



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



2013-2014

MASTER FAGE
Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et
l'Environnement

Spécialité: bois forêt et développement durable (BFD)

**Influence de la composition minérale du bois de hêtre sur
sa dégradation par *Trametes versicolor***

AIT CHEKDHIDH Tafat

Mémoire de stage soutenu à Nancy le 02/09/2014

Sous la direction de:
Philippe GERARDIN, Professeur, Université de Lorraine
Arnaud BESSERER, Maître de conférence, Université de Lorraine

*Laboratoire d'Etude et de Recherche sur le Matériau Bois, Faculté des Sciences et
Technologies, Boulevard des Aiguillettes, B.P. 70239, 54506 Vandoeuvre lès Nancy
[http:// www.lermab.univ-lorraine.fr](http://www.lermab.univ-lorraine.fr)*

*A mes très chers parents vava adhyema azizen
A ma sœur Nabila, son mari Bouhou et leurs enfants; Ziza, Nael et Enzo
A mes sœurs chéries; Lynda, Dahia, Djouher, Milia et Mériem
A mon unique frère Mohand Amoukrane
A Chérifa*

Remerciements

En premier, je souhaiterais adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont aidé et contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail; spécialement:

Monsieur Philippe GERARDIN, Professeur, de m'avoir donné l'occasion de travailler au sein du laboratoire d'études et de la recherche sur le matériau bois (LERMAB), pour ses conseils et sa patience.

Monsieur Arnaud BESSERER, Maître de conférences, pour sa disponibilité, son encouragement, son soutien, son aide et surtout pour tout ce temps qu'il m'a consacré. Je lui exprime ma profonde gratitude.

Monsieur Stéphane DUMARCAÏ, pour son aide et sa disponibilité

Aurélien et Camille du laboratoire IAM, pour leur aide et orientations surtout en partie expérimentale.

A tous mes collègues du laboratoire LERMAB ainsi qu'à Manu et Nicolas.

Sommaire:

| | |
|---|----|
| I- Contexte et objectif de l'étude | 5 |
| II-Partie bibliographique: | 6 |
| 1- Composition chimique du bois | 6 |
| 1-1 Substances macromoléculaires | 6 |
| A/ Cellulose | 6 |
| B/ Hémicelluloses | 7 |
| C/ Lignine | 7 |
| 1-2 Les substances à faibles poids moléculaire | 7 |
| a/ Les extractibles | 7 |
| b/ Matière minérales | 7 |
| 2-Les champignons de pourriture blanche | 8 |
| 2-1 La dégradation du bois par <i>Trametes versicolor</i> | 8 |
| 2-2 Le système de dégradation de la lignine | 8 |
| 2-3 Minéraux et enzymes | 9 |
| | |
| III- Matériels et méthodes | 10 |
| | |
| III-1 Eléments minéraux et conditions | 10 |
| III-2 Nature des souches et procédure de culture | 10 |
| III-3 Préparation des éprouvettes et imprégnation | 10 |
| III-4 Expériences de dégradation | 11 |
| III-5 Activité enzymatique | 11 |
| III-6 Dosage des oligo-éléments Mn, Fe et Cu | 11 |
| | |
| IV- Résultats | 12 |
| IV-1-Croissance du champignon dans un milieu avec des métaux | 12 |
| IV-2 Dosage des éléments minéraux dans le bois | 13 |
| IV-3 Analyse de la dégradation du bois.Perte de masse | 14 |
| IV-4 Influence des minéraux dans le milieu sur la virulence du champignon:..... | 17 |
| IV-5-Activités enzymatiques | 18 |
| | |
| Conclusion | 19 |
| | |
| Références bibliographiques..... | 20 |
| Listes des tableaux | 23 |
| Liste des figures | 24 |
| Annexes | |

Abstract

The chemical composition of wood plays an important role in wood degradation by fungi. Minerals such as manganese, iron and copper act as co-factors in enzymic or non-enzymatic decay processes driven by the fungus. In this work the influence of these three elements on beech wood durability was tested. The metals bioavailability and their ability to trigger laccase production was investigated in four *Trametes versicolor* isolates. The results showed that :1) the trace element concentration used had only a small impact on wood decay, the nature of the fungal strain being more determinant. 2) occurrence of mineral in the culture medium enhanced the beech wood decay by the strains isolated on oak wood 3) the laccase production in presence of minerals is strongly dependant of the fungal genotype. Taken together, it suggests that the link between wood mineral content and its durability strongly rely on the fungal strain that colonized the wood.

Résumé

La composition chimique du bois joue un rôle important dans la dégradation du bois par les champignons. Les éléments minéraux tel que le Manganèse, le Fer et le Cuivre entrent comme co-facteurs dans les activités enzymatiques ou non enzymatiques du champignon. Dans ce rapport l'influence de ces trois éléments minéraux a été évalué sur la durabilité du bois de hêtre. L'influence de la biodisponibilité et le potentiel d'induction de la production de laccase ont été évalués sur quatre isolats de *Trametes versicolor*. Les résultats obtenus ont montré que: 1) les concentrations utilisées n'avaient que peu d'effet sur la dégradation du bois; le facteur déterminant étant l'origine de l'isolat 2) la présence des minéraux dans le milieu de culture a favorisé la dégradation du bois pour les souches isolées sur le chêne 3) la production de laccase en réponse à la présence en minéraux est fortement dépendante du génotype de la souche. L'ensemble des résultats suggèrent que l'influence du contenu minéral du bois sur sa durabilité dépend fortement de la souche de champignon lignivore à laquelle il est confronté.

I- Contexte et objectifs de l'étude

Le bois est un matériau léger, résistant, isolant et renouvelable qui possède de nombreuses qualités esthétiques. Il est l'un des plus anciens matériaux utilisés par l'homme, il jalonne notre histoire et a fait l'objet de progrès technologiques majeurs dans différents domaines comme la construction, l'ameublement ou la fabrication d'instruments de musique.

Toutefois, en tant que matériau naturel, le bois est sensible à de nombreux agents de dégradation abiotiques ou biotiques comme les insectes et les micro-organismes (champignons et bactéries). Les détériorations les plus importantes sont provoquées par les champignons lignivores. Ces derniers font intervenir alternativement des systèmes oxydatifs non enzymatiques (réaction de Fenton) et des réactions enzymatiques afin de décomposer les polymères complexes constituant le bois. Ces réactions font intervenir des ions métalliques pour leur déroulement. Ces ions métalliques proviennent du sol où ils sont présents à l'état de trace.

Les données de la littérature montrent que la dégradation du bois par les pourritures brunes et

blanches s'accompagne d'une accumulation active dans le matériau de certains ions métalliques qui y sont faiblement présents tel que le fer, le calcium le manganèse ou le cuivre (Ostrofsky et al. 1997; Schilling and Bissonnette 2008).

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail est d'étudier l'influence des ions fer (Fe), cuivre (Cu) et manganèse (Mn) sur la durabilité du bois de hêtre confronté à l'attaque de différents isolats de *Trametes versicolor*.

Les travaux de recherche se sont déroulés au sein du Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois (LERMAB) en collaboration avec le Laboratoire Interactions Arbres Microorganismes (IAM).

II Partie bibliographique

1- Composition chimique du bois

Le bois est un matériau composite naturel dont la composition chimique complexe est résumée sur la figure (1). La paroi des cellules qui constituent le bois est constituée en majorité de trois composants macromoléculaires: la cellulose, les hémicelluloses et la lignine dont les proportions relatives et la constitution en monomères varie selon les essences et les types de bois (feuillus et résineux) (Saka, 1991). Le bois comporte également des composants de faible poids moléculaire généralement présents en faibles quantités tels que les extractibles ou les substances minérales. Ce sont ces éléments inorganiques que l'on retrouve dans les cendres que nous allons plus particulièrement étudier ici.

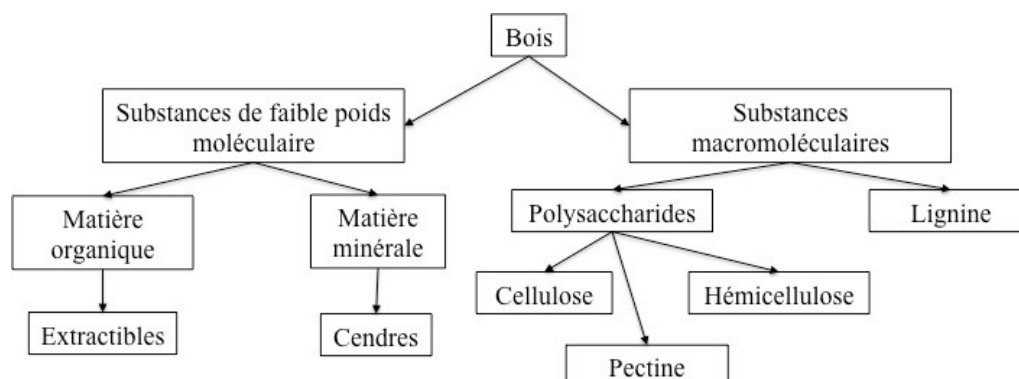


Figure (1): schéma général des constituants chimiques du bois (Pereira et al., 2003)

1.1 Substances macromoléculaires

A/ La cellulose

C'est un polymère qui représente environ 50% de la biomasse du bois. Il se retrouve sous forme linéaire et il est constitué d'unités de D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons β -1,4 glycosidiques. L'unité de répétition du polymère est la cellobiose (figure 2). Dans le bois, les chaînes de cellulose sont liées entre elles par des liaisons hydrogène et forment des microfibrilles.

