



HAL
open science

Biotransformations fongiques des xénobiotiques : du gène au sol

Christian Mougin

► **To cite this version:**

Christian Mougin. Biotransformations fongiques des xénobiotiques : du gène au sol. Sciences du Vivant [q-bio]. 2001. tel-02825562

HAL Id: tel-02825562

<https://hal.inrae.fr/tel-02825562>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE PROVENCE

Mémoire présenté pour l'obtention du Diplôme National
d'Habilitation à Diriger les Recherches

par

Christian Mougin

Chargé de Recherche
Institut National de la Recherche Agronomique

Soutenu le 9 avril 2001 devant la commission d'examen :

Mr. Jean-Claude Sigoillot, Professeur
Mr. Jean-Pierre Belaich, Professeur
Mr. Jean-Claude Bertrand, Professeur
Mr. Jean-Baptiste Bergé, Directeur de recherche
Mr. Marcel Asther, Directeur de recherche

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

Remerciements

Je suis reconnaissant à Messieurs Jean-Claude Sigoillot, Jean-Pierre Belaich, Jean-Claude Bertrand, Jean-Baptiste Bergé et Marcel Asther d'avoir bien voulu accepter d'être membres du jury de cette habilitation à diriger les recherches et de lire ce mémoire.

Je remercie également toutes les personnes qui ont fait bénéficier le manuscrit de leurs remarques et suggestions.

Sommaire

I.	CURRICULUM VITAE	1
II.	TRANSFERT DE CONNAISSANCES	4
	A. Encadrement de travaux de recherche	4
	B. Activités d'enseignement et de formation	6
	C. Liste des publications	
III.	ACTIVITES DE RECHERCHE	15
	A. Introduction	15
	B. Recherches fondamentales	19
	1. Acquisition des outils nécessaires à l'étude des réactions de biotransformation des xénobiotiques	19
	2. Transformation des xénobiotiques dans les sols	25
	3. Etude de la transformation des xénobiotiques par des organismes entiers : le cas des champignons filamenteux	31
	4. Etude de la transformation des xénobiotiques par des fractions cellulaires	34
	5. Etude de la transformation des xénobiotiques par des systèmes enzymatiques purifiés	39
	6. Optimisation de l'activité des enzymes de biotransformation	43
	C. Recherches appliquées	45
	1. Biodépollution des sols industriels et des eaux	45
	2. Etude des effets non intentionnels des xénobiotiques sur des organismes non cibles	48
	3. Utilisation des systèmes enzymatiques fongiques en synthèse organique	51
IV.	REFLEXIONS SUR LES ACTIVITES DE RECHERCHE ET PERSPECTIVES	55
V.	BIBLIOGRAPHIE	59

1. CURRICULUM VITAE

ETAT CIVIL

MOUGIN Christian

Né le 4 mai 1962 à Saint Germain en Laye, 39 ans

Nationalité : française

Situation familiale : marié, 1 enfant

Adresse personnelle : 13, rue du 11 Novembre, 78550 HOUDAN

Adresse professionnelle : Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques

Route de Saint-Cyr, 78026 VERSAILLES Cedex

Tél : 01-30-83-31-02 ; Fax : 01-30-83-31-19

email : mougins@versailles.inra.fr

Service militaire effectué en 1985-1986

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

1991/1992 : Responsable du secteur environnement, laboratoire CRECALE, Besançon

Depuis 1992 : Chargé de Recherche en Phytopharmacie, INRA, Centre de Versailles

ETUDES ET DIPLOMES

UFR des Sciences et Techniques, Université de Franche-Comté, Besançon

1983 : DEUG B, option Biologie

1984 : Licence de Biologie des Organismes et des Populations

1985 : Maîtrise de Biologie des Organismes et des Populations, option Ecologie et Productions naturelles

Institut National Polytechnique, Toulouse

1987 : Diplôme d'Etudes Approfondies en Agrochimie

1990 : Doctorat en Agrochimie

STAGES DE RECHERCHE

1986/1987 : Stage de DEA, Laboratoire d'Agrochimie, ENSA-INP de Toulouse (responsable Pr J. Calmon) : Synthèse de nouvelles molécules à activité herbicide et étude de leur dégradation.

1987 : Stage de DEA, Institut du Génie de l'Environnement, EPF de Lausanne (responsable Pr J. Tarradellas) : Etude de l'impact écotoxicologique de micropolluants organiques en milieu terrestre.

1987/1990 : Thèse d'Université, Laboratoire des Herbicides, INRA de Dijon (responsable Dr R. Scalla) : Métabolisme oxydatif du chlortoluron chez des cultures de blé *in vitro* : intervention de monooxygénases à cytochrome P-450.

1991 : Stage post-doctoral, Laboratoire des Herbicides, INRA de Dijon (responsable Dr M.-F. Corio-Costet) : Métabolisme du fenpropimorphe dans des microsomes de blé. Effets du fongicide sur la croissance des plantes et sur leurs profils stéroliques.

FORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Gestion de la qualité dans les laboratoires d'essais microbiologiques et chimiques

1991/1992 : Plusieurs journées organisées par différents ministères et réseaux de laboratoires.

1993 : INRA
Assurance qualité dans les laboratoires et les stations d'essais.

1994 : INRA
Formation des responsables d'équipes et de services à l'assurance de la qualité.

Informatique, techniques de laboratoire

1992/1998 : INRA
Plusieurs stages de formation à l'utilisation des réseaux informatiques et des différents outils disponibles sur ces réseaux.

1993 : Société Varian
Utilisation du logiciel d'acquisition de données chromatographiques Star.

1993 : INRA
Initiation à la spectrométrie de masse en technologie ion-trap.

1999 : Université Paris VI
Biologie moléculaire.

Prévention, santé et sécurité

1998 : INRA et Mutualité Sociale Agricole
Sauveteur Secouriste du Travail.

1999 : SGS Qualitest
Personne Compétente en Radioprotection, option sources non scellées.

1999 : INRA
Garant pour l'analyse et le suivi des accidents et incidents.

1999 : INRA
Evaluation semi-quantitative du risque d'exposition aux produits chimiques.

Ecoles-chercheur

1999 : INRA
Ecotoxicologie.

2000 : INRA
Du risque en général à l'évaluation du risque écotoxicologique en particulier.

SOCIETES SAVANTES

Membre de plusieurs groupes de travail et réseaux:

- Groupe Français des Pesticides (jusqu'en 1998)
- ANPP, commission Biocénoses et Environnement (jusqu'en 1996)
- COST 66 Fate of pesticides in the soil and the environment (jusqu'en 1998)
- COST 831 Biotechnology of soil: monitoring, conservation and remediation
- Club CRIN Environnement groupe sols (jusqu'en 1996)
- Réseau International P450, Université U.T. Southwestern de Dallas
- Réseau Santé Déchets, Université Claude Bernard Lyon 1
- Groupe de Discussion Bioremediation, GZA GeoEnvironmental Inc
- Réseau franco latino-américain BIAS (biodépollution de l'air et des sols)

II. TRANSFERT DE CONNAISSANCES

A. Encadrement de travaux de recherche

1. Thèses

Péridaud C. 1995. Biodépollution des sols : exemple de la dégradation du lindane par le champignon filamenteux *Phanerochaete chrysosporium*. Diplôme d'état de docteur en pharmacie, n° d'ordre 69/92, Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, Université Paris XI.

Laugero C. 1993-96. Etude de la biotransformation de composés xénobiotiques par le basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium*. Doctorat de Biologie Cellulaire et de Microbiologie de l'Université de Provence (Aix-Marseille I)(encadrement conjoint avec M. Asther).

Rama-Mercier R. 1995-98. Traitement par des champignons filamenteux de sols contaminés par des composés organiques persistants : application aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Doctorat de Biologie Cellulaire et de Microbiologie de l'Université de Provence (Aix-Marseille I)(encadrement conjoint avec J.-C. Sigoillot).

Mosleh Y. 2001-03. Ecodynamique et impact écotoxicologique des produits phytopharmaceutiques dans les écosystèmes terrestres. Faculté d'Agriculture de l'Université du Canal de Suez, Egypte (dossier en cours de constitution).

2. DEA

Péridaud C. 1994-95. Etude de la métabolisation du lindane par le champignon *Phanerochaete chrysosporium*. DEA de Toxicologie de l'Environnement, Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz.

