes en s'en nourrissant. Les résultats sont à peu près comparables, que la source de carbone soit OLA 50 ou OLA 96.

VI-3 Identification des champignons isolés du biosynthésol et des fèces de vers de terre

L'identification des champignons se base sur les caractéristiques morphologiques, alors que celle des bactéries se fait sur la base de leurs caractéristiques biochimiques.

Pour chaque boîte, on détermine le nombre de genres différents à vue d'oeil. Puis les genres majoritaires sont isolés sur PDA sans Rose de Bengal pour déterminer la vitesse de croissance apicale en mesurant régulièrement le diamètre de la colonie. A partir de cette boîte, un prélèvement est effectué sur la périphérie de la colonie pour avoir un mycélium jeune, déposé entre lame et lamelle avec une goutte de Bleu Cotton et observé au microscope x100 et x40. Le genre des champignons est alors déterminé sur des critères morphologiques à partir de la description du mycélium et des formes de reproduction asexuées.

Résultats

On retrouve différentes espèces de champignons dans le biosynthésol avec et sans lombriciens. Les espèces majoritaires sont alors isolées, et leur genre est déterminé par observation visuelle au microscope du mycélium et des conidies (voir annexe 3).

Il y a principalement 4 genres de champignons présents dans le biosynthésol (tableau VI-1) : *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* et *Fusarium*, qui se retrouvent aussi dans les fèces des vers. Ceci est tout à fait normal car les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma* se retrouvent fréquemment dans les sols. De plus, des champignons filamenteux tels *Fusarium* et *Penicillium* présentent une tolérance vis-à-vis de l'acide lactique (Torres, 1995), c'est peut-être une des raisons pour laquelle on retrouve ces genres dans le biosynthésol et dans les fèces des vers de terre. Au départ, il n'y a que des *Aspergillus*, ce qui peut faire penser à une contamination des milieux, puis petit à petit, d'autres espèces commencent à apparaître : les *Trichoderma* au 20e jour, les *Penicillium* au 26e jour, puis les *Fusarium* au 34e jour dans le biosynthésol sans ver de terre. L'apparition de ces genres est légèrement décalée lorsque les vers de terre sont rajoutés au milieu.

Les résultats assez irréguliers en ce qui concerne la répartition des différents genres sont dus à l'hétérogénéité du milieu. Il est d'ailleurs clair que dans le biosynthésol, on voit des zones de différentes couleurs bien différenciées, ce qui prouve qu'il y a des microhabitats.

L'échantillonnage en est rendu difficile, et est donc assez aléatoire. Ainsi parfois certaines espèces ne sont plus présentes, puis réapparaissent, d'autres semblent connaître des fluctuations.

Tableau VI-2 : Pourcentage des principaux genres de champignons trouvés dans le biosynthésol ou dans les fèces des lombriciens.
(a) dans le biosynthésol avec OLA 50 comme source de carbone
(b) dans le biosynthésol avec OLA 96 comme source de carbone
(c) dans les fèces d'*E.andrei* avec OLA 50 comme source de carbone
(d) dans les fèces d'*E.andrei* avec OLA 96 comme source de carbone

(a)

Temps de dégradation (en jours)	3	7	10	14	20	26	32	39	46	59
Aspergillus	100	100	100	87	57			7	31	13
Trichoderma				13			12			
Penicillium					43	62	52		22	50
Fusarium						38	36	93	29	37
autres									18	

(b)

Temps de dégradation (en jours)	3	7	10	14	20	26	32	39	46	59
Aspergillus	100	100	100	66	50			16	14	5
Trichoderma				34		28	16	26	9	10
Penicillium					50	39	28	10	41	48
Fusarium						33	56	48	8	12
autres									28	25

(c)

Temps de dégradation (en jours)	7	10	14	21	26	33	39	46	59	68
Aspergillus				100			65			5
Trichoderma					70	21	18	55	38.5	16
Penicillium					30		4	6.5	15	21
Fusarium						70	13	33	46.5	58
autres						9		5.5		

(d)

Temps de dégradation (en jours)	7	10	14	21	26	33	39	46	59	68
Aspergillus				33.3			21	3		
Trichoderma				33.3	70	75	40	78	74	55
Penicillium				33.3	30		21	3		24
Fusarium						20		10	17	21
autres						5	18	6	9	

La présence de *Fusarium* est particulièrement intéressante, puisque d'après Torres (1995), au moins un champignon de ce genre, *F. monoliforme*, est capable de bioassimiler les OLA 50 et 100. Le nombre des *Fusarium* reste stable avec ou sans vers, leur nombre semble même plus important lorsque l'OLA 50 est la seule source de carbone. Ils pourraient donc être parmi les principaux responsables de la dégradation de l'OLA. Mais d'après les résultats de la cinétique de dégradation (chapitres III et V), l'OLA 50 se dégrade dès les premiers jours avec les micro-organismes, et les *Fusarium* n'apparaissent que très tard. On peut supposer que les *Aspergillus* en sont responsables, et que les bactéries jouent aussi un rôle dans cette dégradation.

On peut constater que les micro-organismes, que ce soit dans le biosynthésol ou dans l'intestin des vers de terre, restent plus ou moins les mêmes au niveau taxonomique, ce qui est en accord avec Morgan (1988) qui pense que les micro-organismes de l'intestin des vers de terre sont en fait les mêmes que ceux du milieu environnant, et que les lombriciens n'ont pas de microflore intestinale propre. A ce stade de l'étude, il n'est pas possible d'affirmer que les proportions relatives de chaque groupe taxonomique soient les mêmes avec et sans lombriciens, car nos résultats sont préliminaires et n'ont pas été statistiquement vérifiés. Cependant, il est très probable qu'elles changent étant donné que les vers de terre se nourrissent de ces micro-organismes, et ils s'en nourrissent sélectivement (voir chapitre I). Cependant cette sélection ne semble pas perturber la dégradation de l'OLA (voir chapitre IV), ce qui peut signifier que les vers se nourrissent préférentiellement de micro-organismes capables de dégrader l'OLA. Sinon, l'avantage sélectif étant aux micro-organismes capables d'assimiler les OLA, ceux-ci seraient avantagés, se multiplieraient et l'OLA serait plus rapidement dégradé, ce qui n'est pas le cas. Ainsi les vers de terre se nourriraient de micro-organismes capables de dégrader le OLA, ce qui expliquerait qu'ils prennent du poids puisque ces micro-organismes se multiplient rapidement et de fait les vers ont toujours de la nourriture disponible.

VI-3 Conclusion

Le milieu biosynthésol que nous avons mis au point au chapitre III est ici utilisé avec du OLA 50 ou 96 comme seule source de carbone. Les champignons et bactéries ont été dénombrés régulièrement au cours du temps dans le biosynthésol seul et dans les fèces de vers de terre.

Le nombre de champignons et bactéries est moins important à la sortie de l'intestin des vers de terre que dans le biosynthésol sans vers de terre, indiquant que les vers de terre régulent le nombre de micro-organismes. Parmi les champignons, on retrouve des *Fusarium* et des *Aspergillus*, genres capables de bioassimiler le PLA (*Fusarium*) ou d'autres esters aliphatiques (*Aspergillus*). Il est donc tout à fait probable que l'OLA soit dégradé par ces champignons et par des bactéries, puis que les vers de terre s'en nourrissent, ce qui leur permet de gagner du poids.

Conclusion générale

Conclusion générale

La préoccupation grandissante du public et des médias à propos du traitement des déchets, en particulier des déchets plastiques, a entraîné un intérêt croissant pour les polymères biodégradables. Les PLA sont parmi les produits actuellement développés par l'industrie (EcoPLA par exemple).

Notre objectif était d'apprécier l'éventualité d'une biodégradation des PLA par les vers de terre, et d'employer ces lombriciens comme "témoins" de la biodégradation ou de la bioassimilation des PLA - c'est-à-dire pour vérifier si ces animaux interviennent aux premiers stades de la dégradation ou plus tard. En même temps, cela nous a conduit à un deuxième objectif : trouver une méthodologie pour évaluer l'assimilation des PLA, voire d'autres polymères par les vers de terre.

Nous avons dans un premier temps procédé à une étude préliminaire pour vérifier que ni les PLA ni leurs produits de dégradation n'étaient toxiques vis-à-vis des vers de terre, ainsi que pour apprécier leurs capacités à avaler des morceaux de PLA ou d'OLA. Il s'est avéré que le PLA et leurs produits de dégradation ne sont pas toxiques à des concentrations susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement (jusqu'à 28% en poids sec total). Des fèces contenant des morceaux de PLA ou d'OLA ont été trouvés, indiquant la possibilité pour des vers de terre d'ingérer du PLA, cette possibilité restant exceptionnelle.