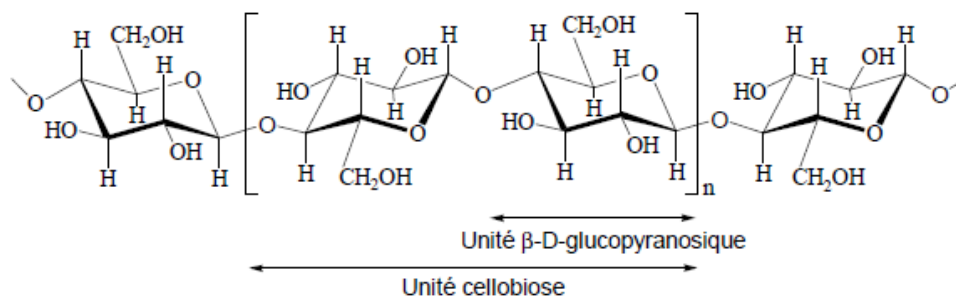


Figure (2): structure de la cellulose

B/Hémicelluloses

Elles représentent de 15 à 25% de la masse sèche du bois. Ces macromolécules polysidiques présentent une grande diversité structurale (Fengel and Wegener, 1984). Les chaînes des hémicelluloses sont ramifiées et constituées d'unités osidiques différentes réparties de façon plus ou moins aléatoire dont la nature varie selon les essences. Les hémicelluloses des feuillus sont constituées de Glucuronoxylanes et celles des résineux de glucomannanes (Rowell 2012).

C/Lignine

C'est un polymère polyphénolique amorphe synthétisé par la plante à partir de trois précurseurs de type phénylpropane : les alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylique. La lignine représente 15 à 30 % de la masse de bois sec. Elle présente une structure très complexe; la présence de nombreuses fonctions hydroxyles (phénoliques ou non) explique la grande réactivité de la lignine. Cependant, leur accessibilité est limitée par la structure tridimensionnelle du réseau moléculaire, mais aussi par l'imbrication de ce polymère avec les hémicelluloses et la cellulose.

1-2 les substances à faibles poids moléculaire

a/ Les extractibles

Ce sont des molécules de faible masse moléculaire dont la nature et la teneur donnent les propriétés spécifiques d'un bois: couleur, odeur, durabilité biologique, pérennité de la couleur, etc. Ce sont des composés solubles dans l'eau ou les solvants organiques tel que les cires et graisses, terpènes et terpenoïdes ainsi que les composés phénoliques. Leur teneur varie fortement entre les espèces, les genres et les familles d'arbres.

b/ Matière minérales

Le bois contient de faibles quantités de matières minérales conduisant aux cendres après combustion de la matière organique. Leur proportion massique peut être élevée dans les bois riches en silice mais elle est en général inférieure à 0,5% (Browning 1967). Cependant cette faible quantité contient une importante diversité d'éléments. Le calcium (Ca), le manganèse (Mg) et le potassium (K) représentent à eux seul 80% de la composition des cendres du bois. Ils se retrouvent sous forme d'oxalate, de carbonates ou de sulfate dans le bois ou sont liés aux groupements acides carboxyliques des pectines (Rowell 2012). Les ions minéraux sont absorbés du sol par les racines puis transporté par la sève brute dans l'arbre. La composition en éléments minéraux des bois varie en fonction de l'essence et surtout du lieu de croissance de l'arbre. L'abondance moyenne globale normalisée de l'élément est dite «valeur de Clarke». Elle représente la teneur moyenne dans le monde d'un élément donné dans un compartiment de

l'environnement. Les valeurs de Clarke pour 60 éléments minéraux dans les bois de feuillus et de résineux ont été déterminées (Vassilev et al. 2014).

2-les champignons de pourriture blanche

L'appellation pourriture blanche provient de l'aspect blanc fibreux des bois des bois attaqués par ces champignons (Triboulot and Trouy-Triboulot 2012). Si les études de génomiques comparatives récentes montrent que la distinction pourriture blanches et pourriture brune n'est pas aussi évidente (Riley et al. 2014), ces champignons basidiomycètes saprophytes restent parmi les seuls organismes capables de dégrader complètement la totalité des composants majeurs du bois et notamment la lignine (Eriksson et al. 1990). Nous limiterons la suite de notre étude bibliographique à *Trametes versicolor* qui a été le champignon modèle utilisé dans nos travaux.

2-1 La dégradation du bois par *Trametes versicolor*

T. versicolor est un champignon basidiomycète de la famille des *Polyporaceae* (Welti et al. 2012) ubiquiste dans les sols de forêts subtropicales et tempérées. Dans la chronoséquence de dégradation du bois mort, il intervient après les ascomycètes comme décomposeur primaire du bois (Frankland 1998). Dans le domaine de la préservation du bois, *T. versicolor* représente un organisme modèle d'étude des champignons de pourriture blanche au même titre que *Phanerochaete chrysosporium*. Il est utilisé dans le cadre de la norme EN 113 afin d'évaluer l'efficacité des produits de préservation. Il s'agit d'un champignon de pourriture non sélective qui prolifère dans les lumens des vaisseaux de bois de feuillus (Blanchette 1995; Schwarze 2007). Il est généralement admis que la dégradation de la lignine est nécessaire aux micro-organismes pour pouvoir accéder à la cellulose et aux hémicelluloses (Cullen and Kersten, 2004).

2-2 Le système de dégradation de la lignine

Lors de l'attaque du bois par *T. versicolor*, le champignon sécrète une grande variété de molécules de faible poids moléculaire qui jouent un rôle important dans la réduction du Fe^{3+} présent dans le bois en Fe^{2+} grâce aux radicaux OH générés par la réaction de Fenton (Arantes and Milagres 2007 et références citées). Ce type de réaction bien connu pour les champignons de pourriture brune est un mécanisme non enzymatique dont la finalité est la dénaturation des macromolécules pariétales afin de les rendre plus accessibles et digestibles par les réactions enzymatiques subséquentes (Arantes et al. 2012). Il s'agit donc d'un mécanisme de dégradation synergique à l'action enzymatique et qui fait intervenir le contenu en ions minéraux endogène du bois. Cependant, l'essentiel de l'action de lyse des constituants du bois et particulièrement de la lignine fait intervenir des enzymes.

Parmi les enzymes ligninolytiques secrétées par *T. versicolor*, on distingue les peroxydases de classe II (peroxydases à hème) qui comptent les lignines peroxydases (LiP ; EC 1.11.1.14), les manganèse peroxydases (MnP ; EC 1.11.1.13) et les peroxydases versatiles (VP ; EC 1.11.1.16). Un autre groupe important d'enzymes secrétées est constitué par les laccases (EC 1.10.3.2). Les mécanismes d'action de ces enzymes sont décrits dans la littérature et une partie des structures ont été résolues (Cullen and Kersten 2004; Hofrichter 2002; Wong 2009).

Le schéma global de la dégradation incluant l'activation de l'oxygène et les réactions enzymatiques est représenté sur la figure 3 (Martínez et al. 2010). Les laccases ou les peroxydases (LiP,MnP,VP) produites par le champignon oxydent la lignine, générant des radicaux aromatiques

(a). Cela conduit à différentes réactions non enzymatiques comme le clivage des liaisons C4-ether (b), des noyaux aromatiques (c), des liaisons C α -C β (d) et la déméthoxylation (e). Les aldéhydes aromatiques générés pas le clivage des liaisons C α -C β ou synthétisés par le champignon (f,g) servent de substrat pour la génération d'H₂O₂ via un cycle redox impliquant les Aryl alcool oxydase (AAO) et deshydrogénases (AAD). Les composés phénoliques produits sont alors réoxydés par les laccases ou les peroxydases (j). Les radicaux phénoxy peuvent également être soumis à une hydrolyse C α -C β (k) produisant des *p*-quinones. Les quinones produites en (g) et (k) sont impliquées dans le cycle redox qui implique des quinones réductases (QR), des laccases et des peroxydases (l,m). Cela conduit à la réduction des ions Fe³⁺ présents dans le bois par les ions superoxydes ou par les quinones et leur réoxydation par l'oxydation concomitante de l' H₂O₂ en radical hydroxyl (n). Ce dernier peut réinitier l'attaque de la lignine (p) de manière similaire à la réaction de Fenton, rendant le polymère accessible à l'action des enzymes décrites précédemment.