Carlin-Sinclair A.-C. 1997. Mise au point des méthodes d'extraction pour l'étude de la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans différents types de sols. DEA Physico-chimie et qualité des bioproduits, INA Paris-Grignon.

Pojer K. 1998-99. Devenir du nonylphénol dans le sol. DEA de Toxicologie de l'Environnement, Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz.

3. Autres formations

Desfontaines T. 1994. Effets d'un inhibiteur et d'un inducteur de monooxygénases à cytochrome P450 sur le champignon *Phanerochaete chrysosporium* cultivé en milieu liquide. BTS de Biochimie, Ecole Nationale de Chimie Physique Biologie de Paris.

Brunet C. 1994. Contribution à la mise au point d'une méthode d'extraction de l'atrazine et de ses métabolites en phase supercritique - Etude de la biotransformation de cet herbicide par *Phanerochaete chrysosporium*. DUT de Génie de l'Environnement, IUT de Tours.

Saadé W. 1995. La biodégradation des pesticides : succès ou échec? Stage de deuxième année d'ingénieur, INA Paris-Grignon.

Carlin-Sinclair A.-C. 1995. Contribution à la mise au point d'une méthode d'extraction de la sulcotrione en phase supercritique. Maîtrise de Chimie, Université de Versailles Saint-Quentin-Yvelines.

Soulier C. 1995. Contribution à l'étude de la dégradation de pesticides par *Phanerochaete chrysosporium*. Tentative d'identification des systèmes enzymatiques impliqués. DUT de Génie de l'Environnement, IUT de Tours.

Aigreau D. 1995. Etude de l'extractibilité et de la dégradation de l'hydroxyatrazine sur un sol natif ou stérile en présence ou non du champignon *Phanerochaete chrysosporium*. DUT de Chimie, IUT d'Orsay.

Braunwald S. 1996. Contribution à la mise au point d'une méthode d'extraction d'un fongicide, le flutriafol, en phase supercritique. Maîtrise de Chimie, Université de Versailles Saint-Quentin-Yvelines.

Desmoucelle P. 1996. Effet d'une anilino-pyrimidine, le pyriméthanol, sur l'excrétion de la laccase chez *Botrytis cinerea* et *Trametes versicolor*. BTS de Biochimie, Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée de Paris.

Foultier B. 1996. Screening de champignons filamenteux pour la dégradation du phénanthrène et du benzo[a]pyrène en milieu liquide. MST de génie Biologique et Biochimique de l'Université Paris XII Créteil.

Péchon K. 1997. Contribution à l'étude de la biodépollution des sols contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques à l'aide de champignons filamenteux. DUT de Génie de l'Environnement, IUT de Tours.

Roubeyrie A. 1997. Contribution à l'étude de la dépollution des sols contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques à l'aide de champignons filamenteux. Stage de deuxième année d'ingénieur, Ecole de Biologie Industrielle de Cergy.

Hervet J. 1998. Contribution à l'étude de la biotransformation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques contenus dans des effluents liquides par des champignons filamenteux. Stage de 1^{ère} année de BTS de Biochimie, Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée de Paris.

Hervet J. 1999. Transformation de xénobiotiques par des laccases purifiées. Stage de 2^{ème} année de BTS de Biochimie, Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée de Paris.

Rabusseau F. 1999. Etude de la toxicité, de la dégradation et de la biodisponibilité dans le sol de l'ivermectine - Essais de bioconversion pour la synthèse de produits naturels. DUT de Génie de l'Environnement, IUT de Tours.

Champigny B. 2000. Etude cinétique de la dégradation des phénylurées hydroxylées chlorées par la laccase. MST Gestion de l'Environnement, Université d'Angers.

Snegaroff K. 2000. Biodégradabilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) solubilisées en phase micellaire. Stage de 1^{ère} année, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille.

Pommé L. 2001. Effet des polluants sur les systèmes enzymatiques fongiques. DUT de Génie de l'Environnement, IUT de Tours.

B. Activités d'enseignement et de formation

1. Séminaires et conférences

- 1990 : ETH de Zurich, invitation Pr N. Amrhein. Metabolism of chlorotoluron in wheat cells.
- 1991 : Rhône Poulenc Agrochimie, Lyon, invitation Dr C. Anding. Métabolisme du chlorotoluron chez des cultures cellulaires de blé.
- 1993 : IUP Gestion et génie de l'environnement, Université Paris VII. Transformation des pesticides dans l'environnement.
- 1994 : Rhône Poulenc Agrochimie et Industrialisation, invitation Dr Demozay. Biotransformation du lindane par les champignons filamenteux.
- 1997 : Laboratoire de Bioorganique et Biotechnologies, ENSC de Paris, invitation Pr F. le Goffic. Biotransformation fongique des xénobiotiques organiques.
- 1997 : Rhône Poulenc Agrochimie, invitation Dr J.-C. Thomas. Biotransformation fongique des xénobiotiques organiques.
- 1999 : DEA Sciences et Techniques de l'Environnement, Université Paris Val de Marne. Bio-remédiation des sols contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques.
- 2001 : 17th ISPAC Symposium, Cincinnati, short course. Bioremediation and phytoremediation of industrial PAH-polluted soils.

2. Enseignement

- 2000 : Cours sur la Biotransformation des polluants organiques dans l'environnement, DEA Altérations des systèmes biologiques : analyse des contraintes et gestion des risques, Université d'Angers (4 heures).
- 2001 : Cours sur les méthodes de dépollution des sols, DEA MAISE, Département de Génie Civil et Environnement, Ecole Normale Supérieure de Cachan (1 heure 30)

3. Organisation de formation

- 1995 : Formation de techniciens du Centre Technique du Bois et de l'Ameublement. Maîtrise de la culture de *Phanerochaete chrysosporium*, des protocoles d'étude de la dégradation de bois traités par des produits de protection, et des expériences de dépollution de sols contaminés.

4. Organisation de conférences et colloques

- 1996 : INRA Versailles, Dr L. Sohier, SGN. Procédés biologiques de traitement des sols pollués par des composés organiques.
- 1996 : ESIL Marseille, membre du comité d'organisation de l'association Science et Développement Marseille-Provence. Dépollution des sols.

C. Liste des publications

I - PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

I. 1. 1. Articles dans périodiques internationaux à comité de lecture

Mougin C., Cabanne F., Canivenc M.-C., Scalla R. 1990. Hydroxylation and N-demethylation of chlorotoluron by wheat microsomal enzymes. *Plant Sci.* 66:195-203.

Routaboul J.-M., **Mougin C.**, Ravanel P., Tissut M., Mrlina G., Calmon J.-P. 1991. Effects of *N,N'*-bis-(4-trifluoromethylphenyl)-urea on isolated plant mitochondria and thylakoids. *Phytochemistry* 30:733-738.

Mougin C., Polge N., Scalla R, Cabanne F. 1991. Interactions of various agrochemicals with cytochrome P-450-dependent monooxygenases of wheat cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 40:1-11.

Mougin C., Cabanne F. and Scalla R. 1992. Additionnal observations on the chlorotoluron hydroxylase and N-demethylase activities in wheat microsomes. *Plant Physiol. Biochem.* 30:769-778.

Mougin C., Laugero C., Asther M., Dubroca J., Frasse P., Asther M. 1994. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:705-708.

de Cruz I., Lacroix G., **Mougin C.**, Grolleau G. 1996. Residues of chlorinated pesticides in eggs of the gray heron (*Ardea cinerea L.*) : contribution of capillary gas chromatography ion-trap mass detection. *J. High Resol. Chromatogr.* 19:62-64.

Laugero C., Sigoillot J.-C., Moukha S., Frasse P., Bellon-Fontaine M.-N., Bonnarne P., **Mougin C.**, Asther M. 1996. Selective hyperproduction of manganese peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium* I-1512 immobilized on nylon net in a bubble-column reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:717-723.

Mougin C., Pericaud C., Malosse C., Laugero C., Asther M. 1996. Biotransformation of the insecticide lindane by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Pestic. Sci.* 47:51-59.

Mougin C., Dubroca J. and Barriuso E. 1996. On-line supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography for determination of triazine compounds in soil. *J. High Resol. Chromatogr.* 19:700-702.