Les vérifications de biocompatibilité effectuées, nous avons mis au point un compostage modèle à base d'ordures ménagères modèles pour la mise en évidence d'une dégradation des PLA. Notre démarche a été fondée sur une simulation de la composition des ordures ménagères françaises subissant un compostage et un lombricompostage semblables à ceux que l'on peut trouver dans l'industrie.

Dans des conditions de vieillissement avec une phase thermophile atteignant 70°C, que ce soit dans du tampon phosphate ou dans un compost modèle, les PLA 50 et 96 de hautes masses molaires perdent du poids et la masse molaire décroît très rapidement. Le PLA 50 est

modèle), ce qui indique que l'hydrolyse accélérée par la température élevée suffit à provoquer sa dégradation. Pour le PLA 96 la dégradation atteint le stade OLA à la fin de la phase thermophile. Pendant la phase de maturation du lombricompostage à 20°C, les vers de terre assurent un brassage qui provoque une fragmentation mécanique des PLA. Les morceaux résultants peuvent être ingérés car nous avons retrouvé des fèces contenant du PLA 96.

Nous avons montré que les PLA de hautes masses peuvent voir leur masse molaire diminuer fortement pendant la phase thermophile du compost. Pour permettre l'étude détaillée du devenir des résidus de dégradation du PLA, nous avons modifié un milieu, le biosynthésol, à base de Lévilite -une poudre de silice fine- et de milieu de Winogradsky, dans lequel le PLA ou l'OLA a été utilisé comme seule source de carbone. Dans ce milieu, les PLA de hautes masses molaires ne peuvent pas supporter la croissance des vers de terre. Par contre, les PLA hydrolysés jusqu'au stade "oligomères" permettent la croissance des lombriciens. Le poids des vers de terre peut ainsi remonter jusqu'à 100% du poids initial si des OLA 50 ou 96 sont utilisés comme seule source de carbone.

Les résultats obtenus par Torres (1996) indiquaient que les PLA pouvaient être bioassimilables par les micro-organismes (par le champignon *Fusarium monoliforme* et la bactérie *Pseudomonas putida*). Notre travail montre que nous arrivons au même résultat en employant le ver de terre *Eisenia andrei*.

Après cette confirmation de la bioassimilation des PLA grâce aux vers de terre, nous avons cherché à préciser la localisation des résidus d'OLA après ingestion par les lombriciens. Grâce à l'utilisation d'oligomères marqués au ^{14}C, synthétisés au laboratoire, l'autoradiographie des tissus a montré que les résidus d'OLA se répartissent de façon uniforme dans le corps des lombriciens.

Nous avons pu constater que la dégradation d'OLA 50 ou 96, qu'elle soit suivie par diminution de la quantité d'OLA dans le milieu ou par mesure du $^{14}CO_2$ provenant de la décomposition de ces mêmes OLA, ne présente pas de différence réellement significative lorsqu'elle se produit en présence de micro-organismes ou en présence de vers de terre. Ces résultats tendraient à montrer que la présence des vers de terre n'accélère pas la dégradation des OLA, mais les lombriciens se nourrissent de micro-organismes capables de dégrader et assimiler les OLA.

Pour apprécier la présence de micro-organismes qui seraient susceptibles de dégrader les OLA dans l'intestin des vers de terre, nous avons comparé du point de vue qualitatif et quantitatif les bactéries et champignons dans du biosynthésol sans ver de terre et dans l'intestin des lombriciens. La quantité de micro-organismes est moins importante dans l'intestin des vers de terre que dans le biosynthésol sans ver puisque ces derniers s'en nourrissent. Nous avons pu établir la taxonomie des différents genres de champignons présents. Par contre la proportion des différents genres a été particulièrement difficile à évaluer à cause de l'hétérogénéité des milieux. Nous avons vu que les genres principaux présents comprennent des espèces susceptibles de pouvoir bioassimiler des OLA, sans pouvoir identifier la présence de ces dernières. Il apparaît donc que les micro-organismes dégradent le OLA, et qu'ensuite les vers de terre s'en nourrissent.

Les résultats obtenus permettent de conclure que le PLA peut être traité par lombricompostage, et que des résidus de polymères se retrouvent assimilés par les vers de terre. Ces polymères peuvent être dégradés en présence de vers de terre seulement à partir d'un degré avancé de dégradation chimique. Cette dégradation est obtenue pendant la phase thermophile du lombricompostage. En effet, la chaleur provenant de l'activité microbienne et l'humidité du milieu provoquent une diminution drastique de la masse molaire des PLA. Nous pouvons aussi affirmer que les vers de terre sont un bon moyen pour évaluer la bioassimilation des PLA, et par extension d'autres polymères. Le paramètre le plus simple à suivre et le plus informatif est le poids. Il nous a permis de comparer facilement la dégradation de différents polymères (cellulose, PLA, OLA). Les essais que nous avons entrepris peuvent servir de base pour l'élaboration d'une norme environnementale de biodégradabilité. Les comparaisons des dégradations par les micro-organismes et par les vers de terre montrent que la dégradation des OLA se fait d'abord par les micro-organismes, puis ceux-ci sont ingérés et assimilés par les vers de terre.

Il serait intéressant, pour proposer un mécanisme détaillé de dégradation des OLA en présence de vers de terre, de disposer de lombriciens axéniques, afin de savoir si ces derniers sont capables assimiler directement les OLA et, le cas échéant, d'étudier la synergie lombrico-microbienne.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

PE-I Matériel biologique

*PE-I-1- Description d'*E.andrei

Lors de ce travail, le matériel biologique utilisé a été le ver de terre *Eisenia andrei* Bouché 1972, de la famille Lumbricidae (distribuée largement en Europe), sous-famille des Lumbricinae, tribu Eisenini (Qiu, 1998). C'est un épigé selon la classification de Bouché (1972). Il possède moins de 200 segments, il est de section subtrapézoïdale et de pigmentation rouge vineux.

Il est à noter que l'espèce *E.andrei* est souvent confondue avec l'espèce *E.fetida* Savigny. La différence entre les deux espèces est en effet ténue, sur le plan morphologique seule la couleur les distingue (*E.andrei* est légèrement rayée rouge et violet, alors que *E.fetida* est rouge), par contre sur le plan génétique, elles présentent de nombreuses différences (Qiu, 1998).

Les souches sont élevées au laboratoire de Zooécologie du Sol de l'INRA de Montpellier. L'élevage n'étant pas entièrement normalisé, il n'est pas facile d'obtenir des clones.

PE-I-2- Milieu d'élevage des vers

Les vers sont élevés sur un milieu de composition suivante :

- de la tourbe de différentes provenances, qui permet de maintenir l'humidité.
- des morceaux d'écorce pour aérer le milieu et créer une structure proche de celle du sol
- de la chaux pour que le pH soit neutre, la quantité ajoutée est empirique car *E.andrei* n'est pas très sensible aux variations de pH
- de l'eau. Cette dernière est rajoutée petit à petit dans le milieu, tout en malaxant à la main. Une humidité suffisante est obtenue lorsque le milieu tenu serré dans la main laisse tout juste échapper quelques gouttes d'eau. Cet élevage n'est pas normalisé.

La nourriture des vers se compose de :

- 1/3 de luzerne, riche en azote

- 1/3 de farine de son
- de l'eau

Cette nourriture non plus n'est pas normalisée, ce sont les produits qu'on trouve le plus facilement sur le marché. Il est surtout nécessaire d'avoir au moins une source de carbone et une source d'azote.

PE-II Matériel chimique

PE-II-1 Synthèse du PLA 50 et 96

Tous les PLA que nous avons utilisés dans ce travail ont été synthétisés au laboratoire. Les PLA de BMM (OLA) ont été synthétisés par polycondensation directe d'acide lactique, les PLA de HMM ont été synthétisés par polymérisation par ouverture de cycle du lactide.

PE-II-1-1- Polycondensation directe d'acide lactique

De l'acide D,L-lactique (Janssen Chimica) pour fabriquer de l'OLA 50, ou un mélange molaire de 92% d'acide L-lactique et 8% d'acide D,L-lactique pour du OLA 96, est mis à chauffer dans un ballon (figure 1) pour évaporer l'eau du sirop, pendant 4 heures à 80°C, en faisant buller de l'argon sous vide léger (trompe à eau). Ensuite la solution est laissée à polymériser sous vide à 120°C pendant 27 heures au total. L'OLA récupéré est gardé sous vide jusqu'à utilisation.