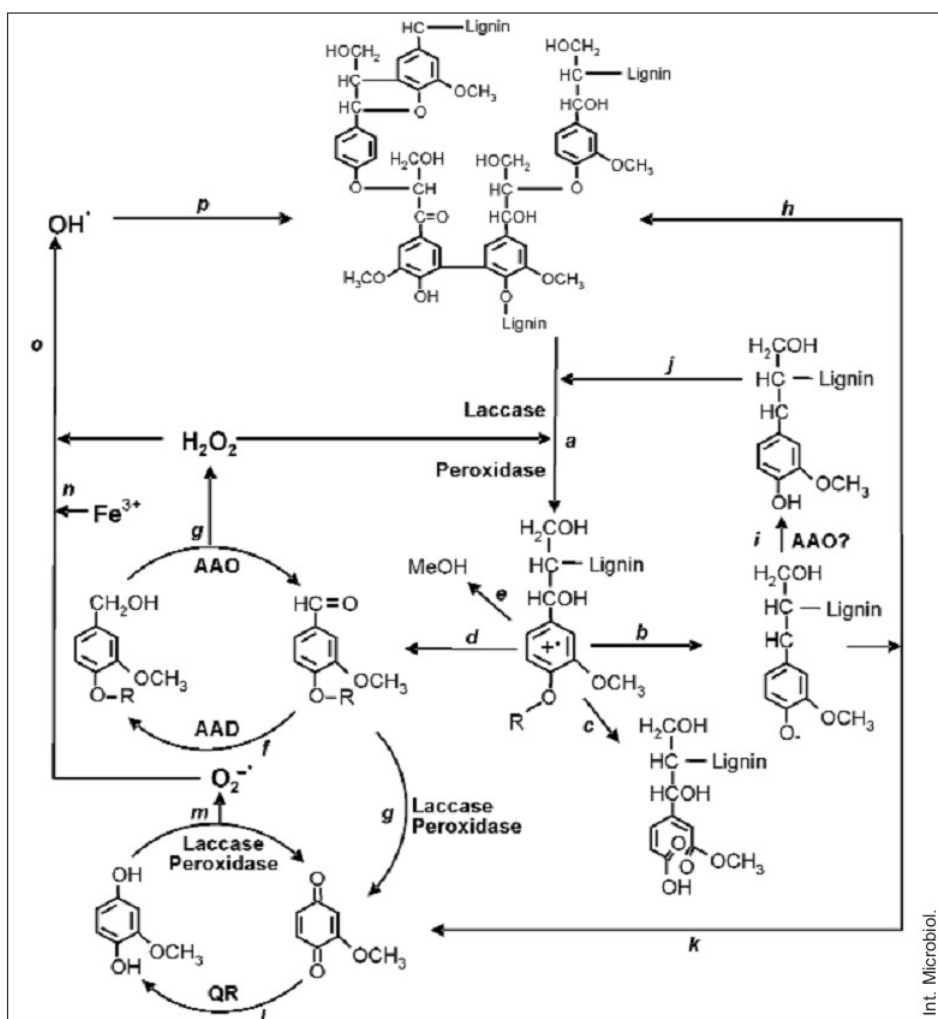


Figure (3): Schéma de la biodégradation de la lignine incluant les réactions enzymatiques et d'activation de l'oxygène (Martínez et al. 2010)

2- 3 Minéraux et enzymes

Le choix des minéraux minéraux (Cu, Fe, Mn) que nous avons étudiés a été dicté par le fait qu'ils sont des cofacteurs entrant dans la constitution des groupements prosthétiques des peroxydases (LiP, MnP, VP) et des oxydases (Laccases) ou un substrat de ces dernières. Le tableau (1) reprend le rôle des différents minéraux étudiés pour ces enzymes.

| Type d'enzyme | Nombre de gènes chez <i>Trametes versicolor</i> (Floudas et al., 2012) | Minéraux impliqués | Fonction |
|---------------|--|--------------------|--|
| LiP | 10 | Fe | Structurale (groupement prosthétique hème) |
| MnP | 13 | Fe | Structurale (groupement prosthétique hème) |
| | | Mn | Substrat |
| VP | 3 | Fe | Structurale (groupement prosthétique hème) |
| | | Mn | Substrat |
| Laccase | 7 | Cu | Structurale (site catalytique) |

Tableau 1: rôle des différents minéraux étudiés pour les enzymes de dégradation de la lignine.

III- Matériels et méthodes

III-1 Éléments minéraux et conditions

Les éléments minéraux ont été utilisés sous forme de solutions réalisées à partir de sels de Manganèse ($MnSO_4$), de Fer ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) et de Cuivre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$). Les concentrations initiales des éléments Mn, Fe et Cu en solution sont 5,00 g/L, 6,00 g/L et 0.62 g/L respectivement et correspondent à celles du milieu Pachlewski modifié (Pachlewski and Pachlewska 1974). Trois dilutions croissantes d'un facteur 10 (dilution à 10, 100 et 1000) sont ensuite réalisées pour obtenir les solutions qui seront imprégnées dans les éprouvettes de bois. Pour chaque concentration testée, les imprégnations ont été réalisées avec les minéraux utilisés seuls ou en combinaison.

III-2 Nature des souches et procédure de culture

Afin d'évaluer l'impact de la variabilité fongique sur l'attaque du bois, quatre souches de *Trametes versicolor* ont été utilisées. Les souches A (T.v 1532) et B (T.v 44889) ont été isolées de bois de hêtre et les souches C (T.v 71) et D (T.v 12183) isolées du bois de chêne.

Les champignons ont été inoculés par repiquage sur du milieu malt (4% m/v) agar (2% m/v) additionné ou non des éléments minéraux aux concentrations mentionnées ci-dessus diluée 100 fois en conditions axéniques (hotte à flux vertical). Les boîtes ont ensuite été incubées à 25°C, 70 % humidité relative jusqu'à ce que le mycélium ait recouvert toute la surface de la boîte soit de 1 à 2 semaines en moyenne.

III-3 Préparation des éprouvettes et imprégnation

Le bois de hêtre (*Fagus sylvatica*) a été usiné en éprouvettes de 30 mm x 15 mm x 5 mm à partir d'une même planche afin de limiter la variabilité du bois. Elles ont été ensuite poncées et séchées à 103°C pendant 48h, puis pesées (P1).

Pour l'imprégnation, les éprouvettes sont soumises aux cycles suivants:

- 15 min de vide à 5 mbar,
- introduction de la solution avec minéraux (soit le minéral seul ou combiné) par aspiration à l'aide d'un robinet trois voies jusqu'à recouvrement complet des éprouvettes,
- retour à la pression atmosphérique, maintien des éprouvettes immergées 30 min avant d'être égouttées, séchées une journée à l'air libre puis séchées à 103°C pendant 48h avant d'être pesées (P2).

III-4 expériences de dégradation

Les tests de dégradation ont été réalisés selon le protocole de la norme EN 113 (1996) modifié. Le test est en effet réalisé en boîtes de pétri de 9 cm comportant chacune 3 éprouvettes de bois imprégnés ou non. Les éprouvettes étaient posées sur des grillages stériles afin de les isoler du milieu de culture. Comme préconisé par la norme, des témoins imprégnés et non imprégnés ont été incubés en absence de champignon. Les boîtes ont été maintenues pendant une durée totale de 12 semaines à l'obscurité et à 25°C, 70% humidité relative. Pour chaque condition et souche, 12 éprouvettes ont été testées (4 boîtes contenant chacune 3 éprouvettes). Les témoins non inoculés étaient constitués de 6 éprouvettes.

Afin d'évaluer l'impact de la présence de minéraux dans le milieu de culture, des éprouvettes de bois non traité ont également été soumises pendant 12 semaines à l'attaques des 4 souches de champignons qui se sont développées sur des milieux contenant des concentrations finales en Mn, Fe et Cu de 0.05 mg/L, 0.06 mg/L et 0.0062 g/L respectivement.

A la fin de l'expérience, les éprouvettes sont retirées des boîtes de Pétri, débarrassées du mycélium adhérent, pesés (P3) et séchées pendant 48h à 103°C puis repesées (P4). Le pourcentage d'humidité (H%) est donné selon l'équation (1) et la perte de masse (PM %) pour bois imprégné et bois non imprégné selon les équations (2) et (3), respectivement.

$$H\% = ((P3 - P2) / P2) \times 100 \quad \text{équation (1)}$$

$$PM (\%) = ((P2 - P4) / P4) \times 100 \quad \text{équation (2)}$$

$$PM (\%) = ((P1 - P4) / P1) \times 100 \quad \text{équation (3)}$$

III-5 activité enzymatique

Les éprouvettes de bois sont imprégnées avec des solutions initiales de minéraux diluées 100 fois pour les sept modalités et incubées à l'obscurité à 25°C et 70% d'humidité relative en présence des quatre souches fongiques, pendant quatre semaines. Le mycélium est retiré des éprouvettes de bois, ces dernières placées par trois dans des tubes de 50mL contenant 15mL de tampon acétate de sodium 0.1 M. Le tout est incubé pendant 2 heures sous agitation, tubes couchés. Les extraits sont transférés dans de nouveaux tubes, centrifugés pendant 10 min à 10000 g à température ambiante. Le surnageant est récupéré et réparti dans des tubes de 1.5 mL puis stocké à - 20°C. Les mesures des activités enzymatiques pour les laccases et peroxydases sont faites par colorimétrie cinétique (le protocole détaillé est présenté en annexes).