Mougin C., Laugero C., Asther M. and Chaplain V. 1997. Biotransformation of *s*-triazine herbicides and related degradation products in liquid cultures by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Pestic. Sci.* 49:169-177.

Laugero C., **Mougin C.**, Sigoillot J.-C., Moukha S., Asther M. 1997. Comparison of static and agitated immobilized cultures of *Phanerochaete chrysosporium* for the degradation of pentachlorophenol and its metabolite pentachloroanisole. *Can. J. Microbiol.* 43:378-383.

Mougin C., Pericaud C., Dubroca J., Asther M. 1997. Enhanced mineralization of lindane in soils supplemented with the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biol. Biochem.* 29:1321-1324.

de Cruz I., **Mougin C.**, Grolleau G. 1997. Chlorinated hydrocarbons in eggs of grey heron (*Ardea cinerea L.*) in France (Lac de Grandlieu). *Chemosphere* 35:1003-1009.

Rama-Mercier R., **Mougin C.**, Sigoillot J.-C., Sohier L., Chaplain V. and Asther M. 1998. Wet sand cultures to screen filamentous fungi for the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnol. Tech.* 12:725-728.

Rama R., **Mougin C.**, Boyer F.-D., Kollmann A., Malosse C. and Sigoillot J.-C. 1998. Biotransformation of benzo[a]pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Biotechnol. Letters* 20:1101-1104.

Jolivalt C., Raynal A., Caminade E., Kokel B., Le Goffic F. and **Mougin C.** 1999. Transformation of N',N'-dimethyl-N-(hydroxyphenyl)ureas by laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:676-681.

Mougin C., Boyer F.-D., Caminade E. and Rama R., 2000. Cleavage of the diketone nitrile derivative of the herbicide isoxaflutole by extracellular fungal oxidases. *J. Agric. Food Chem.* 48:4529-4534.

Jolivalt C., Brenon S., Caminade E., **Mougin C.**, Pontié M. 2000. Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. *J. Membrane Sci.* 180:103-113.

Dur J.-C., Rama R., **Mougin C.** et Chaplain V. 2000. Use of surfactants to enhance the removal of PAHs from soil. *Polycycl. Aromat. Comp.* 20:143-154.

Rama R., Sigoillot J.-C., Chaplain V., Asther M. and **Mougin C.**, 2001. Inoculation of filamentous fungi in manufactured gas plant site soils and PAH transformation. *Polycycl. Aromat. Comp.* (18, sous presse).

I. 1. 2. Chapitres d'ouvrages scientifiques

Mougin C., Scalla R., Cabanne F. 1991. Occurrence of cytochrome P450 mono-oxygenases in the metabolism of chlorotoluron by wheat microsomes. *Dans* Herbicide Resistance in weeds and crops. Caseley J.C., Cussans G.W., Atkin R.K. eds., Butterworth Heinemann, pp. 458-459.

Rama R., **Mougin C.**, Malosse C., Chaplain V., Sigoillot J.-C. and Asther M. 2000. Biotransformation of PAHs by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Dans* Remediation of Hazardous Waste Contaminated soils, 2nd edition. Wise D.L., Trantolo D.J., Cichon E.J., Inyang H.I., Stottmeister U. eds., Dekker Marcel Inc., New York, Chapter 23, pp. 365-372, ISBN 0-8247-0333-2.

Mougin C.P., Corio-Costet, M.-F. and Werck-Reichhart, D. 2000. Plant and fungal cytochrome P450's: their role in pesticide transformation. *Dans* Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences. Hall C., Hoagland R. & Zablutowicz, R. eds, ACS Book n°777, Washington, Chapter 9, pp. 166-181, ISBN 0-8412-3704-2.

I. 1.3. Mémoires diplômants

Mougin C. 1987. Synthèse d'urée-carbamates substitués et des urées symétriques correspondantes. DEA en Agrochimie, Institut National Polytechnique de Toulouse.

Mougin C. 1987. Approche de l'impact écotoxicologique de certains micro-polluants organiques en milieu terrestre. DEA en Agrochimie, Institut National Polytechnique de Toulouse.

Mougin C. 1990. Métabolisme oxydatif du chlortoluron chez des cultures cellulaires de blé : intervention de monooxygénases à cytochrome P-450. Thèse de Doctorat en Agrochimie, n° d'ordre 395, Institut National Polytechnique de Toulouse.

I. 1. 4. Communications dans des congrès et symposiums nationaux et internationaux

Mougin C., Cabanne F., Scalla R. septembre 1989. Métabolisme du chlortoluron dans des microsomes de blé. II^{ème} forum des jeunes Chercheurs en Physiologie Végétale, Strasbourg (communication affichée).

Mougin C., Scalla R., Cabanne F. septembre 1989. Occurrence of cytochrome P-450 mono-oxygenases in the metabolism of chlorotoluron by wheat microsomes. 11th Long Ashton International Symposium, Bristol, Royaume Uni (communication affichée).

Mougin C., Scalla R., Cabanne F. avril 1990. Monooxygenases responsible for the metabolism of chlorotoluron in wheat microsomes. 6^{èmes} rencontres interdisciplinaires en Biochimie, La Londe les Maures (communication orale).

Cabanne F., **Mougin C.**, Scalla R. mai 1990. Les monooxygénases du blé responsables de la désactivation du chlorotoluron. Comptes rendus du XX^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides, Lepin le Lac, pp. 40-43 (communication orale et texte intégral).

Mougin C., Scalla R., Cabanne F. août 1990. Monooxygenases responsible for the metabolism of chlorotoluron in wheat microsomes. Seventh International Congress of Pesticide Chemistry, IUPAC, RFA (communication affichée).

Mougin C., Gonneau M., Canivenc M.-C., Polge N., Cabanne F. mai 1991. Monooxygénases du blé et de *Veronica persica* responsables du métabolisme du chlortoluron. Comptes rendus du XXI^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides, Nancy Brabois, pp. 319-323 (communication affichée et texte intégral).

Corio-Costet M.-F., **Mougin C.**, Benveniste P., Scalla R. mai 1991. Modulation des effets d'un fongicide, le fenpropimorphe dans des plants de blé, métabolisation *in vitro*. Comptes rendus du XXI^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides, Nancy Brabois, pp. 324-329 1991 (communication affichée et texte intégral).

Corio-Costet M.-F., **Mougin C.** mai 1992. Modulation des effets d'un fongicide, le fenpropimorphe, par l'anhydride naphthalique et l'aminobenzotriazole. Comptes rendus du XXII^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides, Dijon (communication affichée).

Mougin C. mai 1992. Cytochrome P-450 et métabolisme du chlortoluron. Monooxygénases à cytochrome P-450 chez les plantes, Colloques de la Société Française de Physiologie Végétale, Strasbourg (communication orale).

Scalla R., **Mougin C.** août 1992. The rôle of cytochrome P-450 monooxygenases in herbicide metabolism and selectivity in plants. 204th American Chemical Society National Meeting, Metabolic regulation of herbicide activity in plants, Boston, USA (communication orale sur invitation).

Mougin C., Laugero C., Delattre M., Dubroca J., Asther M., Frasse P., Asther M. mai 1993. Mise en évidence du schéma réactionnel de biotransformation de l'atrazine par le basidiomycète Mic 80. Comptes rendus du XXIII^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides, Lyon, pp. 236-238 (communication affichée et texte intégral).

Pericaud C., **Mougin C.**, Dubroca J., Asther M. mai 1994. Biotransformation du lindane par le champignon filamenteux *Phanerochaete chrysosporium*. Comptes rendus du XXIV^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides, Bordeaux, pp. 95-99 (communication affichée et texte intégral).

de Cruz I., Lacroix G., **Mougin C.**, Grolleau G. mai 1994. Chromatographie gazeuse avec détecteur de masse à technologie Ion-Trap : une technique sensible pour l'identification de pesticides organochlorés dans des œufs de héron cendré. Comptes rendus du XXIV^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides, Bordeaux, pp. 123-129 (communication affichée et texte intégral).

Mougin C., Asther M. juillet 1995. Biotransformation de pesticides par *Phanerochaete chrysosporium*. Congrès de génétique et biologie moléculaire des champignons filamenteux, Lyon (communication affichée).