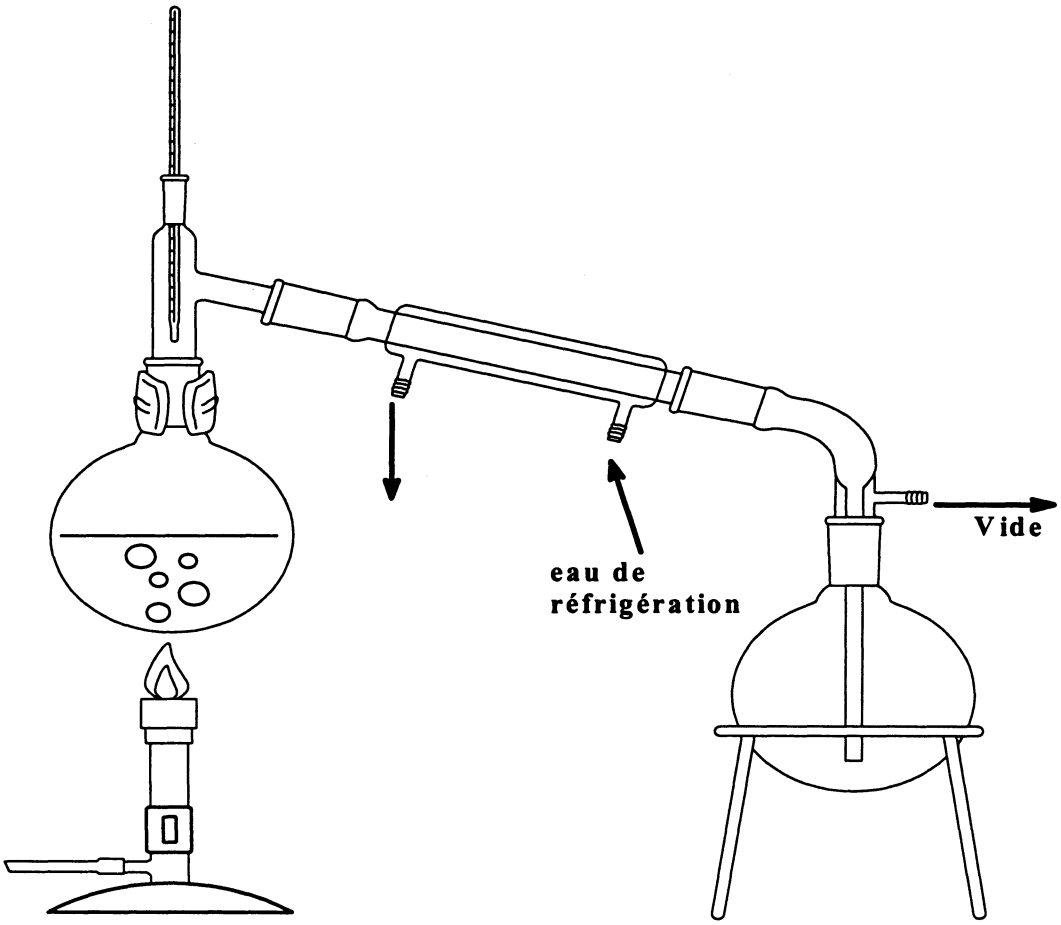


Figure PE-1 : Polycondensation de l'acide lactique.

PE-II-1-2- Polymérisation par ouverture de cycle

300 g de D,L-lactide (Purac) est mélangé à 253 mg d'amorceur, le lactate de zinc (Sigma). Le rapport monomère/amorceur est de 1/1000 en mole. Le D,L-lactide est fondu à 140°C sous vide pour dégazer (figure PE-2), puis le vide est cassé par de l'argon. Ce cycle fusion/dégazage, qui dure environ 30 mn, est recommencé 2 fois. Après ces opérations, le col du ballon est scellé sous vide.

Le lactide est alors polymérisé sous vide dans une étuve à 140°C pendant 21 jours sous lente agitation. Le polymère est récupéré par dissolution dans l'acétone puis précipitation dans du méthanol et filtration, et il est laissé sécher sous vide à froid.

Solvant : THF

Débit : 1 ml/mn

Etalonnage avec des standards polystyrène

Appareil de détection : réfractomètre différentiel Waters 410

PE-II-4- Analyse des produits de dégradation du PLA en électrophorèse capillaire de zone

L'électrophorèse capillaire de zone est la méthode choisie pour détecter les produits de dégradation hydrosolubles des PLA. C'est un appareil très sensible, qui permet de détecter les oligomères de PLA jusqu'au nonamère, avec une très bonne résolution (Braud *et al.*, 1996).

Les conditions d'utilisation sont les suivantes :

Appareil : P/ACE 5000, Beckman instruments Inc.

Détecteur UV : 214 nm

Injection cathode

Voltage constant : 30 kV

Capillaire : DI=50 µm, LT=56.9 cm

Solution tampon : phosphate 0.05 M pH 6.8

Température : 25°C

Injection : 20 µl

PE-II-5- Analyse de la perte de poids et de l'absorption d'eau

L'échantillon est récupéré, séché légèrement sur du papier buvard, puis pesé (P1). Il est ensuite séché totalement sous vide, et repesé (P2). L'absorption d'eau est déterminée par P2-P1, et la perte de poids par Pinitial-P2.

PE-II-6- Examen visuel de la dégradation des fils de PLA

Cet examen est pratiqué à l'aide d'une loupe binoculaire (Wild M7), elle-même équipée d'un appareil photo.

PE-II-7- Analyse du PLA par analyse thermique différentielle

Les températures Tf, Tv et Tc sont déterminées par calorimétrie différentielle. Les caractéristiques sont:

Appareil : Dupont Serie 99

Vitesse de chauffe : 10°C/mn

PE-III- Ajustement du pF pour détermination de la toxicité des substances vis-à-vis des vers de terre (d'après Bouché et Aliaga, 1986)

Chacun des PLA ou résidus est mélangé à de la Lévilite (silice en poudre), et différentes concentrations de la substance à étudier sont testées. Les mélanges sont alors humidifiés, placés dans un tube de dialyse (SPECTRAPOR, 3, n° 132725, MWCO 3500) de 20 cm de longueur environ, mis à tremper au préalable pendant une demi-heure dans de l'eau distillée. Chaque extrémité de membrane est ensuite fixée dans le trou d'un couvercle (voir figure PE-4). Les membranes sont alors plongées dans une solution de PEG préparée en tenant compte du pF voulu (tableau PE-1), et on laisse l'équilibre s'établir pendant 48 h en agitant légèrement. Une fois l'équilibre établi, les mottes du mélange sont retirées de la membrane et pesées. Puis ces mottes sont placées à l'étuve à 105°C pendant 24 heures, et sont de nouveau pesées pour déterminer leur poids sec. Ainsi on détermine le pourcentage précis d'eau à rajouter pour obtenir un pF de 2,7.

Tableau PE-1 : Caractéristiques des solutions de polyéthylène glycol 6000 utilisées (d'après de Crécy, 1975).

pF	Concentration en g/l de PEG 6000	Indice de réfraction (30°C)
2,7	64	1,3404
3,0	92	1,3440
3,3	133	1,3496

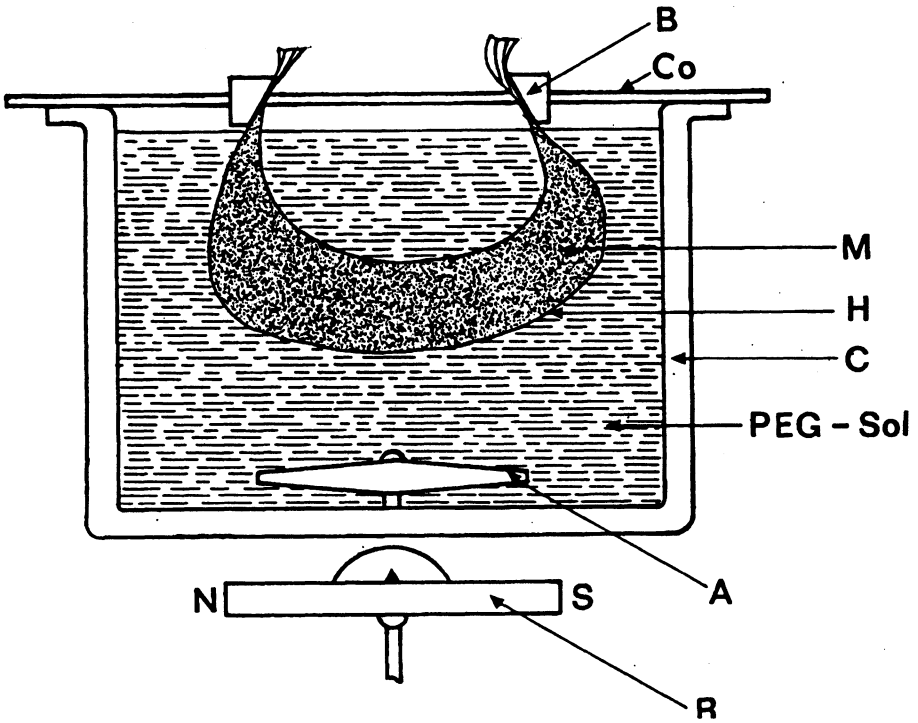


Figure PE-4 : Schéma du montage pour la détermination de la quantité d'eau à rajouter pour obtenir le pF désiré.