III-6 Dosage des oligo-éléments Mn, Fe et Cu

La concentration des oligo-éléments dans le bois est déterminée selon la norme AWPS A7-04.

Brièvement, deux éprouvettes imprégnées selon chaque modalité sont broyées et la sciure est récupérée dans des piluliers. Le témoin est constitué par le bois non imprégné.

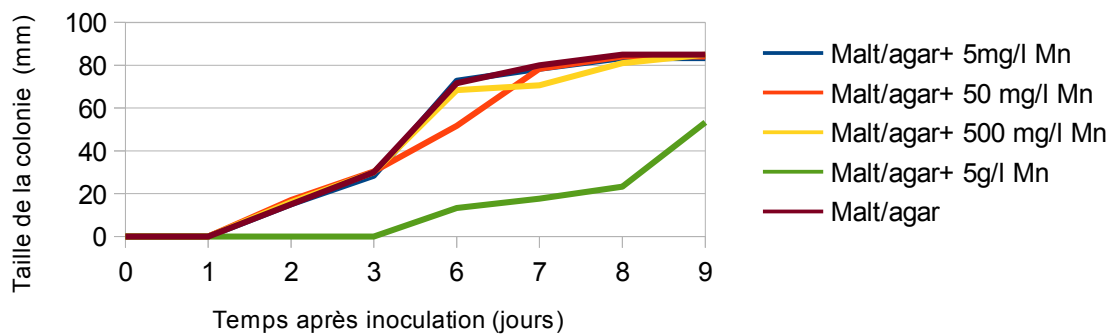
La sciure (200 mg) de chaque échantillon est pesée et placée dans un Erlenmeyer de 50 ml contenant 6 ml d'acide nitrique à 65 %. Le mélange est chauffé à 60°C jusqu'à ce que l'oxydation de la matière organique conduise à un dégagement de vapeur rousse de dioxyde d'azote. Une fois que le dégagement de NO₂ a cessé et après refroidissement, la solution est récupérée avec précaution et transféré en même temps que les eaux de rinçage dans une fiole jaugée de 100 ml pour effectuer le dosage des oligo-éléments par absorption atomique (ICP). Cette analyse a été réalisée dans les laboratoire de Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (INRA).

IV- Résultats

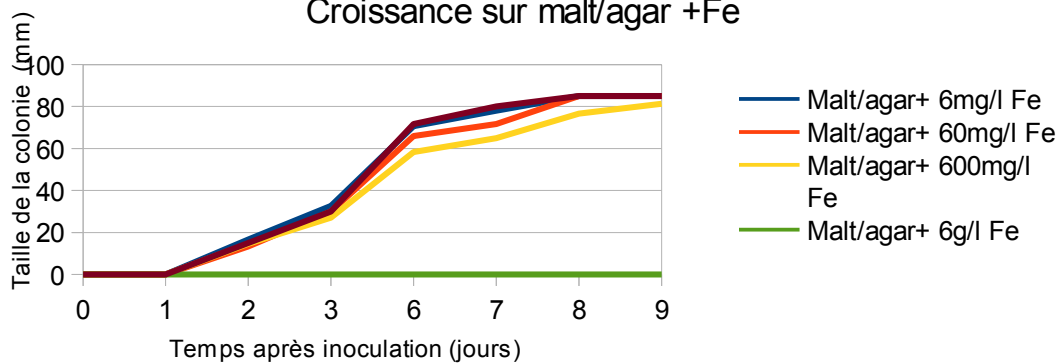
IV-1-Croissance du champignon dans un milieu avec des métaux

Afin de déterminer l'impact des minéraux sur la croissance de *Trametes versicolor*, des milieux malt/ agar contenant une gamme de 4 concentrations en élément Fe, Cu ou Mn ont été réalisés à partir de 4 dilutions en log₁₀ de solutions non diluées à 6g/l, 5g/l et 0,62g/l respectivement. Le mesures des diamètres des colonies ont permis de tracer les courbes présentés dans la figure (4).

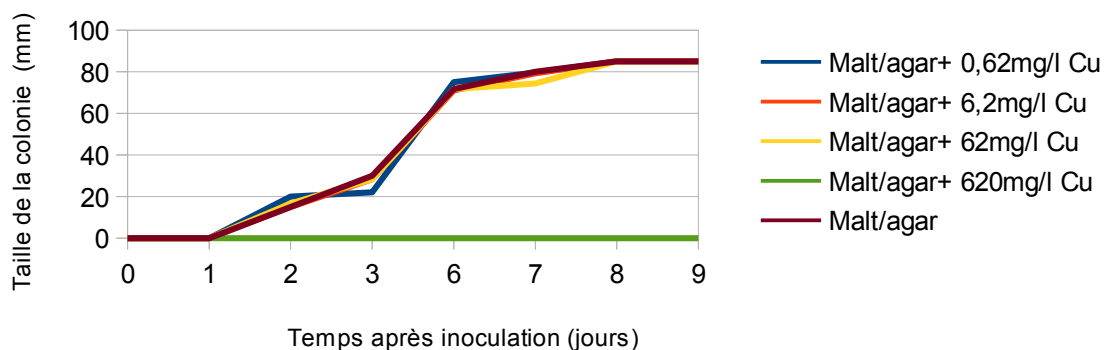
Croissance sur malt/agar +Mn



Croissance sur malt/agar +Fe



Croissance sur malt/agar +Cu



Figures (4) : développement du mycélium de *Trametes versicolor* souche 44889 sur un milieu malt-agar contenant les éléments Mn , Fe et Cu chaqu'un seul aux concentrations indiquées.

Le champignon a une croissance similaire en présence et en absence de minéraux dans le milieu pour les trois éléments si la concentration de ces derniers est au moins dix fois inférieure à celle de la solution stock. En effet, dans ce cas on note un effet toxique des minéraux sur la croissance du mycelium. Si la croissance est ralentie en présence de 5g/l de Mn, elle est totalement inhibée pour des concentration de 6g/L de Fe et 0,62g/L de Cu. Il est intéressant de noter que dans l'activité cellulolytique de *Phanerochaete chrysosporium* est fortement inhibée lorsque le champignon est exposé à 0,29g/l de Mn et 0,15g/l de Cu (Falih 1998). Par ailleurs, les « métaux lourds » tel que le mercure ou le cuivre peuvent inhiber la croissance des basidiomycètes (Baldrian; 2003). Cependant, des expériences réalisées sur des cultures liquides de *T. versicolor* ont montré que la sécrétion des oxydases lignolytiques (Laccase et MnP) augmente en présence de métaux dans le milieu (Lebrun et al. 2011a). Au vu de ces résultats, nous avons imprégné nos éprouvettes de bois avec des solutions de minéraux diluées 10, 100 et 1000 fois.

IV-2 Dosage des éléments minéraux dans le bois

La fixation des éléments minéraux dans le bois dépend de nombreux facteurs tels que le pH, l'essence et l'élément considéré. Par exemple, la capacité de fixation du Cu²⁺ dans la sciure de hêtre est très différente de celle du Ni²⁺ (Božić et al. 2013). Afin de quantifier les quantités de chacun des éléments trace fixés dans le bois des analyses d'inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP) ont été réalisées sur les éprouvettes de bois jumelles de celles soumises aux dégradations biologiques. Ces analyses ont été conduites après une minéralisation acide. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.