Mougin C., Asther M. mai 1996. Biotransformation de composés xénobiotiques par les champignons filamenteux. Journée thématique Biodépollution des Sols, Science et Développement Marseille Provence, Luminy (communication orale).

Leroux P., Fritz R., **Mougin C.**, Gredt M., Lanen C. juin 1996. Characterization of strains of *Botrytis cinerea* resistant to anilinopyrimidine fungicides. XIth International Botrytis Symposium, Wageningen, Pays Bas (communication affichée).

Mougin C., Dubroca J., Asther M. juillet 1996. Biotransformation of pesticides in soils inoculated with the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Pesticides, soil microbiology and soil quality, 2nd international symposium on environmental aspects of pesticide microbiology, SETAC-EUROPE ed., Beaune, pp.174-185 (communication orale et texte intégral).

Chaplain V., Janex M.-L., Audebert R., **Mougin C.** septembre 1996. Influence of adsorbed polymers on the adhesion of particles on mineral surfaces. Second International Symposium ISMOM 96, Nancy (communication affichée).

Mougin C., Chaplain V. octobre 1996. Transformation of pesticides and other organic pollutants in the soil. COST 66: Fate of pesticides in the soil and the environment, working group Transformations. Bled, Slovénie (communication orale).

Sigoillot J.-C., Laugero C., **Mougin C.**, Rama-Mercier R., Sohier L., Chaplain V., Asther M. avril 1997. Metabolic potentialities of white rot fungi to degrade recalcitrant compounds in waste waters and polluted soils. Treatment of solid waste and wastewaters, 1st International conference, BayForrest ed., Narbonne, pp. 123-128 (communication orale et texte intégral).

Rama-Mercier R., **Mougin C.**, Malosse C., Sigoillot J.-C., Sohier L., Chaplain V. and Asther M. septembre 1997. Biotransformation of phenanthrene and benzo[a]pyrene by selected filamentous fungi grown on wet sand. ISEB'97 Meeting on Bioremediation, Leipzig, RFA (communication affichée).

Mougin C., Rama-Mercier R., Sigoillot J.-C., Sohier L., Asther M., Chaplain V. août 1998. Potential of filamentous fungi to degrade recalcitrant xenobiotics in polluted soils. 16th World Congress of Soil Science, Montpellier (communication affichée et texte intégral).

Mougin C. et Chaplain V. février 1999. Biotransformation fongique des xénobiotiques. Ecole INRA Ecotoxicologie, Evian (communication orale).

Mougin C. avril 1999. Biotransformation fongique des xénobiotiques. Rencontres des microbiologistes de l'INRA, Dourdan (communication orale).

Jolival C., Raynal A., Caminade E., Kokel B., Le Goffic F. and **Mougin C.** juillet 1999. Effect of the pH on the transformation of N,N'-dimethyl-N-(hydroxyphenyl)ureas by laccase from *Trametes versicolor*. 9th European Congress on Biotechnology, Bruxelles, Belgique (communication affichée et texte intégral).

Mougin C. août 1999. Plant and microbial cytochrome P450's: their role in pesticide transformation. 218th American Chemical Society National Meeting, Pesticide

biotransformation in plants and microorganisms: similarities and divergences, New Orleans, USA (communication orale sur invitation).

Dur J.C., Rama R., **Mougin C.** and Chaplain V. octobre 1999. Use of surfactants to enhance the removal of PAHs from soils. 17th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds, Bordeaux (communication affichée et texte intégral).

Dur J.C., Rama R., **Mougin C.** and Chaplain V. octobre 1999. Solubilization of soil-bound PAHs by mixtures of surfactant solutions. Biodépoll'99 : Biotechnology in environmental protection, Rennes (communication affichée).

Jolivalt C., Caminade E., **Mougin C.**, Pontié M. octobre 1999. Immobilisation of laccase from *Trametes versicolor* on a hydrophilic PVDF microfiltration membrane: caractérisation of the grafted support and application in the removal of a phenylurea pesticide. Biodépoll'99 : Biotechnology in environmental protection, Rennes (communication affichée).

Pojer K., Davoine P., Dubroca J., Dur J.-C., **Mougin C.**, Jolivalt C, Cravedi, J.-P. et Chaplain V. 1999. Behaviour and fate of nonylphenol in soils containing contaminated sewage sludge. Biodépoll'99 : Biotechnology in environmental protection, Rennes (communication affichée).

Sigoillot J.C., Rama-Mercier R., **Mougin C.**, Chaplain V., Asther M. 1999. Decontamination of polluted soils with white-rot fungi: aromatic hydrocarbons and chloride compounds. Biodépoll'99 : Biotechnology in environmental protection, Rennes (communication orale).

Mougin C., Jolivalt C., Chaplain V., Chapeland F., Fritz R., Leroux P. 2000. Etudes préliminaires pour caractériser des biomarqueurs chez les champignons filamenteux. XXX^{ème} Congrès du Groupe Français des Pesticides, Reims (communication affichée).

Kollmann A., **Mougin C.** et Ducrot P.-H. 2000. Vers une stratégie de bioconversion dans la recherche de nouveaux antitumoraux dérivés du Resvératrol. Congrès de la Société Française de Chimie, Rennes (communication affichée).

Jolivalt C., **Mougin C.**, Pontié M. 2000. Immobilisation of laccase from *Trametes versicolor* on a hydrophilic PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in the removal of a phenylurea pesticide in waste water. Euromembrane 2000 Congress, Jérusalem (communication affichée).

Dur J.-C., **Mougin C.** and Chaplain V. 2000. Biodegradation of PAHs by *Trametes versicolor* in the presence of tween 80. 1^{ères} Journées Françaises de Chimie Environnementale, Nancy (communication orale).

Mougin C. septembre 2001. Bioremediation and phytoremediation of industrial PAH-polluted soils. 17th ISPAC Symposium, Cincinnati, USA (short course sur invitation).

II - DOCUMENTS A VOCATION DE TRANSFERT

II. 1.1. Travaux personnels dans périodique à comité de lecture

Mougin C., Chaplain V., Rama-Mercier R., Sohier L., Sigoillot J.-C. et Asther M. 1996. Utilisation de champignons filamenteux pour la dépollution de sols pollués par des polluants organiques. *Déchets - Sciences et Techniques* 4:20-22.

Sigoillot J.-C., **Mougin C.**, Rama-Mercier R. 1997. Des champignons pour réhabiliter les sols pollués. *Biofutur* 170:34-36.

Mougin C. 2001. Biodépollution de sols industriels contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Dans* Du milieu naturel à la ville : vers une gestion durable du péri-urbain. Tassin B. et Thévenot D. eds, Presses des Ponts et Chaussées, Paris, pp. 111-117, ISBN 2-85978-338-5.

Mougin C., Jolival C., Ducrot P.-H. 2001. Des champignons dont les systèmes enzymatiques peuvent métaboliser les xénobiotiques, *INRA mensuel n°109* (sous presse).

II. 1.2. Travaux personnels dans périodique sans comité de lecture

Mougin C. 1996. Des champignons au service de l'environnement. *Ça m'intéresse* N° 185, p. 42.

Mougin C., Chaplain V., Gaillardon P., Sohier L., Mercier R., Sigoillot J.-C., Laugero C., Asther M. 1996. Le traitement biologique des sols pollués par des composés organiques : l'intérêt des champignons filamenteux. *Le Courrier de l'Environnement de l'INRA* 28:49-56.

II. 1.3. Proceedings de congrès, colloques et salons professionnels

Participation au congrès du Groupe d'Ecologie Microbienne du Sol de la Société Française de Microbiologie, Décembre 1993, Dijon.

Mougin C., Asther M. octobre 1995. Utilisation de champignons pour la dépollution de sols contaminés par des micropolluants organiques. Salon Pollutec 95, Paris (communication affichée).

Participation à l'Atelier International sur les Techniques de Décontamination et de Réhabilitation des Sols pollués par des produits chimiques. Interchimie 95 et Nations Unies, décembre 1995, Paris.

Asther M., **Mougin C.** octobre 1996. Des champignons filamenteux éliminent les polluants organiques des sols et des eaux. Salon SIAL 96, Paris (fiche d'information).