B : bouchon Co : couvercle M : milieu

H : membrane hémiperméable R : agitateur rotatif C : contenant

PEG-sol : solution de PEG 6000 à la concentration voulue A : agitateur

PE-IV Utilisation du biosynthésol

PE-IV-1- Suivi du pH des différents biosynthésols

Les essais sont faits en double. A intervalles réguliers, 2,05 g de chacun des milieux sont extraits et additionnés de 10 ml d'eau distillée, puis mis à agiter sur une table agitante. Le pH est alors mesuré à l'aide d'un pHmètre.

PE-IV-2- Inoculation du biosynthésol

Le biosynthésol est préparé de façon non stérile, et est inoculé de la façon suivante : 1 g de fèces de vers de terre est prélevé dans les boîtes d'élevages et additionné de 10 ml d'eau distillée. Le tout est agité à la main et laissé décanter 5 mn. 1 ml de surnageant est alors ajouté au biosynthésol avant de passer ce dernier au mélangeur automatique.

PE-IV-3- Méthode de séparation-extraction des oligomères insolubles et solubles, purification des oligomères

On utilise un solvant de PLA pour les insolubles : le chlorure de méthylène. Les oligomères sont dissous dans 30 ml de chlorure de méthylène, la solution est ensuite placée dans une ampoule à décanter dans laquelle on rajoute environ 3 fois plus d'eau, ici 100 ml. L'ampoule est secouée et laissée décanter, puis la partie chlorure de méthylène est recueillie et évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les oligomères sont récupérés avant d'être complètement secs, puis étalés sur des boîtes de Pétri, ceci pour qu'ils soient plus faciles à récupérer. Ils sont laissés 1 nuit à sécher. Le rendement est d'environ 70% pour chacun des oligomères.

PE-IV-4- Méthode de mélange des oligomères avec la lévilite

Les oligomères doivent être dissous dans l'acétone avant d'y rajouter la lévilite. La quantité d'oligomères à mélanger est 2 g pour 45 g de lévilite.

Afin de bien mélanger de façon homogène l'oligomère OLA50 avec la lévilite, on dissout une certaine quantité d'OLA 50 dans l'acétone. Quand tout est bien dissous, on rajoute la quantité de lévilite correspondante, c'est-à-dire un rapport OLA/lévilite de 2 g pour 6 g, et on laisse agiter 20 mn. Puis l'acétone est évaporée, et le mélange lévilite/OLA réparti dans des bocaux à raison de 8 (6+2) g par bocal. Puis de la lévilite est rajoutée dans chaque bocal, pour avoir 47 g au total de lévilite avec OLA (la quantité d'OLA 50 a été vérifiée à T_0). Nous avons donc au total 2 g d'OLA 50 dans 45 g de Lévilite.

PE-IV-5- Détermination du poids des vers de terre dans du biosynthésol

A chaque prélèvement, les billes de verre sont sorties du bocal de façon non stérile, et les vers de terre récupérés avec une pince. Ils sont ensuite lavés plusieurs fois à l'eau du robinet, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus trace de biosynthésol ou de liquide muqueux sur eux. Ils sont ensuite posés 30 secondes sur du papier filtre pour absorber l'eau en trop, et pesés tous les 10 ensemble sur une balance pesant jusqu'au mg, avec +/-0.5 mg d'incertitude.

PE-IV-6- Dosage du OLA et de l'acide lactique restant (voir figure V-2)

Pour chaque point des cinétiques, 3 paramètres sont évalués :

-la quantité d'acide lactique restant

-la quantité d'oligomères solubles dans l'eau (n<9)

-la quantité d'oligomères insolubles dans l'eau

Le but est d'hydrolyser chacune de ces catégories pour obtenir de l'acide lactique dosable enzymologiquement. La mesure de la dégradation des oligomères dans un milieu solide pose le problème de l'aliquotage : le milieu est très hétérogène. Il nous faut donc utiliser le contenu total d'un bocal pour chaque point de la cinétique (donc plusieurs bocaux sont préparés à l'avance). La procédure standard est la suivante :

Le jour Tj, le milieu entier est prélevé, étalé (avec les billes) sur un bac plat et laissé à sécher jusqu'au lendemain pour faciliter le décollement de ce milieu des billes de verre. Le lendemain, le traitement est divisé en 3 parties sur lesquelles on réalise respctivement :

1-analyse de l'acide lactique

La récupération de l'acide lactique restant dans le milieu de dégradation se fait assez facilement puisque celui-ci est soluble dans l'eau. Le milieu séché est décollé des billes et récupéré pour être filtré avec de l'eau distillée. Le filtrat est ajusté à 200 ou 250 ml puis 10 ml sont prélevés et congelés pour analyse enzymatique ultérieure.

2- analyse des oligomères solubles dans l'eau

Les 190 ou 240 ml de filtrat restant sont hydrolysés par addition de 4,8 g de NaOH (concentration finale 2N) puis chauffés à ébullition pendant 2 mn selon le protocole suivi par Torres. 1,3 ml d'H_2SO_4 pur sont rajoutés afin de neutraliser le milieu basique avant son analyse enzymatique. 10

ml sont alors prélevés pour analyse: ils contiennent l'acide lactique résiduel + l'acide lactique provenant des oligomères solubles (dimères, trimères...)

3- analyse des oligomères insolubles dans l'eau

Le milieu solide filtré, qui contient les oligomères insolubles, est récupéré et additionné d'environ 100 ml d'eau distillée. Les oligomères insolubles sont alors hydrolysés de la même manière que les oligomères solubles. 10 ml sont alors prélevés pour analyse enzymatique.

La quantité d'acide lactique est ensuite mesurée à l'aide d'un kit enzymatique à base de L-lactate oxydase (SIGMA). L'intensité de couleur du chromogène, proportionnelle à la concentration en acide lactique, est mesurée par absorbance à 540 nm. La concentration en acide lactique total (D et L) est alors calculée en tenant compte de la stéréospécificité de l'enzyme, qui ne détecte que le L-lactique.

PE-V- Etude de la bioassimilation des OLA à l'aide d'OLA radioactif

PE-V-1- Synthèse d'OLA 50 radioactif

Avant la synthèse, de l'acide D,L-lactique (SIGMA, 98%, 85% w/v) est distillé sous un faible vide (pompe à membrane) 1 heure à 80°C, puis 3 heures à 100°C, afin d'éliminer l'eau du sirop et éviter l'entraînement de l'acide radiomarqué par de l'eau pendant la réaction de synthèse. 3 ml de cet acide D,L-lactique distillé est mélangé à 100µl (10 mCi) de ^{14}C-D,L-lactate de Na (éthanol:eau, 7:3 ; 50 mCi/0,5 ml). La synthèse est réalisée en laissant d'abord 1 heure à 80°C sous argon avec un faible vide, puis 1 heure à 100°C dans les mêmes conditions. Ensuite, l'argon est retiré et le ballon est mis sous vide pendant 12 heures, en laissant la température à 100°C. L'OLA radioactif est récupéré et conservé sous vide jusqu'à utilisation.

PE-V-2- Détermination de la masse molaire d'OLA 50 radioactif par titration acide-base

Une quantité connue d'OLA 50 radioactif est dissoute dans 20 ml de dichlorométhane et 10 ml d'éthanol. Quelques gouttes de phénolphtaléine sont rajoutées, et la solution est alors dosée

par NaOH 5.10^{-3} M dans l'éthanol, rapidement pour éviter que la soude ne casse les liaisons esters des chaînes oligomères et ne fausse la mesure en créant de nouvelles extrémités acide-base.

PE-V-3- Détermination de la radioactivité spécifique

Une quantité précise et connue d'OLA 50 (environ 6 mg) est dissoute dans 500 µl d'acétone. 150 µl et 75 µl sont prélevés (essais en double), et versés dans 10 ml de liquide scintillant Ultima Flo. Les résultats finaux sont donnés en nCi/mg.

PE-V-4- Comptage de la radioactivité en scintillation liquide

Le liquide scintillant utilisé est l'Ecolite (ICN Biomedicals Inc.) lorsque l'échantillon se trouve dans de la soude 0,1 M, et HIONIC Fluor (Packard) quand le solvant est du Soluène. 0,5 ml d'échantillon est mélangé à 6 ml de liquide scintillant, agité à la main et laissé reposer jusqu'à ce que le mélange n'ait plus aucun trouble apparent. Le compteur à scintillation liquide est un Packard Tri-Carb 2100 TR.