| <i>Echantillon</i> | <i>Mn(ppb)</i> | <i>Fe(ppb)</i> | <i>Cu(ppb)</i> |
|--|----------------|----------------|----------------|
| Témoin (bois non imprégné) | 71 | 1260,5 | 5.4 |
| Mn 0.005 mg/ml | 92 | 1005 | 12 |
| Mn 0,05 mg/ml | 126 | 796 | 11 |
| Mn 0,5 mg/ml | 440 | 1425 | 30 |
| Fe 0,006 mg/ml | 64 | 875 | 9 |
| Fe 0,06 mg/ml | 71 | 971 | 7 |
| Fe 0,6 mg/ml | 64 | 969 | 7 |
| Cu 6,2.10 ⁻⁴ mg/ml | 62 | 772 | 9 |
| Cu 6,2.10 ⁻³ mg/ml | 63 | 1026 | 17 |
| Cu 6,2.10 ⁻² mg/ml | 74 | 1387 | 55 |
| Mn 0.005 mg/ml+Fe 0,006 mg/ml | 85 | 1122 | 6 |
| Mn 0,05 mg/ml+Fe 0,06 mg/ml | 119 | 1159 | 6 |
| Mn 0,5 mg/ml+Fe 0,6 mg/ml | 500 | 1445 | 6 |
| Mn 0.005 mg/ml+Cu 6,2.10 ⁻⁴ mg/ml | 67 | 1383 | 7 |
| Mn 0,05 mg/ml+Cu 6,2.10 ⁻³ mg/ml | 83 | 1264 | 11 |
| Mn 0,5 mg/ml+Cu 6,2.10 ⁻² mg/ml | 584 | 973 | 62 |
| Fe 0,006 mg/ml+Cu 6,2.10 ⁻⁴ mg/ml | 56 | 1299 | 8 |
| Fe 0,06 mg/ml+Cu 6,2.10 ⁻³ mg/ml | 54 | 952 | 26 |

| | | | |
|---|-----|------|----|
| Fe 0,6 mg/ml+Cu 6,2.10 ⁻² mg/ml | 56 | 1981 | 68 |
| Mn 0.005 mg/ml+Fe 0,006 mg/ml+Cu 6,2.10 ⁻⁴ mg/ml | 68 | 981 | 7 |
| Mn 0,05 mg/ml+Fe 0,06 mg/ml+Cu 6,2.10 ⁻³ mg/ml | 117 | 706 | 17 |
| Mn 0,5 mg/ml+Fe 0,6 mg/ml+Cu 6,2.10 ⁻² mg/ml | 544 | 1623 | 66 |

Tableau 2: Quantification des différents éléments présents dans les éprouvettes de bois en partie par milliard soit en µg/kg de bois anhydre.

Les résultats en rouge indiquent les éléments imprégnés. Les mesures pour l'élément Fer sont apparues anormalement élevées. La proportionnalité n'est pas totalement respectée mais on note tout de même une augmentation de la quantité de minéraux fixés dans le bois qui suit l'augmentation de la concentration de ces derniers en solution. Une analyse plus détaillée réalisée sur des broyats (bois broyé dans un broyeur métallique) et des copeaux (bois coupé avec un couteur), a démontré que l'anomalie de la poudre du bois provenait du broyeur utilisé pour la préparation des échantillons. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 3.

| Type d'échantillons | Cu (ppb) | Fe (ppb) | Mn (ppb) | Zn (ppb) |
|---------------------|----------|--------------|----------|----------|
| Poudre | 13 ± 5 | 12121 ± 8110 | 94 ± 31 | 44 ± 9 |
| Copeaux | 7 ± 2 | 18 ± 19 | 77 ± 27 | 22 ± 5 |

Tableau 3: Comparaison des mesures d'ICP obtenues sur des copeaux ou sur les broyats de bois de hêtre non imprégnés. Dix échantillons indépendants ont été analysés. Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués.

IV-3 Analyse de la dégradation du bois. Perte de masse

Les éprouvettes de hêtre imprégnées ou non imprégnées (témoin), ont été exposés aux différentes souches de *T. versicolor*. Les résultats obtenus après 12 semaines d'incubation sont présentés sur les figures 7 à 10.

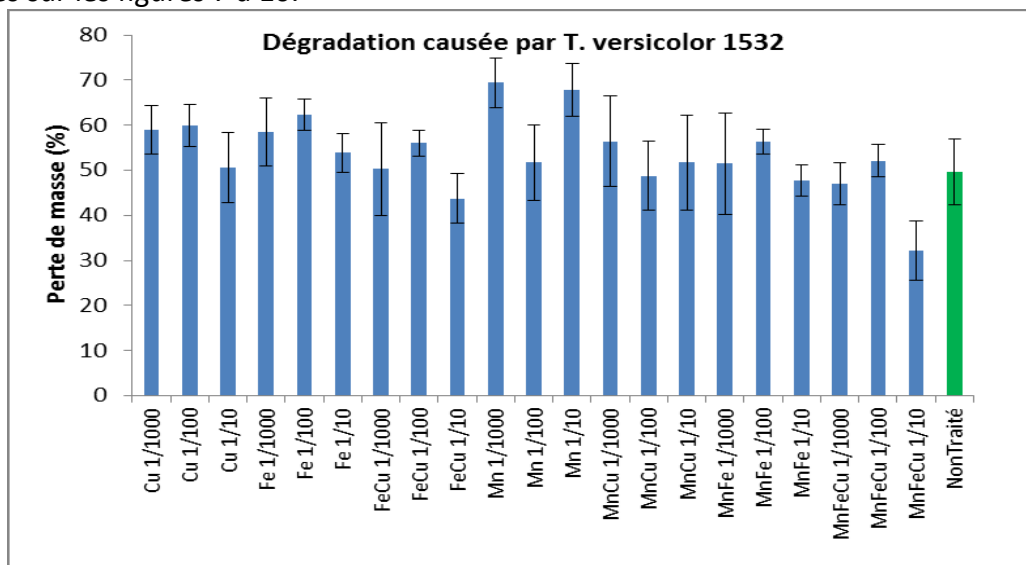


Figure (5): perte de masse pour le bois imprégné et non imprégné exposé à T.versicolor 1532

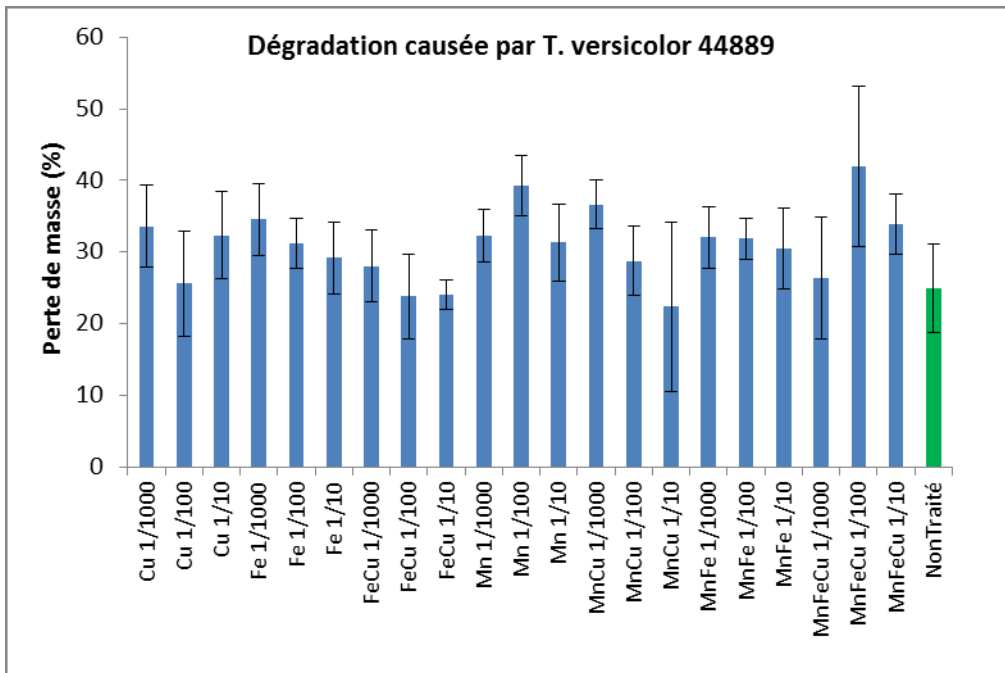


Figure (6): perte de masse pour le bois imprégné et non imprégné exposé à T.versicolor 44889

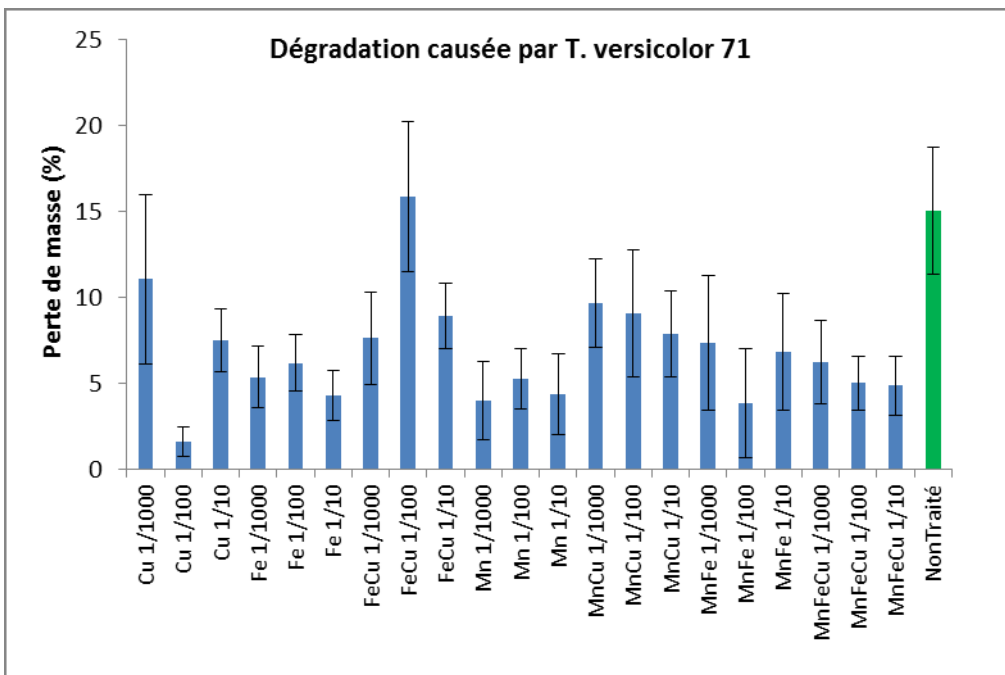


Figure (7): perte de masse pour le bois imprégné et non imprégné exposé à T.versicolor 71