Mougin C., Sigoillot J.-C., Sohier L. octobre 1996. Les champignons filamenteux, outils de réhabilitation des sols et de traitement d'effluents industriels pollués par des composés aromatiques récalcitrants. Salon Pollutec 96, Lyon (fiche d'information).

Rama R., **Mougin C.**, Sigoillot J.-C. octobre 1997. Mise en œuvre d'un traitement biologique pollués par des HAPs impliquant des champignons filamenteux. Salon Pollutec 97, Paris (communication affichée).

Mougin C., Sigoillot J.-C., Sohier L. octobre 1997. Les champignons filamenteux, outils de réhabilitation des sols et de traitement d'effluents industriels pollués par des composés aromatiques récalcitrants. Salon Pollutec 97, Paris (fiche d'information).

Mougin C. et Asther M. mars 1998. Des champignons filamenteux éliminent les polluants aromatiques des sols et des eaux. Salon International de l'Agriculture, Paris (fiche d'information).

Calleja C., Alvinerie M., Delatour P., Fournier J.-C., Galtier P., Kerboeuf D., Lumaret J.-P. et **Mougin C.** février 1999. Evaluation de l'impact écotoxicologique résultant de l'usage d'antiparasitaires endectocides en élevage extensif de ruminants : résultats préliminaires et attendus. Ecole INRA Ecotoxicologie, Evian (communication orale).

Mougin C., Rama-Mercier R., Sigoillot J.-C., Sohier L., Asther M. and Chaplain V. février 1999. Potential of filamentous fungi to degrade PAHs in industrial polluted soils. Ecole INRA Ecotoxicologie, Evian (communication affichée).

Chaplain V. et **Mougin C.** février 1999. Disponibilité des xénobiotiques organiques dans les sols . Ecole INRA Ecotoxicologie, Evian (communication orale).

Rama R., Sigoillot J.-C., Asther M., Chaplain V. et **Mougin C.** avril 1999. Aptitude des champignons filamenteux à dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les sols pollués. Atelier International sur l'Analyse, les Méthodologies de Traitement et la Réhabilitation des Sols pollués, Interchimie 99 et Nations Unies, Paris (communication affichée).

Participation à l'atelier international sur l'analyse, les méthodologies de traitement et la réhabilitation des sols et eaux souterraines pollués. Interchimie 2001 et Nations Unies, mars 2001, Paris.

II. 1.4. Rapports écrits

Mougin C. 1993. Conséquences de l'utilisation généralisée de plantes transgéniques résistantes aux herbicides : impact des herbicides sur les champignons du sol. Rapport demandé par le groupe de travail Herbicides de l'association Chimie et Ecologie.

D. Expertise

Depuis 1992 : Lecteur d'articles pour les revues : Pesticide Science, Pesticide Biochemistry and Physiology, Soil Biology and Biochemistry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Polycyclic Aromatic Compounds.

Depuis 1999 : Expert pour le Bulletin Info Santé Déchets.

III. ACTIVITES DE RECHERCHE

A. INTRODUCTION

Les activités de recherche que je développe depuis 1987 sont axées sur l'étude des **réactions de biotransformation des xénobiotiques** mises en œuvre par les microorganismes et les végétaux supérieurs.

Les xénobiotiques sont des substances étrangères à l'organisme ou qui ne semblent pas (dans l'état actuel de nos connaissances) indispensables à son fonctionnement normal (Sipes et Gandolfi, 1991). Cette définition, assez large, englobe non seulement les **composés chimiques d'origine anthropique**, générés pour les besoins de l'agriculture, de l'industrie et des collectivités locales, mais aussi certaines **substances naturellement produites** par les microorganismes et les végétaux. De part leur usage intensif dans des conditions normales d'utilisation ou à la suite d'événements accidentels, les xénobiotiques sont relargués dans **l'environnement** où ils deviennent détectables en quantité anormalement importante et peuvent occasionner des effets néfastes sur un certain nombre d'organismes.

L'**environnement** se définit ici comme l'ensemble des **milieux abiotiques** (sol, eau air), des **éléments vivants** (microorganismes, faune et flore sauvages) qui les peuplent, ainsi que toute **interrelation** entre ces divers éléments et toute **relation** existant entre eux et tout organisme vivant.

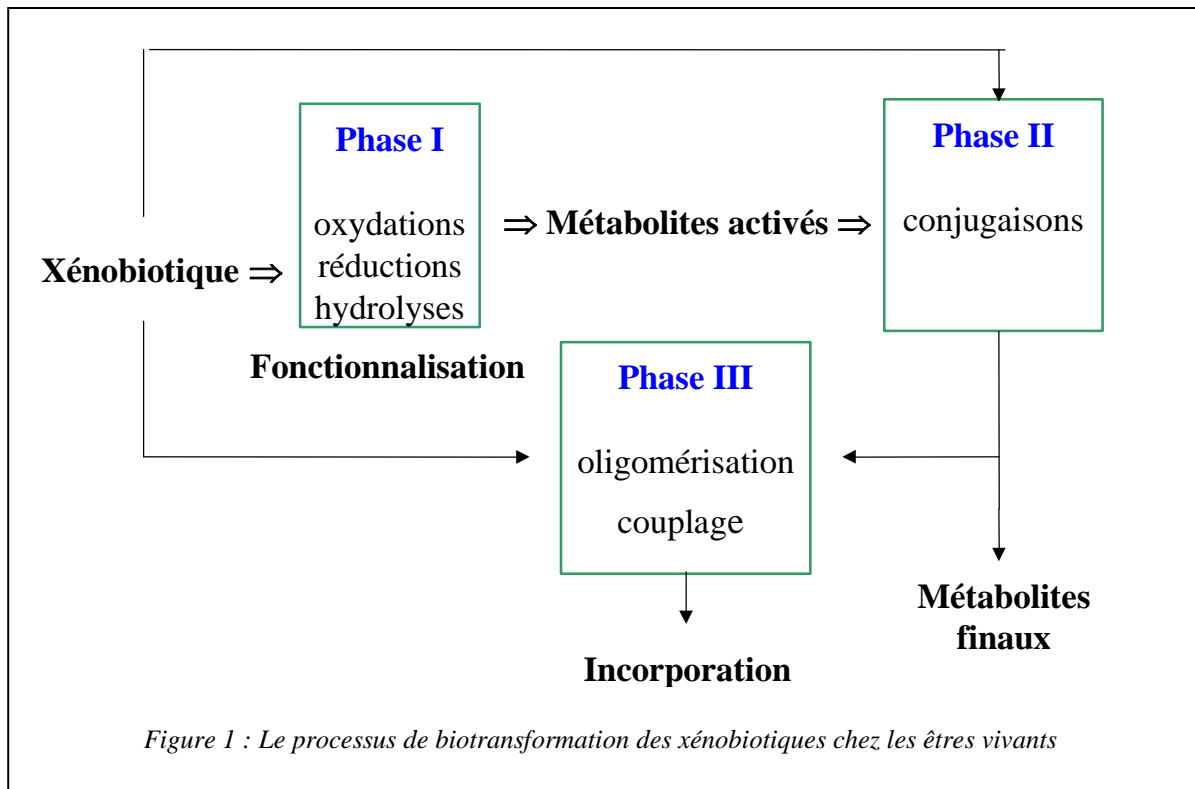
Les réactions de biotransformation comprennent l'ensemble des réactions d'origine biologique qui pour fonction de transformer la structure chimique de composés avec lesquels les êtres vivants entrent en contact. Elles font partie des réactions de défense mises en œuvre à l'égard de stressseurs exogènes, et contribuent à en diminuer les effets biologiques, le plus souvent toxiques.

Un premier groupe de réactions conduit à la simplification de la structure chimique de la molécule mère. Il comprend les réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse qui forment des métabolites polaires dotés de fonctions réactives (hydroxyles, amines...) . Ces réactions de fonctionnalisation sont classiquement regroupées sous le terme générique de réactions de phase I (Figure 1). Les métabolites peuvent soit s'accumuler dans le cas de dégradation incomplète, soit conduire, lors des schémas de dégradation plus ou moins complexes, à la formation de dioxyde de carbone.

Le plus souvent, ces métabolites activés sont les substrats des réactions de phase II ou de conjugaison, qui les lient de façon covalente à une molécule hydrophile (sucre, acide aminé, peptide,...). Le résultat est un composé hydrosoluble éliminé dans les urines ou stocké par exemple dans les vacuoles des végétaux supérieurs.