PE-V-5- Ouverture de la face ventrale des vers de terre

Le ver de terre est prélevé dans le pilulier à l'aide de pinces en plastique, rincé une fois à la pissette, et trempé 1 mn dans 4 pots d'eau distillée successifs pour enlever la radioactivité. Le lombricien est alors essuyé sur du papier filtre. Il est ensuite tué dans une solution d'éthanol pur, séché, puis pesé. Il est ensuite posé à plat-dos à l'aide d'épingles sur un bloc de paraffine, et disséqué sur la face ventrale avec des ciseaux à dissection, en commençant par l'anus. Au fur et à mesure de la dissection, les chairs de l'intestin sont maintenues à l'aide d'épingles. Le contenu de l'intestin est enlevé par lavage avec une pissette et en raclant avec un pinceau, le tout étant vérifié à la loupe binoculaire. Le cadavre est ensuite séché sur papier filtre, avant d'être soit dissous dans une solution de Soluène, soit conservé dans une solution FAA (composition en annexe 2).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A.M.M ABDUL RIDA, M.B. BOUCHE. 1997.
Earthworm toxicology : from acute to chronic tests.
Soil Biol. Biochem., **29**, 699-703.

AFNOR. 1984.
Détermination de la toxicité d'une substance vis-à-vis des lombriciens (espèce *Eisenia fetida*).
Norme expérimentale X 31-250.

M. AGARWAL, K.W. KOELLING, J.J. CHALMERS. 1998.
Characterization of the degradation of polylactic acid polymer in a solid substrate environment.
Biotechnology Progress, **14**, 517-526.

ANONYME. 1997.
Vermicomposting degradable bags.
Biocycle, Février.

O. ATLAVINYTE, C. POCIENE. 1973.
The effect of earthworms and their activity on the amount of algae in the soil.
Pedobiologia, **13**, 445-455.

I. BAROIS. 1992.
Mucus production and microbial activity in the gut of two species of Aminthas (Megascolecidae) from cold and warm tropical climates.
Soil Biol. biochem., **24**, 1507-1510.

M.B. BOUCHE. 1972.
Lombriciens de France, écologie et systématique.
INRA Publ.72-2.

M.B. BOUCHE. 1984.
Les vers de terre.
La Recherche, **15**, 796-804.

M.B. BOUCHE, R. ALIAGA. 1986.
Contre une dégradation physique et chimique des sols et pour leur optimisation économique, l'échantillonnage des lombriciens : une urgente nécessité.
La défense des végétaux, **242**, 30-36.

M.B. BOUCHE, M. NOUGARET. 1997.
The use of earthworms to reimport organic matter from towns to fields : a restoration of natural cycles by a new ecotechnology. Features and efficiency of the first factory.
in *Advances in solid state fermentation. S. Roussos, B.K. Lonsane, M. Raimbault, G. Viniegra-Gonzalez Eds. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, N.L.*, 541-555.

M.B. BOUCHE, J.P. QIU. 1996.
Significance of toxic tests on earthworms in environment assessments..
Proc. XII inter.coll. soil zool., Dublin, 50.

M.B. BOUCHE, J.P. QIU. 1998.
Contributions des lombriciens aux études environnementales concrètes.
Doc. Pédozool. Intégrol., **3**, 225-252.

H. BOUWMAN. 1998.
Evaluation of a technique to obtain development-stage-synchronised earthworms (*Eisenia fetida*).
Biol. Fert. Soil, **27**, 368-373.

C. BRAUD, R. DEVARIEUX, H. GARREAU, M. VERT. 1996.
Capillary electrophoresis to analyze water-soluble oligo(hydroxyacids) issued from degraded or biodegraded aliphatic polyesters.
J. Environ. Polym. Degrad., **4**, 135-148.

C.M. BUCHANAN, D.D DORSCHE, R.M. GARDNER, R.J. KOMAREK, A.W. WHITE. 1995.
Biodegradation of cellulose esters : composting of cellulose ester-diluent mixtures.
Journal of macromolecular Science-Pure Applied Chemistry, **A32**, 683-697.

A. COOKE. 1983.
The effects of fungi on food selection by *Lumbricus terrestris* (L.).
in *Earthworm ecology, from Darwin to vermiculture, J.E. Satchell ed., Chapman and Hall, London,* 365-373.

A. COOKE, M. LUXTON. 1980.
Effect of microbes on food selection by *Lumbricus terrestris.*
Rev. Ecol. Biol. Sol, **17**, 365-370.

J. CORTEZ, M.B. BOUCHE. 1998.
Field decomposition of leaf litters : earthworm-microorganism interactions. The plough-in effect..
Soil Biol. Biochem., **30**, 795-804.

J. CORTEZ, R. HAMEED. 1988.
Effets de la maturation des litières de ray-grass (*Lolium perenne* L.) dans le sol sur leur consommation et leur assimilation par *Lumbricus terrestris* L..
Rev. Ecol. Biol. Sol, **25**, 397-412.

C. DARWIN. 1882.
Role des vers de terre dans la formation de la terre végétale.
C. Reinwald,ed, Paris.

M.C. DASH, B. NANDA, P.C. MISHRA. 1981.
Digestive enzymes in three species of Enchytraeidae (Oligochaeta).
OIKOS, **36**, 316-318.

J. de CRECY. 1975.
Dessèchement et réhumectation des pâtes argileuses : unification des résultats.
Ann. Agron., **26**, 651-669.

C.A. EDWARDS, K.E. FLETCHER. 1988.
Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown.
Agriculture, Ecosystems and Environments, **24**, 235-247.

L. FAYOLLE. 1982.
Etude de l'évolution du système déchets-lombriciens-microorganismes : perpectives appliquées.
Thèse de l'université Claude Bernard Lyon I, France.

G. FERRIERE, L. FAYOLLE, M.B. BOUCHE. 1981.
Un nouvel outil, essentiel pour l'écophysiologie et l'écotoxicologie : l'élevage des lombriciens en sol artificiel.
Pedobiologia, **22**, 196-201.

F.M. FLACK, R. HARTENSTEIN. 1984.
Growth of the earthworm *Eisenia fetida* on microorganims and cellulose.
Soil Biol. Biochem., **16**, 491-495.

R.M. GARDNER, C.M. BUCHANAN, R. KOMAREK, D. DORSCHEL, C.BOGGS, A.W. WHITE. 1994.
Compostability of cellulose acetate films.
Journal of Applied Polymer Science, **52**, 1477-1488.

D.F. GILMORE, S. ANTOUN, R.W. LENZ, S. GOODWIN, R. AUSTIN, R.C. FULLER. 1992.
The fate of "biodegradable" plastics in municipal leaf compost.
Journal of Industrial Microbiology, **10**, 199-206.

O. GRAFF. 1974.
Gewinnung von Biomasse aus Abfallstoffen durch Kultur des Kompostregenwurms *Eisenia fetida* (Savigny 1826).
Landbauforschung Voelkenrode, **24**, 137-142.

D.W. GRIJPMA, A.J. PENNINGS. 1994.
(Co)polymers of L-lactide,1. Synthesis, thermal properties and hydrolytic degradation.
Macromol. Chem. Phys., **195**, 1633-1647.

I. GRIZZI, H. GARREAU, S.M. LI, M. VERT. 1995.
Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence.
Biomaterials, **16**, 305-311.

R.A. GROSS, J.-D. GU, D.T. EBERIEL, M. NELSON, S.P. McCARTHY. 1993.
Cellulose acetate biodegradability in simulated aerobic composting and anaerobic bioreactor environments as well as by a bacterial isolate derived from compost.

In *Fundamentals of biodegradable materials and packaging. D. Kaplan, E. Thomas and C. Ching, Eds. Technomic Publishing Co., Lancaster, Pennsylvania. p* 257-279.

R.A. GROSS, J.-D. GU, D.T. EBERIEL, S.P. McCARTHY. 1995.
Laboratory-scale composting test methods to determine polymer biodegradability : model studies on cellulose acetate.
Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry, 613-627.

K. JAMSHIDI, S.H. HYON, Y. IKADA. 1988.
Thermal characterization of polylactides.
Polymer, **29**, 2229-2234.

C. JUSTE, P. SOLDA. 1983.
Valeur agronomique des lombricomposts d'ordures ménagères.
Compost Information, **11**, 33-34.

D.L. KAPLAN, R. HARTENSTEIN, E.F. NEUHAUSER, M.R. MALECKI. 1980.
Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eisenia fetida.*
Soil Biol. Biochem., **12**, 347-352.