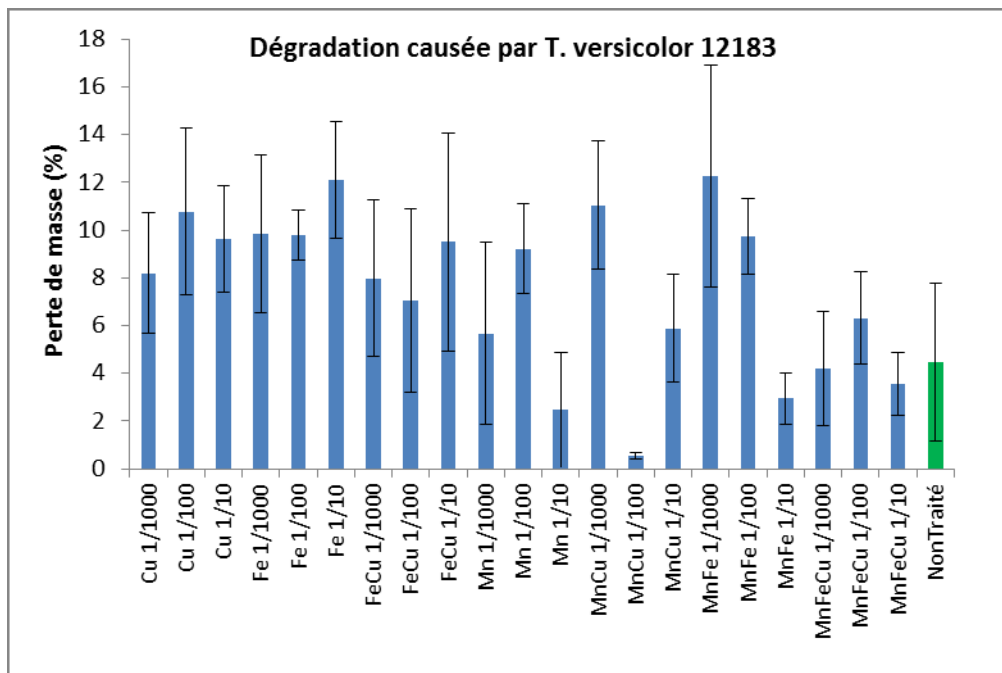


Figure (8): perte de masse pour le bois imprégné et non imprégné exposé à *T.versicolor* 12183

Les quatre souches de *Trametes versicolor* ont une virulence très variable dans les conditions de culture testées. En effet, les pertes de masses mesurées sont de 47,9%, 22,1%, 15% et 4,5% pour les témoins pour les souches 1532, 44889, 71 et 12183 respectivement. Les souches A et B isolées de bois de hêtre semblent donc plus adaptées à dégrader celui-ci. A l'issue de l'analyse statistique, il semble que les souches 1532 et 44889 ne soient pas fortement impactées par la présence de minéraux dans le bois. Il semble y avoir une tendance à la stimulation en particulier dans le cas du manganèse. Ces résultats sont à rapprocher de l'induction transcriptionnelle observée pour les gènes codant pour deux manganèses peroxydases chez *T. versicolor* (Johansson et al. 2002). Il est à noter que cette induction n'est exclusivement dépendante de la présence de "Metal response element box" dans la région promotrice de ces gènes. Cela suggère une régulation métabolique plus complexe de la sécrétion de ces enzymes (Janusz et al. 2013).

Les souches 71 et 12183, isolées de chêne montrent un comportement totalement différent pour la dégradation du bois de hêtre. Les pertes de masses sont très faibles (15% et 4,5%) en absence de traitement d'imprégnation. Par ailleurs, la présence de minéraux dans le bois semble au contraire avoir un effet inhibiteur sur le développement du champignon.

Toutefois ces observations sont à prendre avec beaucoup de précautions du fait d'une variabilité très importante et d'une faible adsorption des minéraux dans le bois (tableaux 2 et 3). Les analyses statistiques n'ont montré en effet que peu de différences significatives et une importante dispersion des données. Il semble que la nature du métal puisse influencer le niveau de dégradation mais que l'effet lié à la concentration reste marginal. La souche de champignon et sa capacité potentielle à utiliser les cation métalliques semble d'avantage influencer la dégradation du matériau. Cependant cette potentialité soulève la question de la disponibilité des cation dans le bois. En effet il a été montré que la biodisponibilité des métaux dans le milieu influence fortement la sécrétion des MnP et des laccases (Lebrun et al. 2011b).

IV-4 Influence des minéraux dans le milieu sur la virulence du champignon

Afin d'évaluer l'influence de la biodisponibilité des différents éléments minéraux sur la capacité des différentes souches de *T. versicolor* à dégrader le hêtre, les différents éléments ont été ajoutés au milieu malt-agar. Les concentrations utilisées étaient de 0.05 g/L, 0.06 g/L et 0.0062 g/L pour le Mn, Fe et le Cu respectivement. Les pertes de masses obtenues après 12 semaines d'incubation sont rapportées sur le graphique de la figure 11.

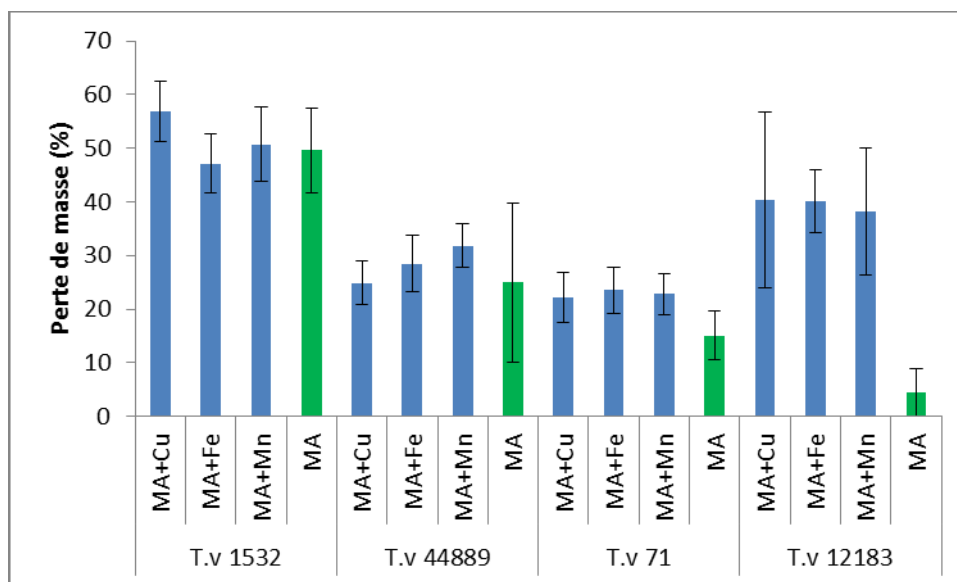


Figure (9): Dégradation des éprouvettes de hêtre non imprégnées par les 4 souches de *T. versicolor* cultivées sur du milieu malt agar additionné ou non de Cu, Mn et Fe. Les barres vertes indiquent les pertes de masses mesurées sur les échantillons cultivés sur milieu malt agar sans additif. Les barres d'erreur sont l'intervalle de confiance à 95%.

L'analyse des résultats montre que la présence de métaux dans le milieu de culture n'a pas d'influence sur la virulence des souches 1532 et 44889. En effet il n'y a pas de différence significative entre les pertes de masse mesurées sur les échantillons attaqués par les champignons cultivés sur milieu malt-agar et ceux cultivés sur milieu malt-agar additionné de minéraux. En revanche, la présence de minéraux dans le milieu stimule la dégradation des éprouvettes par les souches 71 et 12183. Dans ces conditions de croissance, les pertes de masses mesurées sont comparables entre les souches 1532 (isolat hêtre) et 12183 (isolat chêne) d'une part et les souches 44889 (isolat hêtre) et 71 (isolat chêne) d'autre part. Ces résultats sont opposés à ceux obtenus précédemment lorsque les minéraux étaient présents dans le bois. Par ailleurs, la vitesse de croissance des souches 71 et 12183 est nettement supérieure en présence de minéraux dans le milieu de culture ce qui indique une meilleure perception de ces derniers probablement du fait de leur meilleure biodisponibilité et pourrait indiquer une stimulation globale du métabolisme fongique.