Enfin, d'autres réactions rendent également plus complexe la structure de la molécule mère. Ce sont les réactions d'oligomérisation ou de couplage de plusieurs unités du même composé selon un motif répétitif ou irrégulier pour former des oligomères insolubles dans l'eau (phase

III). D'autre part, ces réactions de couplage contribuent aussi à l'incorporation du xénobiotique ou de ses métabolites primaires dans des composés cellulaires (protéines, parois,...) ou des matières organo-minérales des sols.



Les conséquences de l'existence des réactions de biotransformation sont considérables dans le domaine de l'environnement comme en agronomie.

- Les xénobiotiques présentent des propriétés physico-chimiques extrêmement variées. Ces propriétés conditionnent leur biodisponibilité, leur mobilité, leur dégradabilité et leur persistance, donc leur écodynamique dans l'environnement. Il en résulte parfois une accumulation dans les tissus animaux et végétaux tout au long des chaînes alimentaires. D'autre part, certains xénobiotiques présentent une toxicité intrinsèque reconnue à plus ou moins long terme pour des organismes qui y sont exposés, qu'ils soient des organismes cibles ou non-cibles.
- Les réactions de biotransformation convertissent les xénobiotiques en de nombreux produits de transformation qui présentent également leurs propres propriétés physico-chimiques, des devenir particuliers, ainsi que des effets biologiques nouveaux.

Les conséquences des réactions de biotransformation sont multiples à la fois sur :

- la concentration de la molécule mère dans l'environnement (milieux physiques et organismes vivants),
- la durée de sa présence,

- son activité biologique : le plus souvent, les réactions de biotransformation sont synonymes de détoxification, mais elles peuvent parfois générer des produits plus toxiques que le composé parent.

- Enfin, les xénobiotiques ou leurs produits de transformation peuvent inhiber ou stimuler les systèmes enzymatiques responsables de leur propre transformation, mais aussi des systèmes intervenant dans la biosynthèse de nombreux produits du métabolisme cellulaire. Par exemple, de telles interactions entraînent alors des changements de saveur, de digestibilité ou l'accumulation de composés doués de propriétés pharmacodynamiques (phénols, terpènes...) chez les végétaux supérieurs.

Mon programme de recherche s'inscrit dans le cadre général de **l'écotoxicologie en milieu terrestre**, qui se définit comme l'étude du devenir des polluants et de leurs effets sur l'environnement de l'homme. Pluridisciplinaire, incluant notamment microbiologie, biochimie et chimie, il découle de ma formation initiale de **biologiste**, complétée lors de mon DEA par deux stages de **chimie**. Il a été rendu possible d'une part par la complémentarité des compétences existant au sein de notre équipe, Xénobiotiques et Environnement, et d'autre part par la synergie de moyens en matériels existant au sein du centre INRA de Versailles-Grignon, en particulier à l'Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques. En outre, depuis 1992, une étroite collaboration s'est instaurée avec mes collègues de l'Unité de Biotechnologie des Champignons Filamenteux de l'INRA à Marseille-Luminy. Ce programme a permis d'établir de nombreux autres partenariats avec des laboratoires à l'intérieur et à l'extérieur de l'Institut.

La plupart des thèmes développés dans mon programme ont reçu le soutien financier de l'INRA (AIPs Pesticides, Ecopol, Ecotox et Agrede, Départements de Phytopharmacie et Santé des Plantes et Environnement, Direction générale : soutien Jeune Equipe), de l'ADEME ainsi que du Ministère de l'Environnement (programme PNETOX). Enfin, des contrats de recherche ont été signés avec plusieurs organismes, notamment le Centre technique du Bois et de l'Ameublement, les sociétés Krebs et Rhône-Poulenc Agrochimie.

Sur le plan fondamental, mes recherches combinent une approche **descriptive** du devenir des xénobiotiques dans l'environnement et une approche **explicative** des mécanismes impliqués dans les réactions de biotransformation qu'ils subissent. Ces approches se déclinent autour d'axes thématiques correspondant à des modèles de niveaux d'organisation plus ou moins complexes : des sols (microflore endogène des sols), des souches pures de champignons filamenteux, des fractions cellulaires, des enzymes purifiées. Parmi les nombreux xénobiotiques considérés, je me suis particulièrement focalisé sur des composés modèles susceptibles d'être **présents en grande quantité** dans l'environnement, souvent **persistants** ou doués de propriétés **toxiques** reconnues. Ce sont principalement des pesticides (atrazine, lindane, phénylurées) et des polluants industriels (hydrocarbures aromatiques polycycliques : HAP) (Figure 2).

Des projets pluridisciplinaires émergents ont également suscité mon intérêt pour d'autres polluants présentant également un caractère avéré de disrupteur endocrinien (détergents : alkylphénols), ainsi que des produits à usage vétérinaire (antiparasitaires : ivermectine). Ces études, en adéquation avec le programme de recherche de V. Chaplain, ont pour objectif de fournir des informations visant à apprécier l'**exposition** des organismes aux xénobiotiques. Notre démarche scientifique commune apporte à des problématiques environnementales des réponses associant les apports conjoints de la physicochimie et de la biologie.

Mes recherches concernent aussi l'évaluation des **effets** de ces xénobiotiques sur des organismes de l'écosystème terrestre que sont les champignons filamenteux. De ce fait, elles participent à l'**évaluation du risque écotoxicologique** associé à l'introduction des xénobiotiques dans l'environnement.

Les recherches appliquées, quant-à-elles, permettent de valoriser les connaissances acquises sur les microorganismes et les systèmes enzymatiques de biotransformation dans trois domaines principaux : la biodépollution des sols, la mise au point de biomarqueurs ou d'indicateurs de la qualité des sols, la synthèse organique.

B. RECHERCHES FONDAMENTALES

B.1. ACQUISITION DES OUTILS NECESSAIRES A L'ETUDE DES REACTIONS DE BIOTRANSFORMATION DES XENOBIOTIQUES

Problématique - Pour mener à bien l'ensemble des études décrites dans ce mémoire, j'ai été amené à développer ou à adapter un certain nombre d'outils pour :

- évaluer les capacités dégradantes des micro-organismes,
- inoculer des micro-organismes dans les sols,
- mesurer leur croissance et leur activité métabolique,
- augmenter la biodisponibilité des xénobiotiques pour les organismes dégradants,
- synthétiser des composés organiques non disponibles dans le commerce,
- analyser les teneurs résiduelles des xénobiotiques et de leurs produits de transformation dans des matrices complexes.

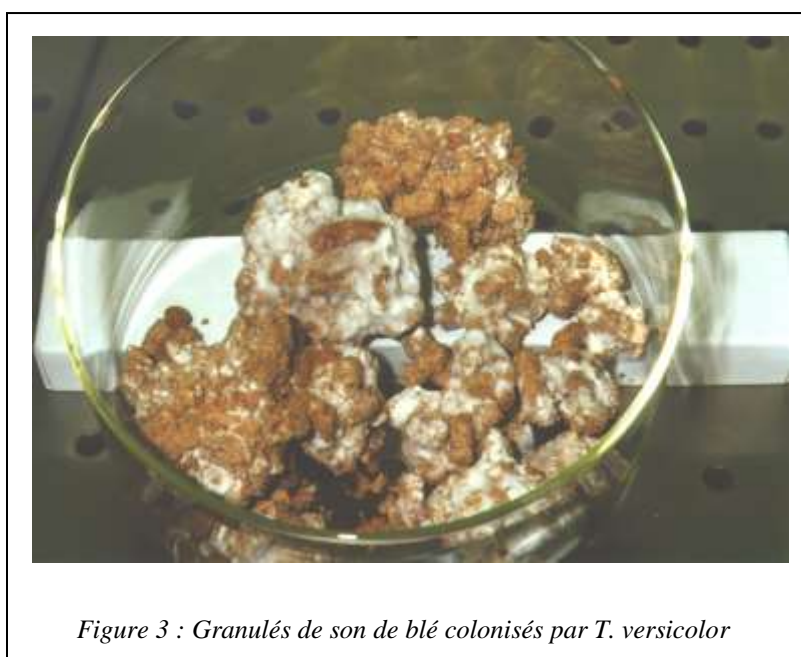
Evaluation des capacités de dégradation de champignons filamenteux