F. KAWAI. 1995.
Breakdown of plastics and polymers by microorganisms.
Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, **52**, 153-194.

T. KNIPILER. 1985.
Approche des différents paramètres du lombricompostage conjoint ordures ménagères/boues d'épuration.
DEA Sciences de l'eau et de l'environnement, Montpellier II.

V. KRISTUFEK, K. RAVASZ, V. PIZL. 1992.
Changes in densities of bacteria and microfungi during gut transit in *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta : Lumbricidae).
Soil Biol. Biochem., **24**, 1499-1500.

V. KRISTUFEK, V. PIZL, K. RAVASZ. 1995.
Epifluorescent microscopy of earthworms intestinal bacteria.
Acta Microbiologica et immunologica Hungarica, **42**, 39-44.

K.E. LEE. 1985.
Earthworms, their ecology and relationships with soils and land use.
Academic Press, Sydney.

R.W. LENZ. 1993.
Biodegradable polymers.
Advances in Polymer Science, **107**, 1-40.

S.M. LI, H. GARREAU, M. VERT. 1990a.
Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids) in aqueous media. Part 1 : Poly(DL-lactic acid).
Journal of materials science : materials in medicine, **1**, 123-130.

S.M. LI, H. GARREAU, M. VERT. 1990b.
Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids) in aqueous media. Part 2 : Degradation of lactide-glycolide copolymers: PLA37,5GA25 and PLA75GA25.
Journal of materials science : materials in medicine, **1**, 131-139.

S.M. LI, H. GARREAU, M. VERT. 1990c.
Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids) in aqueous media. Part 3 : Influence of the morphology of poly(L-lactic acid).
Journal of materials science : materials in medicine, **1**, 198-206.

M. LOQUET, M. VINCESLAS. 1987.
L'activité cellulasique dans le tube digestif d'*Eisenia fetida andrei* Bouché. Applications à la biodégradation de déchets organiques.
Bull. Ecol., **18**, 189-201.

J. LUNT. 1998.
Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers.
Polymer Degradation and Stability, **59**, 145-152.

H.B. MILES. 1963.
Soil protozoa and earthworm nutrition.
Soil Sci., **95**, 407-409.

P.C. MISHRA, M.C. DASH. 1980.
Digestive enzymes of some earthworms.
Experientia, **36**, 1156-1157.

M.H. MORGAN. 1988.
The role of microorganisms in the nutrition of *Eisenia fetida.*
Earthworms in waste and environmental management, C.A Edwards et E.F Neuhauser eds., 71-82.

J.N. PARLE. 1963a.
A microbiological study of earthworm casts.
J. gen. Microbiol., **31**, 13-22.

J.N. PARLE. 1963b.
Microorganisms in the intestine of earthworms.
J. Gen. Microbiol., **31**, 1-11.

J.P. QIU. 1998.
Interprétation environnementale intégrée de caractéristiques taxonomiques et paléogéographiques de la biodiversité. Application aux Lumbricoidea (Annelida, Oligochaeta) du pourtour de la méditerranée occidentale.
Thèse de l'Université Montpellier II, France.

D.K. RADHA, B.C. MALLESH, B. KUBRA, D.J. BAGYARAJ. 1992.
Influence of vermicompost application on the available macronutrient and selected microbial populations in a paddy field.
Soil Biol. Biochem., **24**, 1317-1320.

P.W. RAMTEKE, R.K. HANS. 1992.
Isolation of hexachlorocyclohexane (HCH) degrading microorganisms from earthworm gut.
Journal of Environmental Science Health, **A27**, 2113-2122.

M.S. REEVE, S.P. McCARTHY, M.J. DOWNEY, R.A. GROSS. 1994.
Polylactide stereochemistry: effect on enzymatic degradability.
Macromolecules, **27**, 825-831.

A.J. REINECKE, S.A. VILJOEN, R.J. SAAYMAN. 1992.
The suitability of *Eudrilus eugeniae, Peryonix excavatus* and *Eisenia fetida* (Oligochaeta) for vermicomposting in Southern Africa in terms of their temperature requirements.
Soil Biol. Biochem., **24**, 1295-1307.

J. ROUELLE. 1983.
Introduction of amoebae and *Rhizobium japonicum* into the gut of *Eisenia fetida.*
Earthworm ecology, from Darwin to vermiculture, J.E. Satchell ed., 375-381.

J. ROUELLE, M. PUSSARD. 1981.
Certains microorganismes sont-ils indispensable à l'alimentation des vers de terre?.
Réunion des microbiologistes- INRA Dourdan.

H. SAWADA. 1998.
ISO standard activities in standardization of biodegradability of plastics- development of test methods and definitions.
Polymer Degradation and Stability, **59**, 365-370.

G. SCHWACH. 1996.
Etude des facteurs influençant la polymérisation et la dégradation du poly(DL-lactide) amorcé en présence de zinc ou d'octanoate d'étain.
Thèse de l'Université Montpellier I.

J. SEGURA. 1984.
Le compostage des ordures ménagères et ses débouchés agronomiques.
Biofutur, 19-29.

S. STAMATIADIS, E.T. NERANTZIS, E. GIANNAKOPOULOS, L.M. MANIATIS. 1994.
The nutritive value of two species of microorganisms to the earthworm *Eisenia fetida.*
Eur. J. Soil Biol., **30**, 177-185.

A. TORRES DE DOMINGUEZ. 1995.
Dégradation et biodégradation de polymères de l'acide lactique.
Thèse université Montpellier I, France.

A. TORRES, S.M. LI, S. ROUSSOS, M. VERT. 1996a.
Degradation of L- and DL-lactic acid oligomers in the presence of *Fusarium monoliforme* and *Pseudomonas putida.*
J. Environ. Polym. Degrad., **4**, 213-223.

A. TORRES, S.M. LI, S. ROUSSOS, M. VERT. 1996b.
Screening of microorganisms for biodegradation of poly(lactic acid) and lactic acid-containing polymers.
Applied and Environmental Microbiology, **62**, 2393-2397.

M.V. TRACEY. 1951.
Cellulase and chitinase of earthworms.
Nature, 167.

P. VAN GANSEN. 1963.
Structure et fonctions du tube digestif du lombricien *Eisenia fetida* Savigny.
Annales de la Société Royale de Belgique, Tome 93, fascicule 1.

J.M. VENTER, A.J. REINECKE. 1988.
The life-cycle of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta).
S. Afr. J. Zool., **23**, 161-165.

M.VERT. 1995.
Evolution des polymères dans leur milieu.
In *Matériaux polymères, enjeux et perspectives, Masson,* 279-300.

M. VERT, F. CHABOT, J. LERAY, P. CHRISTEL. 1981.
Stereoregular bioresorbable polyesters for orthopaedic surgery.
Makromolekulare Chemie, Suppl. 5, 30-41.

M. VERT, P. GUERIN. 1992.
Des biosystèmes aux matériaux polymères : une utopie?
Biofutur, Juin, 52-57.

M. VERT, S.M. LI, G. SPENLEHAUER, P.GUERIN. 1992.
Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters.
Journal of Materials Science : Materials in Medicine, **3**, 432-446.

M. VINCESLAS, M. LOQUET. 1994.
^{13}C CPMAS RMN spectroscopy of organic matter transformation in ligno-cellulosic waste products composted and vermicomposted (*Eisenia fetida andrei*).
Eur. J. Soil Biol., **30**, 17-28.

D.F. WILLIAMS. 1981.
Enzymic hydrolysis of polylactic acid.
Engineering in Medecine, **10**, 5-7.

M.A. WRIGHT. 1972.
Factors governing ingestion by the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.) with special reference to apple leaves.
Ann. Appl. Biol., **70**, 175-188.

C.L. YUE, R.A. GROSS, S.P. McCARTHY. 1995.
Composting studies of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate).
ANTEC, 2033-2036.

B.G. ZHANG, C. ROULAND, C. LATTAUD, P. LAVELLE. 1993.
Activity and origin of digestive enzymes in gut of the tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus*.
European Journal of Soil Biology, **29**, 7-11.