Une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène serait que chez les souches 1532 et 44889 la sécrétion de molécules à pouvoir lignocellulolytique (faible poids moléculaire et enzymes) est déclenchée par la perception de molécules de bois de hêtre. Celle-ci masquerait l'induction engendrée par les minéraux. En revanche, l'induction « bois dépendant » n'ayant pas lieu chez les souches 71 et 12183, l'effet des minéraux devient plus visible. Ce type de phénomène, déjà

observé chez *T. versicolor* (Collins and Dobson 1997; Lekounougou et al. 2008) a été récemment mis en évidence chez la pourriture blanche *Phlebia radiata* (Mäkelä et al. 2013).

Des expériences complémentaires sont nécessaires pour préciser ces données. La comparaison des génomes des différentes souches de *T. versicolor* en cours de réalisation au sein du laboratoire IAM devrait permettre d'apporter des éléments de réponses aux mécanismes fins de réponse de *T. versicolor* à son environnement.

VI-5-Activités enzymatiques

Afin d'évaluer l'activité biologique de dégradation de la lignine des différentes souches de *T. versicolor* dans les éprouvettes de bois imprégnées avec différentes solutions de minéraux, les activités laccases, LiP et MnP ont été mesurées. Le protocole détaillé est donné en annexe. Les mesures d'activités LiP et MnP obtenues étaient très faibles et peuvent donc être considérées comme nulles. Seuls les résultats obtenus pour l'activité laccase seront présentés sur la figure 12. Les mesures témoins ont été réalisées sur des éprouvettes de bois non colonisées de manière à visualiser l'effet des extractibles hydrosoluble sur la production de laccase.

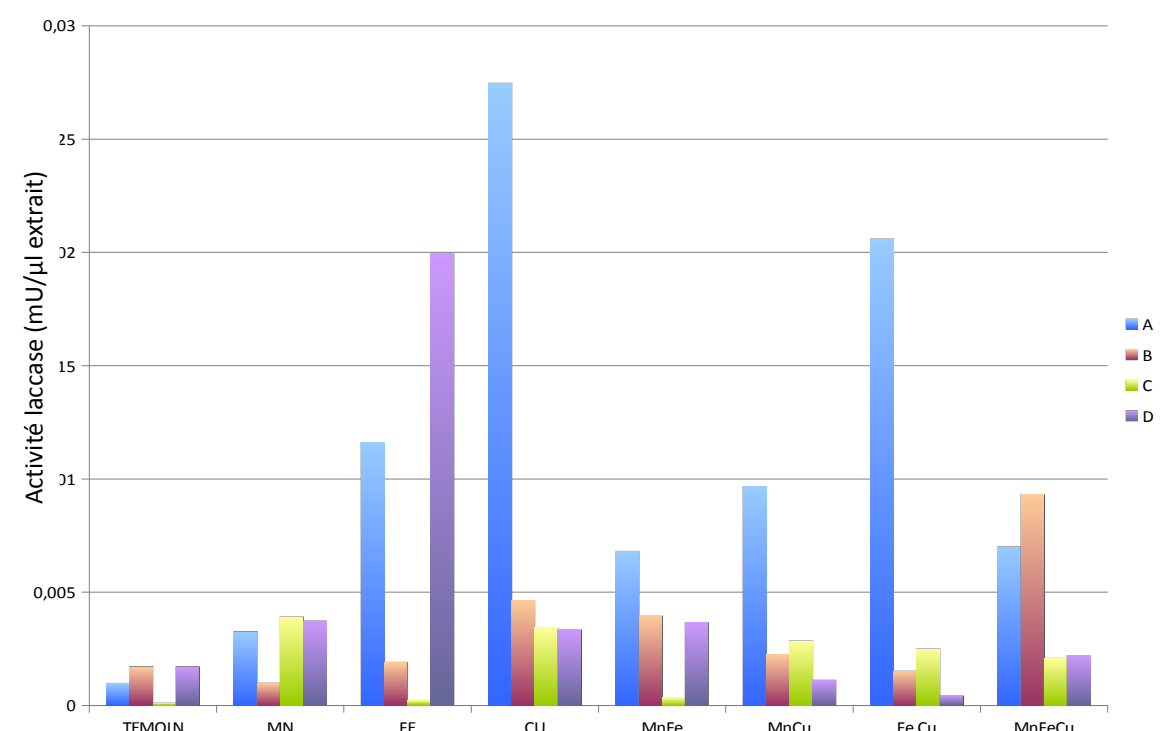


Figure (10) : Activités enzymatiques des laccases pour les souches A(1532), B(44889), C (71) et D(12183) de *Trametes versicolor*. Les minéraux imprégnés dans le bois sont indiqués en abscisse.

Les activités laccases sont globalement faibles pour les quatre souches étudiées. Cela peut être expliqué par le fait que la mesure a été après 4 semaines et non de manière cinétique. Or comme observé précédemment (Lekounougou et al. 2008), l'activité laccase est maximale dans les premiers jours de la colonisation. Cependant, la souche (1532) montre une activité laccase plus importante que les autres souches et ce dans toutes les conditions testées.

L'induction la plus importante pour cette souche est observée en présence de cuivre. Il a été rapporté que le Cu augmente la production de laccase dans différents champignons (Crowe et Olsson, 2001; Baldrian, 2003; Lorenzo et al., 2006). Les métaux semblent avoir un effet synergique sur l'induction de la production de laccase comme en témoigne les mesures effectuées en présence de Cu et de Fe ou en présence des trois métaux Cu, Fe, et Mn pour la souche 1532. Ce phénomène de synergie entre les trois éléments est également observé pour la souche 44889. Les souches 71 et 12183 qui ne montraient qu'une faible activité de dégradation sur les bois imprégnés ne voient leur activité laccase que faiblement augmenter par rapport au témoin. En lien avec l'hypothèse d'une induction transcriptionnelle par les métaux énoncée précédemment cela suggère un lessivage partiel des minéraux dans le milieu de culture lors de la phase d'incubation du protocole de mesure. Ce phénomène a déjà été évalué précédemment (Božić et al. 2013). Il faut cependant noter un effet antagoniste du Fe avec les autres éléments sur la production de laccase par la souche 12183. Cependant, afin de valider ces résultats préliminaires, des mesures supplémentaires sont requises.

Conclusion

Les interactions entre la pourriture blanche *Trametes versicolor* et les métaux ont plusieurs conséquences physiologiques, écologiques et technologiques. Les métaux sont essentiels sont nécessaires pour la croissance et le développement du champignon, mais ils sont toxiques lorsqu'ils sont présents en excès.

L'objectif de cette étude était de déterminer l'influence du contenu minéral du bois sur sa durabilité quand il confronté à une attaque par *Trametes versicolor*. Les différents isolats de champignon testés sur des bois imprégnés avec différentes concentrations de Mn, Cu et Fe ont conduit aux observations préliminaires suivantes:

- Le contenu minéral du bois n'influe que peu sur sa dégradation par les champignons. Celle-ci dépend d'avantage de l'origine de la souche de champignon lignivore. Les souches isolées de bois de hêtre semblent dégrader d'avantage les éprouvettes que les souches isolées sur du bois de chêne
- Lorsque les minéraux sont plus disponibles dans le milieu, les souches 71 et 12183 isolées de chêne semblent induire leur machinerie de dégradation.
- Certains minéraux comme le Cu induisent la production de laccase chez certaines souches comme la 1532. Cette régulation n'est pas systématique comme par exemple pour la souche 71.

L'ensemble des résultats obtenus, bien que préliminaires et nécessitant des expériences complémentaires, laisse supposer que la capacité de dégradation des différentes souches de *T. versicolor* dépend de plusieurs facteurs tel que l'essence ou les minéraux disponibles dans l'environnement du champignon.