En règle générale, les capacités dégradantes des micro-organismes sont évaluées dans des tests conduits avec des souches pures en cultures liquides, souvent en conditions agitées. Pour les organismes terrestres que sont les champignons filamenteux, ces conditions ne sont pas

idéales car elles ne reflètent pas leur habitat naturel. J'ai donc été amené à développer un système de criblage original sur sable humide imprégné de milieu nutritif, qui figure les 3 compartiments du sol : solide, liquide et gazeux. Utilisé en présence d'un mélange de HAPs, ce système a permis l'évaluation des capacités de dégradation de 15 souches de champignons filamenteux (appartenant aux zygo-, deutéro-, asco- et basidiomycètes), tout en minimisant la volatilisation des composés les plus volatils. D'autre part, la matrice, faiblement adsorbante, permet une analyse rapide et facilitée des produits résiduels et des métabolites (Rama-Mercier *et al.*, 1998a). Cependant, l'analyse de l'air atmosphérique des systèmes d'incubation par microextraction en phase solide et chromatographie gazeuse a montré une volatilisation partielle des HAP de faible poids moléculaire ainsi que celle de produits de transformation qui n'ont pu être identifiés (Rama *et al.*, 2000).

Inoculation des micro-organismes dans les sols

Pour les essais de bioaugmentation de sol (introduction d'organismes dégradants allochtones), les champignons filamenteux ont été retenus en raison de leur développement facile dans les sols, dès lors qu'ils sont introduits en biomasse suffisante (Rama *et al.*, 2000). Des supports d'inoculation sous forme de granulés déshydratés ont été fabriqués à base de sous-produits d'origine agricole : pulpe de betterave, luzerne, son et paille de blé, mais aussi de sciure et de copeaux de bois. Les granulés à base de son de blé (Figure 3) se sont montrés à la fois les plus efficaces pour permettre la croissance de *Cunninghamella elegans* (zygomycète), de *Trametes versicolor* et de *Phanerochaete chrysosporium* (basidiomycètes), les plus résistants lors des étapes de manipulation des supports colonisés, finalement les plus performants pour introduire de grandes quantités de biomasse fongique dans des sols agricoles et industriels non stériles.



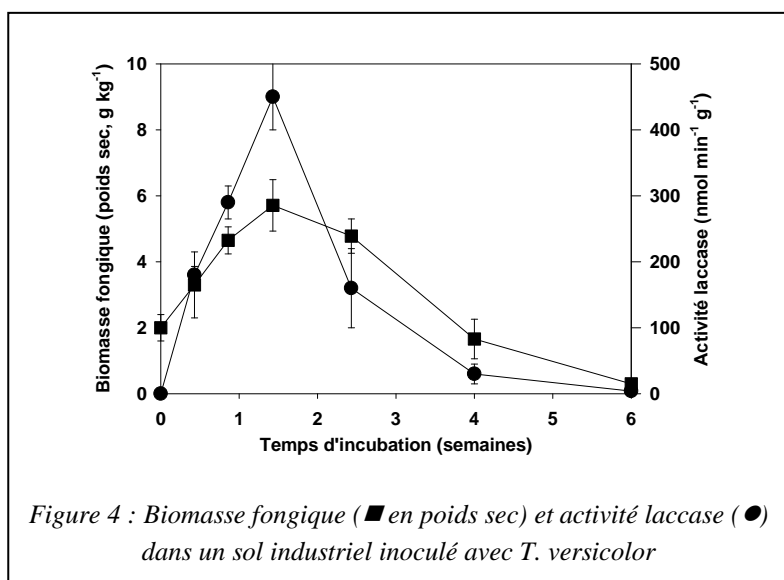
Lors de nos expériences, les supports se sont également montrés de bons agents foisonnants des sols (Rama *et al.*, 2001).

Mesure de la croissance et de l'activité métabolique des organismes introduits dans les sols

La croissance de la biomasse fongique dans des matrices complexes est classiquement évaluée par la mesure de l'ergostérol membranaire (Seitz *et al.*, 1977). Ce stérol est caractéristique des membranes fongiques. Les modifications que j'ai apportées à la méthode initiale permettent d'analyser l'intégralité d'un essai de laboratoire (30 g de sol sec) en utilisant des solvants moins toxiques en plus faible volume, et avec un protocole analytique plus sélectif. De ce fait, la méthode modifiée apparaît suffisamment sensible et reproductible pour nos besoins, et permet des analyses dans des sols agricoles comme dans des sols industriels fortement pollués. Les résultats obtenus montrent qu'après leur inoculation dans le sol, les champignons (*C. elegans*, *T. versicolor*, *P. chrysosporium*) se développent, puis la biomasse fongique décroît fortement après 4 à 6 semaines d'incubation. Des ajouts d'éléments nutritifs (carbone, azote, phosphore) pallient en partie à cette décroissance (Rama *et al.*, 2001).

Cependant, cette méthode souffre de quelques limites : elle n'est pas spécifique d'une souche donnée et quantifie alors l'ensemble de la biomasse fongique tellurique. Comme chaque souche possède son propre rapport ergostérol/biomasse, la détermination de la biomasse formée par un mélange de plusieurs souches inconnues est imprécise. Actuellement, des méthodes moléculaires sont développées par plusieurs laboratoires pour identifier et quantifier spécifiquement les souches. Mais elles ne sont disponibles que pour un nombre limité de souches fongiques et restent complexes à standardiser.

L'évaluation de l'activité métabolique d'un champignon est un autre paramètre à prendre en compte pour juger de son développement dans le sol. La production de systèmes enzymatiques comme les oxydases exocellulaires (laccases, peroxydases) pour les souches qui en produisent (pourritures blanches), en fournit une mesure pertinente (Rama *et al.*, 2001) (Figure 4).



Chez *T. versicolor*, l'activité des laccases produites apparaît corrélée avec la croissance du champignon.

Utilisation de surfactants pour augmenter la biodisponibilité de polluants hydrophobes dans les sols

Beaucoup de polluants organiques comme les HAPs présentent une très faible solubilité dans l'eau. Cette hydrophobicité génère de fortes interactions avec les sols, en particulier avec la matière organique. Cet état de fait handicape lourdement l'efficacité des transformations (Erikson *et al.*, 1993 ; Weissenfels *et al.*, 1992). Des surfactants peuvent alors être utilisés pour augmenter la solubilité des HAP dans l'eau et par voie de conséquence améliorer leur désorption du sol. Les HAP sont de bons candidats pour ce type d'études. Ce domaine constitue actuellement un des axes majeurs du programme scientifique développé par V. Chaplain, auquel je participe. Le programme comprend notamment les points suivants :

- *Etude de la solubilisation du benzo[a]pyrène en milieu liquide par différents surfactants* : anionique (Sodium Dodécyl Sulfate), cationique (Benzyl Dodecyl Dimethyl Ammonium : BDDA) et neutre (Triton X-100). On établit ainsi un classement des tensioactifs par ordre d'efficacité croissante : neutre < anionique < cationique, différent de celui généralement décrit dans la littérature, les neutres s'avérant d'habitude les plus efficaces.
- *Lavage de sols industriels avec des solutions de tensioactifs* dont le pouvoir de solubilisation des polluants organiques liés au sol vers une phase aqueuse sont importants. D'une manière générale, la solubilisation des 16 HAP augmente avec les concentrations en surfactants. Le BDDA solubilise partiellement les HAP à une concentration proche de sa concentration micellaire critique (CMC). Pour les autres surfactants (neutres ou cationiques), il faut des concentrations supérieures à 30 fois leur CMC pour observer un début de solubilisation. Le pouvoir de solubilisation des tensioactifs anioniques à partir du sol est nul (Dur *et al.*, 1999).
- *Etude des interactions entre les surfactants et la matrice sol*, en considérant le BDDA et le Triton X-100 seuls ou en mélange. Dans ce cas, les interactions sont mesurées en prenant en compte la concentration des surfactants dans la phase liquide et leur CMC effective dans les suspensions de sol. Le comportement des surfactants cationiques et neutres diffère dans le sol : le cationique s'adsorbe sur les constituants du sol et seule la fraction non adsorbée solubilise les HAP, le neutre se conduit comme un agent dispersant et déstructure le sol. En mélange, un effet antagoniste est observé entre les deux surfactants : l'adsorption du cationique dans le sol réduit la biodisponibilité des HAP pour le Triton X-100 (Dur *et al.*, 2000).
- *Etude des couplages lixiviation/transformation* des HAP dans les sols pollués. Ces travaux sont actuellement en cours.