Annexes

Annexe 1

Composition du milieu de Winogradsky

(d'après Abdul Rida et Bouché, 1997)

Pour 1 litre d'eau distillée:

$MgSO_4$, 7 H_2O	600 mg
$MnSO_4$	20 mg
$Fe_2(SO_4)$	80 mg
$(NH_4)_2SO_4$	200 mg
$ZnSO_4$, 7 H_20	20 mg
$CuSO_4$	20 mg
Na_2HPO_4, 12 H_2O	4000 mg
KH_2PO_4	2100 mg
$CaCO_3$	2000 mg

Annexe 2

Composition du FAA (formol-alcool-acide acétique)

(Debain, comm.pers)

Pour 100 ml :

Formol	10 ml
Ethanol pur	50 ml
Acide acétique	5 ml
Eau	35 ml

Annexe 3

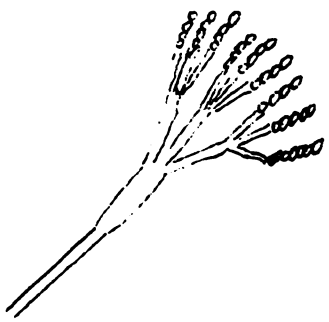
Détermination des genres fongiques

Pour les espèces : F, F', 6, ω, G', H', γ, π, ε, α:

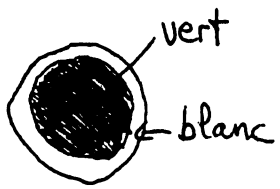
Vitesse de croissance apicale sur PDA

Temps de croissance (jours)	Diamètre moyen des colonies (cm)	Aspect de la colonie
1	0.6	Blanc dessus, jaune ou blanc dessous
2	1.2	Centre vert foncé, puis couronne blanche, puis couronne jaune. Pas de long mycélium, surface à l'aspect granuleux. Envers de la colonie blanc ou jaune.
3	1.5	Pareil. α exsude un liquide transparent.

Dessin du mycelium



dessin de la colonie



Forme imparfaite. Le thalle vert à texture laineuse fait penser à du Penicillium, idée renforcée par l'aspect « en pinceau » de l'appareil sporifère. Les conidiophores sont disposées en

longues chaînes, et sont terminées par des pénicilles pluriverticillées. Les phialides sont légèrement ampulliformes. La croissance sur PDA est assez lente.

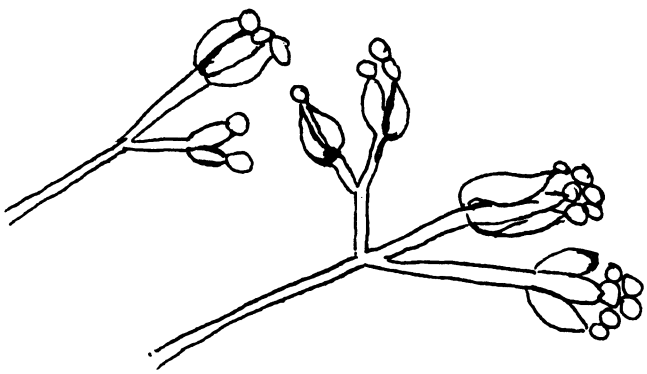
Il s'agit de Penicillium. α serait du *Penicillium italicum*, à cause de son exsudat transparent.

Pour les espèces : G, 7, B, μ, ρ, δ:

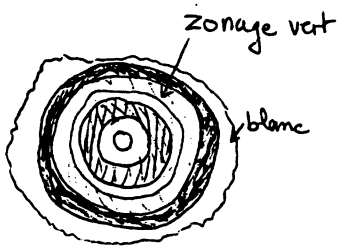
Vitesse de croissance apicale sur PDA

Temps de croissance (jours)	Diamètre moyen des colonies (cm)	Aspect de la colonie
1	1.9	transparent
2	5	Centre un peu vert (sur 0.5 cm), puis mycélium blanc, bords un peu transparents. Thalle très touffu et long, floconneux.
3	Toute la boîte	Zones concentriques plus ou moins vertes, le bord de la colonie est blanc. Thalle floconneux

Dessin du mycelium



dessin de la colonie



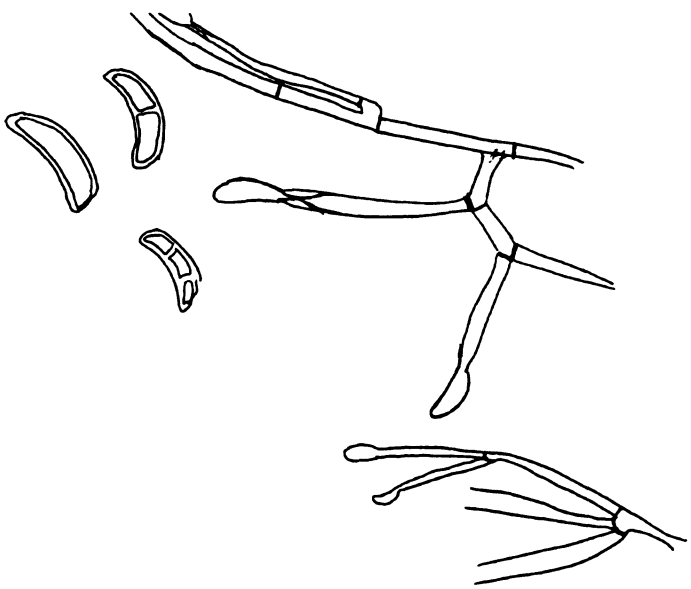
Thalle à croissance très rapide sur PDA, zoné de différentes nuances de vert. Conidiophores ramifiés. Phialides en forme de « bouteille d'Orangina », souvent en groupes. Conidies oblongues à parois lisses.
Il s'agit de Trichoderma.

*Pour les espèces : C, H, β, β':

Vitesse de croissance apicale sur PDA

Temps de croissance (jours)	Diamètre moyen des colonies (cm)	Aspect de la colonie
1	0.7	Blanc transparent, le centre commence à devenir violet
2	1.8	Violet léger au centre, sur 0.3 cm, mycelium blanc cotonneux, colonie légèrement bombée. Envers de la colonie blanc, noir ou marron.
3	3.3	idem

Dessin du mycelium



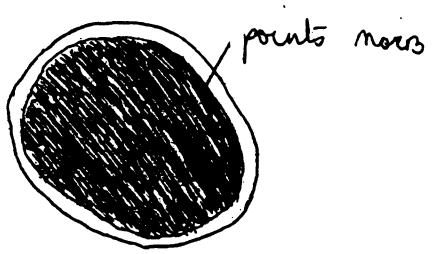
dessin de la colonie

Thalle à croissance moyennement rapide, blanc avec un centre violet. Conidiophores un peu ramifiés, phialides très allongées. Grandes conidies fusiformes typiques, incurvées, extrémités en pointe, la plupart non septées.
Il s'agit de Fusarium

Pour les espèces : A, A'

Vitesse de croissance apicale sur PDA

Temps de croissance (jours)	Diamètre moyen des colonies (cm)	Aspect de la colonie
1	2.7	Colonie un peu blanche avec de très nombreux points noirs, très cotonneuse, périphérie blanche.
2	5	idem
3	Toute la boîte	idem



dessin de la colonie

Thalle à croissance très rapide, très cotonneux, avec des points noirs. Il n'a pas été possible d'observer les conidiophores ni les phialides.
Il s'agit certainement d'Aspergillus.

Table des illustrations

Chapitre I

Figure I.1 : Morphologie externe d'un lombricien (d'après Lee, 1985).....5
Figure I.2 : Cycle de vie d'*Eisenia fetida* (d'après Venter et Reinecke, 1988).....8
Figure I.3 : Section longitudinale des 24 segments antérieurs d'un lombric «typique» (d'après Lee,1985).....12
Figure I.4 : Le tube digestif d'*Eisenia fetida* (d'après Van Gansen, 1963).....13
Figure I.5 : Représentation de l'acide L-lactique.....25
Figure I.6 : Nomenclature des PLA.....26
Figure I.7 : Mécanismes de dégradation possibles pour des plaques massives de PLA 50 (Torres, 1995) selon les conditions extérieures.....28
Figure I.8 : Mode d'action des exo- et endoenzymes sur les polymères.....31
Tableau I.1 : Nomenclatures relatives à la "biodégradabilité" des polymères (d'après Vert et Guérin, 1992).....24
Tableau I.2 : Présentation des différentes résultats de dégradation de polymères en compost d'après la littérature.....34
Tableau I.3 : Composition des composts utilisés par Gross *et al.*, 1995.....36
Tableau I.4 : Titre des normes et méthodes standardisées existantes pour évaluer la biodégradabilité des matériaux plastiques.....37
Tableau I.5 : Titre des méthodes standardisées existantes pour évaluer la toxicité des polluants vis-à-vis des vers de terre.....42

Chapitre II

Figure II-1 : Shéma du dispositif expérimental utilisé pour la détermination de la toxicité (eau seule), et pour les études de bioassimilation (biosynthésol = avec nutriments mélangés) des OLA et PLA par les lombriciens.....48
Figure II-2 : Détermination de la toxicité des PLA et de leurs produits de dégradation vis-à-vis des vers de terre.....49