Références bibliographique

- Arantes V, Jellison J, Goodell B (2012) Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:323–338.
- Arantes V, Milagres AMF (2007) The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe³⁺-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. *Enzyme Microb Technol* 42:17–22.
- Baldrian P (2003) Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 32;78–91.
- Blanchette RA (1995) degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can J Bot-Rev Can Bot* 73:S999–S1010.
- Božić D, Gorgievski M, Stanković V, Štrbac N, Šerbula S, Petrović N (2013) Adsorption of heavy metal ions by beech sawdust – Kinetics, mechanism and equilibrium of the process. *Ecol Eng* 58:202–206.
- Collins PJ, Dobson A (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 63:3444–3450.
- Cullen D, Kersten PJ (2004) Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation. In: Brambl R, Marzluf G (eds) *Biochem. Mol. Biol.* Springer Berlin Heidelberg, pp 249–273.
- Crowe J D, Olsson S (2001) Induction of Laccase Activity in *Rhizoctonia solani* by Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* Strains and a Range of Chemical Treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* .67(5);2088-2094.
- Eriksson KEL, Blanchette RA, Ander P (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. ix + 407 pp.
- Falih AM (1998) Impact of heavy metals on cellulolytic activity of some soil fungi. *Kuwait J Sci Eng* 25;397–407.
- Fengel D. and Wegener G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.* Walter de Gruyter, Berlin : 613.
- Frankland JC (1998) Fungal succession—unravelling the unpredictable. *Mycol Res* 102:1–15.
- Hofrichter M (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb Technol* 30:454–466.
- Janusz G, Kucharzyk KH, Pawlik A, Staszczak M, Paszczynski AJ (2013) Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme Microb Technol* 52:1–12.
- Johansson T, Nyman PO, Cullen D (2002) Differential Regulation of *mnp2*, a New Manganese Peroxidase-Encoding Gene from the Ligninolytic Fungus *Trametes versicolor* PRL 572. *Appl Environ Microbiol* 68:2077–2080.

- Lebrun JD, Demont-Caulet N, Cheviron N, Laval K, Trinsoutrot-Gattin I, Mougin C (2011a) Secretion profiles of fungi as potential tools for metal ecotoxicity assessment: A study of enzymatic system in *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 82:340–345.
- Lebrun JD, Lamy I, Mougin C (2011b) Favouring the bioavailability of Zn and Cu to enhance the production of lignin-modifying enzymes in *Trametes versicolor* cultures. *Bioresour Technol* 102:3103–3109.
- Lekounougou S, Mounguengui S, Dumarçay S, Rose C, Courty PE, Garbaye J, Gérardin P, Jacquot JP, Gelhaye E (2008) Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization. *Int Biodeterior Biodegrad* 61:287–293.
- Lorenzo M, Moldes D, Sanromán MÁ (2006) Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere* 63:912–917.
- Mäkelä MR, Lundell T, Hatakka A, Hildén K (2013) Effect of copper, nutrient nitrogen, and wood-supplement on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Fungal Biol* 117:62–70.
- Martínez ÁT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC (2010) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8:195–204.
- Ostrofsky A, Jellison J, Smith KT, Shortle WC (1997) Changes in cation concentrations in red spruce wood decayed by brown rot and white rot fungi. *Can J For Res* 27:567–571.
- Pachlewski R, Pachlewska J (1974) Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of pine (*Pinus silvestris* L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure cultures on agar.
- Pereira H., Graça J. Rodrigues J. C., (2003). "Wood chemistry in relation to quality". In: John B. et George J. Wood quality and its biological basis. Oxford. Blackwell Publishing: 30-52.
- Riley R, Salamov AA, Brown DW, Nagy LG, Floudas D, Held BW, Levasseur A, Lombard V, Morin E, Otilar R, others (2014) Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc Natl Acad Sci* 111:9923–9928.
- Rowell RM (2012) *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*, Second Edition. CRC Press.
- Saka S (1991) *Chemical composition and distribution, wood and cellulosic chemistry*, Shiraishi N., Hon D.N.S., Ed. M. Dekker: 59-88.
- Schilling JS, Bissonnette KM (2008) Iron and calcium translocation from pure gypsum and iron-amended gypsum by two brown rot fungi and a white rot fungus. *Holzforschung* 62:752–758.

- Triboulot P, Trouy-Triboulot M-C (2012) Matériau bois Durabilité. Tech. Ing. Matér. Constr. Tradit. base documentaire : TIB224DUO:
- Vassilev SV, Vassileva CG, Baxter D (2014) Trace element concentrations and associations in some biomass ashes. *Fuel* 129:292–313.
- Welti S, Moreau P-A, Favel A, Courtecuisse R, Haon M, Navarro D, Taussac S, Lesage-Meessen L (2012) Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera, and description of a new genus *Leiotrametes*. *Fungal Divers* 55:47–64.
- Wong DW (2009) Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* 157:174–209.

Liste des tableaux

Tableau 1: rôle des différents minéraux étudiés pour les enzymes de dégradation de la lignine.

Tableau 2: Quantification des différents éléments présents dans les éprouvettes de bois en partie par milliard soit en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de bois anhydre.

Tableau 3: Comparaison des mesures d'ICP obtenues sur des copeaux ou sur les broyats de bois de hêtre non imprégnés. Dix échantillons indépendants ont été analysés. Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués.

Liste des figures

Figure (1): schéma général des constituants chimiques du bois (Pereira et al., 2003)

Figure (2): structure de la cellulose

Figure (3): Schéma de la biodégradation de la lignine incluant les réactions enzymatiques et d'activation de l'oxygène (Martínez et al. 2010)

Figures (4) : développement du mycélium de *Trametes versicolor* souche 44889 sur un milieu malt-agar contenant les éléments Mn , Fe et Cu chaqu'un seul aux concentrations indiquées.

Figure (5): perte de masse pour le bois imprégné et non imprégné exposé à *T.versicolor* 1532

Figure (6): perte de masse pour le bois imprégné et non imprégné exposé à *T.versicolor* 44889

Figure (7): perte de masse pour le bois imprégné et non imprégné exposé à *T.versicolor* 71

Figure (8): perte de masse pour le bois imprégné et non imprégné exposé à *T.versicolor* 12183

Figure (9): Dégradation des éprouvettes de hêtre non imprégnées par les 4 souches de *T. versicolor* cultivées sur du milieu malt agar additionné ou non de Cu, Mn et Fe. Les barres verte indiquent les perte de masses mesurées sur les échantillons cultivées sur milieu malt agar sans additif. Les barres d'erreur sont l'intervalle de confiance à 95%.

Figure (10) : Activités enzymatiques des laccases pour les souches A(1532), B(44889), C (71) et D(12183) de *Trametes versicolor*. Les minéraux imprégnés dans le bois sont indiqués en abscisse.

Annexes

MESURE ACTIVITE ENZYMATIQUE PAR COLORIMETRIE CINETIQUE

1. Mesure colorimétrique

- ❖ Programmation protocole lecteur plaque (Victor3)

New protocole NOM avec 1: shake 5s; 2: abs dans le visible copie:

- LACCASE = 420nm 12 mesures prises toutes les 600s.
- LIGNINE PEROXYDASES = 650nm 12 mesures prises toutes les 1200s.
- MANGANESE PEROXYDASES = 590nm 12 mesures prises toutes les 600s.

- ❖ Mesure activité des échantillons

- ◆ Activité laccase: ($\varepsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Dans un puits déposer:

- 50 μl de culture fongique.
- 50 μl de tampon d'incubation (tampon sodium acétate pH=4,5).
- 50 μl de substrat ABTS afin de démarrer la réaction.

- ◆ Activité lignine peroxydase:

Ce test colorimétrique contrairement aux autres est basé sur la diminution au cours du temps de l'absorbance causée par l'oxydation de l'azure B.

Dans un puits déposer:

- 50 μl de culture fongique.
- 100 μl de tampon d'incubation (tampon sodium tartrate pH = 4,5).
- 30 μl d'eau ultra pure.
- 10 μl de substrat (AZURE B).
- 10 μl d' H_2O_2 afin de démarrer la réaction.

- ◆ Activité manganèse peroxydase: ($\varepsilon = 32000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Ce test utilise deux tampons d'incubation: un tampon A et un tampon B dont le détail est donné ci-dessous:

Tampon A:

- 10 mL de tampon lactate-succinate à pH 4,5
- 1 mL de DMAB
- 1 mL de MBTH
- 2 mL de MnSO_4
-

Tampon B:

- 10 mL de tampon lactate-succinate à pH 4,5
- 1 mL de DMAB
- 1 mL de MBTH
- 2 mL d'EDTA

Le tampon A permet de doser l'activité de toutes les peroxydases (y compris celle qui n'utilisent pas le manganèse comme cofacteur) tandis que le tampon B permet de doser uniquement les peroxydases sans manganèse. Ainsi en soustrayant les valeurs de B à celles de A on obtient l'activité des manganèses peroxydases uniquement.

Dans un puits déposer:

- 50 μl de culture fongique.
- 140 μl de tampon d'incubation A ou B.
- 10 μl d' H_2O_2 afin de démarrer la réaction.

❖ Mesure activité des échantillons

Pour LACCASE et MN PEROXYDASE

$$A = \varepsilon LC$$

A= absorbance (pente); ε = coeff d'extinction molaire; L = hauteur liquide traversé par le faisceau (0.6 pr 150 μ L et 0.8 pr 200 μ L); C= concentration (en M).

Pour LIGNINE PEROXIDASE

La concentration initiale en azure B est de 32 μ M, la valeur obtenue à t=0 est donc celle pour laquelle on a encore la totalité du substrat qui est présent. Il suffit donc de rapporter les valeurs obtenues ensuite à cette première valeur afin de quantifier la diminution d'absorbance et ainsi en déduire l'activité enzymatique résultante.