Figure II-3 : Fèces contenant des OLA 50 après 26 jours de mise en contact des vers de terre avec de l'OLA 50 étalé sur des feuilles de figuier.....53
Figure II-4 : Pellicule de PLA 50, 6 jours après mise en contact des vers de terre avec des PLA 50 étalés sur des feuilles de figuier.....54
Figure II-5 : unique fèces de PLA 50, 6 jours après mise en contact des vers de terre avec des PLA 50 étalés sur des feuilles de figuier.....54
Tableau II-1 : CL 50 des PLA et de leurs produits de dégradation vis-à-vis des vers de terre.....49
Tableau II-2 : Test d'ingestion des composés de type PLA sur supports naturels.....53

Chapitre III

Figure III-1 : Photos du PLA 50 en tampon phosphate soumises à différentes températures:
A) 50°C après 3 jours de dégradation (*27), B) 50°C après 8 jours (*10), C) 70°C après 3 jours (*30).....58
Figure III-2 : Electrophorégramme d'une solution aqueuse (en tampon phosphate) de PLA 50 après 4 jours de dégradation à 70°C.....59
Figure III-3 : Cinétiques d'apparition de produits de dégradation du PLA 50 soumis à différentes températures dans du tampon phosphate :
A) à 70°C
B) à 60°C
C) à 50°C.....60
D) Apparition du monomère de PLA 50 à différentes températures.....61
Figure III-4 : Absorption d'eau du PLA 50 dans du tampon phosphate à différentes températures.....61
Figure III-5 : Perte de poids du PLA 50 dans du tampon phosphate à différentes températures.....61
Figure III-6 : Variation de la masse molaire du PLA 50 en tampon phosphate soumis à différentes températures.....62
Figure III-7 : Variation de masse, de masse molaire et d'absorption d'eau pour le PLA 50 à 60°C.....62
Figure III-8 : Tigettes de PLA 96 soumises à 70°C en tampon phosphate. A) Temps de dégradation : 0 jour. B) Temps de dégradation : 3 jours.....64

Figure III-9 : Apparition du monomère après dégradation du PLA 96 soumis à différentes températures dans du tampon phosphate....65
Figure III-10 : Absorption d'eau du PLA 96 dans du tampon phosphate à différentes températures....65
Figure III-11 : Perte de poids du PLA 96 dans du tampon phosphate à différentes températures....65
Figure III-12 : Variation de la masse molaire du PLA 96 en tampon phosphate soumis à différentes températures....66
Figure III-13 : Variations des températures de fusion, de transition vitreuse et de cristallisation du PLA 96 en tampon phosphate soumis à différentes températures. A: 70°C, B: 50°C....66
Figure III-14 : Profil de température du lombricompost de la SOVADEC, d'après Bouché et Nougaret, 1998....70
Figure III-15 : Profil de température utilisé pour le lombricompost modèle....70
Figure III-16 : tigettes de PLA 50 soumises à un compostage artificiel. A) après 2 jours de dégradation, B) après 5 jours de dégradation....71
Figure III-17 : Variation de la masse molaire du PLA 96 et du PLA 50 en compost artificiel....72
Figure III-18: Variation de la masse molaire des PLA 50 et 96 dans le témoin négatif de dégradation....72
Figure III-19 : Tigettes de PLA 96 soumises à un compost artificiel. A) après 4 jours de dégradation, B) après 27 jours de dégradation....73
Figure III-20: Variation de pH dans le biosynthésol avec levure de bière ou NH_4NO_3 comme source d'azote, pour mise au point du biosynthésol définitif....76
Figure III-21: Schéma du traitement des éprouvettes pour suivre la dégradation microbienne des OLA 50 en biosynthésol....77
Figure III-22 : Dégradation d'OLA 50 en biosynthésol
A- suivi de la quantité d'OLA restant
B- suivi de la quantité d'acide lactique, d'oligomères insolubles et solubles restants....79
Tableau III-1 : Composition moyenne des ordures ménagères en France (d'après Bouché et Nougaret, 1997)....67
Tableau III-2 : Composition du compost modèle pour la simulation de la dégradation des PLA et OLA....68

Chapitre IV

Figure IV-1: (a) Compost au début de la phase thermophile. (b) Compost après 3 mois de maturation. (c) Lombricompost après 3 mois de maturation.....83
Figure IV-2: Fèces contenant du PLA 96 au 76e jour de lombricompost.....84
Figure IV-3: Dégradation d'OLA 50 en biosynthésol en présence et en absence de vers de terre: A suivi de la quantité totale d'OLA 50 restant
B-suivi de la quantité d'acide lactique, d'oligomères insolubles et solubles restants...86
Figure IV-4: Variation de poids des vers de terre juvéniles ayant comme seule source de carbone du PLA, des produits de dégradation ou de la cellulose.....90
Figure IV-5: Variation de pH dans du biosynthésol contenant du PLA ou des produits de dégradation, avec ajout de vers de terre juvéniles au 13e jour.....90
Figure IV-6: Variation de poids des vers de terre subadultes et adultes dans la lévilite seule.....92
Figure IV-7: Variation de poids des vers de terre adultes et subadultes ayant jeûné 62 jours et mis dans du biosynthésol avec comme seule source de carbone de la cellulose ou du lactate.....92
Figure IV-8: Variation de pH dans du biosynthésol contenant du PLA ou des produits de dégradation, avec ajout de vers de terre subadultes et adultes au 13e jour.....93
Figure IV-9: Variation de poids des vers de terre adultes et subadultes ayant jeûné 62 jours et mis dans du biosynthésol avec comme seule source de carbone du PLA 50 et 96.....94
Figure IV-10: Variation de poids des vers de terre adultes et subadultes ayant jeûné 62 jours et mis dans du biosynthésol avec comme seule source de carbone de l'OLA 50 et 96.....94

Chapitre V

Figure V-1 : Schéma du métabolisme potentiel du lactate : cycle de Krebs, néoglucogenèse, autres voies de dégradation.....99
Figure V-2 : Schéma du montage tripartite utilisé pour le suivi du CO_2 radioactif et pour le suivi intratissulaire de l'OLA 50 soumis à la dégradation lombricienne et microbienne.....101
Figure V-3 : Comparaison entre le dégagement de CO_2 radioactif provenant de la dégradation d'OLA 50 en présence ou en absence de vers de terre.....102

Figure V-4 : Autoradiographie d'un ver de terre nourri pendant 12 jours avec de l'OLA 50 radioactif.....105
Tableau V-1 : Quantité de radioactivité trouvée dans les vers de terre dissous dans le Soluène.....104

Chapitre VI

Figure VI-1: Dénombrement de micro-organismes en fonction du temps
A) dans du biosynthésol sans ver de terre, contenant du OLA 50
B) dans les feces d'*E. andrei*, avec OLA 50 comme source de carbone.....111
C) dans du biosynthésol sans ver de terre, contenant du OLA 96
D) dans les feces d'*E. andrei*, avec OLA 96 comme source de carbone.....112
Figure VI-2: Comptage de bactéries sur PCA
A) dans les feces d'*E.andrei*, dilution 10^{-4} après 59 jours dans le biosynthésol avec OLA 50 (7 jours d'ensemencement)
B) dilution 10^{-4}, après 59 jours dans le biosynthésol sans ver avec OLA 50 (7 jours après ensemencement)
C) dans les feces d'*E.andrei*, dilution 10^{-4} après 59 jours dans le biosynthésol avec OLA 96 (7 jours d'ensemencement)
D) dilution 10^{-4}, après 59 jours dans le biosynthésol sans ver avec OLA 96 (7 jours après ensemencement).....113
Figure VI-3: Dénombrement de la microflore anaérobie dans le biosynthésol sans ver de terre et dans les feces d'*E.andrei*.....114
Tableau VI-1 : Dénombrement de la microflore épidermique des vers de terre.....108
Tableau VI-2 : Pourcentage des principaux genres de champignons trouvés dans le biosynthésol ou dans les fèces des lombriciens.
(a) dans le biosynthésol avec OLA 50 comme source de carbone
(b) dans le biosynthésol avec OLA 96 comme source de carbone
(c) dans les feces d'*E.andrei* avec OLA 50 comme source de carbone
(d) dans les feces d'*E.andrei* avec OLA 96 comme source de carbone.....116

Partie expérimentale

Figure PE-1 : Polycondensation de l'acide lactique.....124
Figure PE-2 : Schéma du dégazage de l'acide lactique (d'après Schwach, 1996).....125
Figure PE-3 : Schéma de l'extrusion des fils.....126
Figure PE-4 : Schéma du dispositif utilisé pour déterminer la quantité d'eau à rajouter pour obtenir le pF désiré.....129
Tableau PE-1 : Caractéristiques des solutions de polyéthylène glycol 6000 utilisées (d'après de Crécy, 1975).....128

Vu et permis d'imprimer

Montpellier, le

Le Président de l'Université MONTPELLIER I

Alain UZIEL