Synthèse organique ou enzymatique de composés organiques

De nombreuses études nécessitent des composés organiques qui ne sont pas disponibles dans le commerce. J'ai donc été amené à en synthétiser un certain nombre en collaboration avec les collègues chimistes de l'Unité.

L'utilisation de ces composés est nécessaire à plusieurs niveaux :

- Etalons pour l'analyse chromatographique des fractions obtenues lors des expériences de biotransformation et pour confirmer des structures chimiques déterminées grâce aux techniques spectroscopiques : métabolites de pesticides.
- Composés intermédiaires : ils permettent de confirmer la succession des étapes dans un schéma métabolique présumé : cas de l'isoxaflutole.
- Substrats de systèmes enzymatiques ou d'organismes entiers : ce sont le plus souvent des molécules mères retenues comme modèles, ou des intermédiaires de dégradation qui doivent être synthétisés en quantité suffisante (plusieurs dizaines de mg) pour permettre le traitement de sols ou de cultures de microorganismes (phénylurées). Dans certains cas, ces substrats sont synthétisés à l'aide de précurseurs radiomarqués au [^{14}C].
- Composés utilisés pour des études de mode d'action : pesticides, urées symétriques (Routaboul *et al.*, 1991).

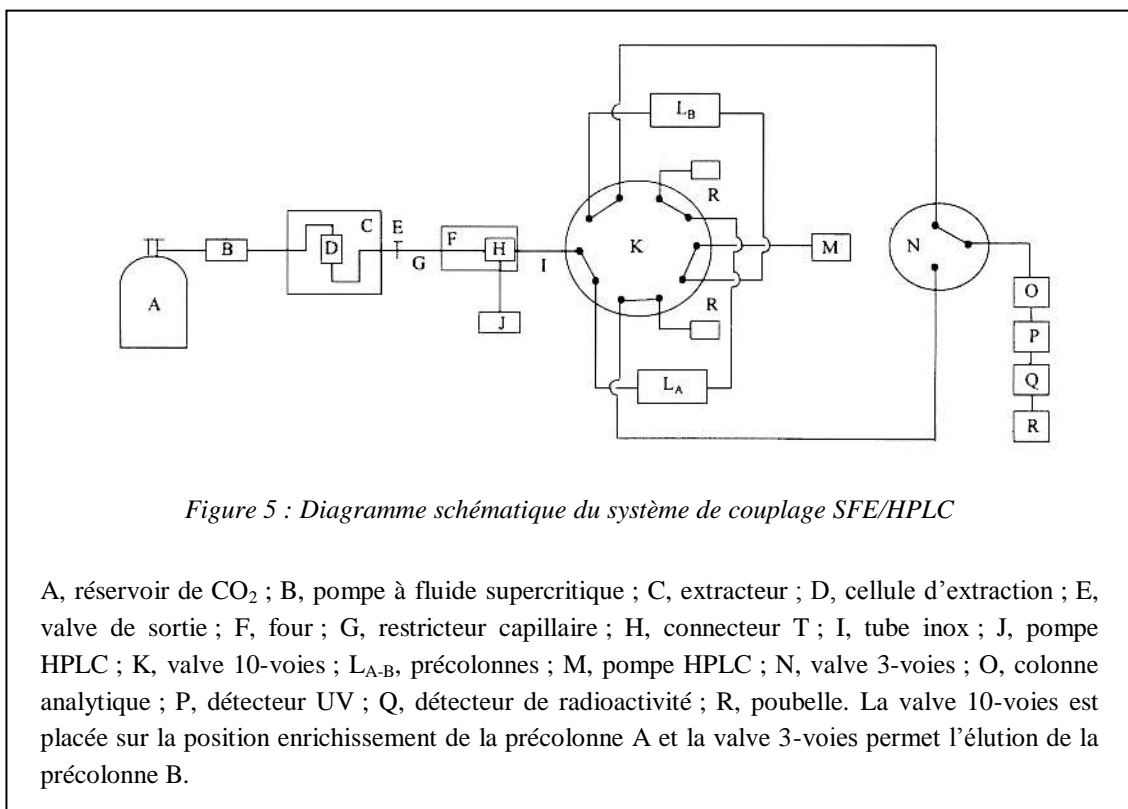
Ces synthèses font appel aux techniques classiques de la chimie organique, mais aussi à des incubations avec des systèmes enzymatiques purifiés. Les produits obtenus sont purifiés par chromatographie liquide et leurs structures vérifiées par techniques spectroscopiques (spectrométrie IR, spectrométrie de masse, RMN).

Analyse des teneurs résiduelles des xénobiotiques et de leurs produits de transformation dans des matrices complexes

Les études de dégradation de xénobiotiques dans des matrices complexes, comme celles visant à estimer la contamination des écosystèmes, nécessitent souvent l'adaptation ou la mise au point de techniques analytiques pour les molécules mères et/ou leurs métabolites, soit au niveau de l'extraction, soit au niveau de l'analyse chromatographique proprement dite. Par ailleurs, l'évolution continue des techniques implique d'évaluer les potentialités de méthodes ou d'appareillages nouveaux.

Classiquement, l'extraction des composés chimiques organiques à partir de matrices solides comme les sols s'effectue par Soxhlet (polluants industriels) ou par agitation mécanique à froid (pesticides), pendant une durée assez longue et en présence de grands volumes de solvants, avec des risques sur le plan de la sécurité et un coût financier élevé. L'extraction en phase supercritique (EPS) est apparue il y a plusieurs années comme une alternative rapide utilisant seulement quelques millilitres de solvants par échantillon, et de plus facilement automatisable (Stuart *et al.*, 1996). J'ai testé cette technique d'extraction sur plusieurs pesticides dans des sols agricoles. Afin de réduire davantage les manipulations, j'ai également développé une interface permettant le couplage EPS/HPLC/détection de radioactivité (Mougin *et al.*, 1996) (Figure 5).

Ce système permet d'extraire et d'analyser rapidement les xénobiotiques marqués au [^{14}C] dans les sols. Si l'EPS est séduisante sur une matrice de caractéristiques physico-chimiques constantes, elle nécessite cependant une phase de mise au point à chaque changement de matrice ou d'échantillon, car la méthode est très sensible à la préparation et à la granulométrie de ces derniers. L'EPS apparaît alors peu adaptée à l'analyse en routine de pesticides dans les sols.



L'analyse chromatographique est le second aspect que nous avons abordé. L'exemple retenu est l'analyse des pesticides organochlorés et des polychlorobiphényles présents dans des œufs d'oiseaux aquatiques provenant d'une réserve naturelle en Loire Atlantique. Cette étude rentre dans le cadre plus vaste de l'évaluation de la contamination d'organismes aquatiques par des composés organochlorés. Nous tenions également à évaluer la sensibilité d'une génération, récente à l'époque, de détecteurs de masse (trappe d'ions) *a priori* suffisamment sensibles pour une utilisation en analyse de résidus. Nous avons ainsi montré la complémentarité de la chromatographie gazeuse avec double détection (capture d'électrons et spectromètre de masse) pour le dosage et l'identification de résidus d'organochlorés dans les œufs, et ce avec une sensibilité suffisante de la seconde technique de détection. De plus, cette dernière permet de prouver sans ambiguïté l'identité de chaque composé en s'affranchissant des interférences (de Cruz *et al.*, 1996). Le *p,p'*-dichloro-dichloréthane et les polychlorobiphényles ont été retrouvés dans tous les œufs analysés aux concentrations de (500 et 1300 µg/kg), sans toutefois induire d'effets déprimeurs sur la reproduction des oiseaux (de Cruz *et al.*, 1997).

Nous possédons maintenant les divers outils nécessaires pour mener les études de biotransformation des xénobiotiques dans les sols, dans des cultures de micro-organismes, et par des systèmes enzymatiques isolés.

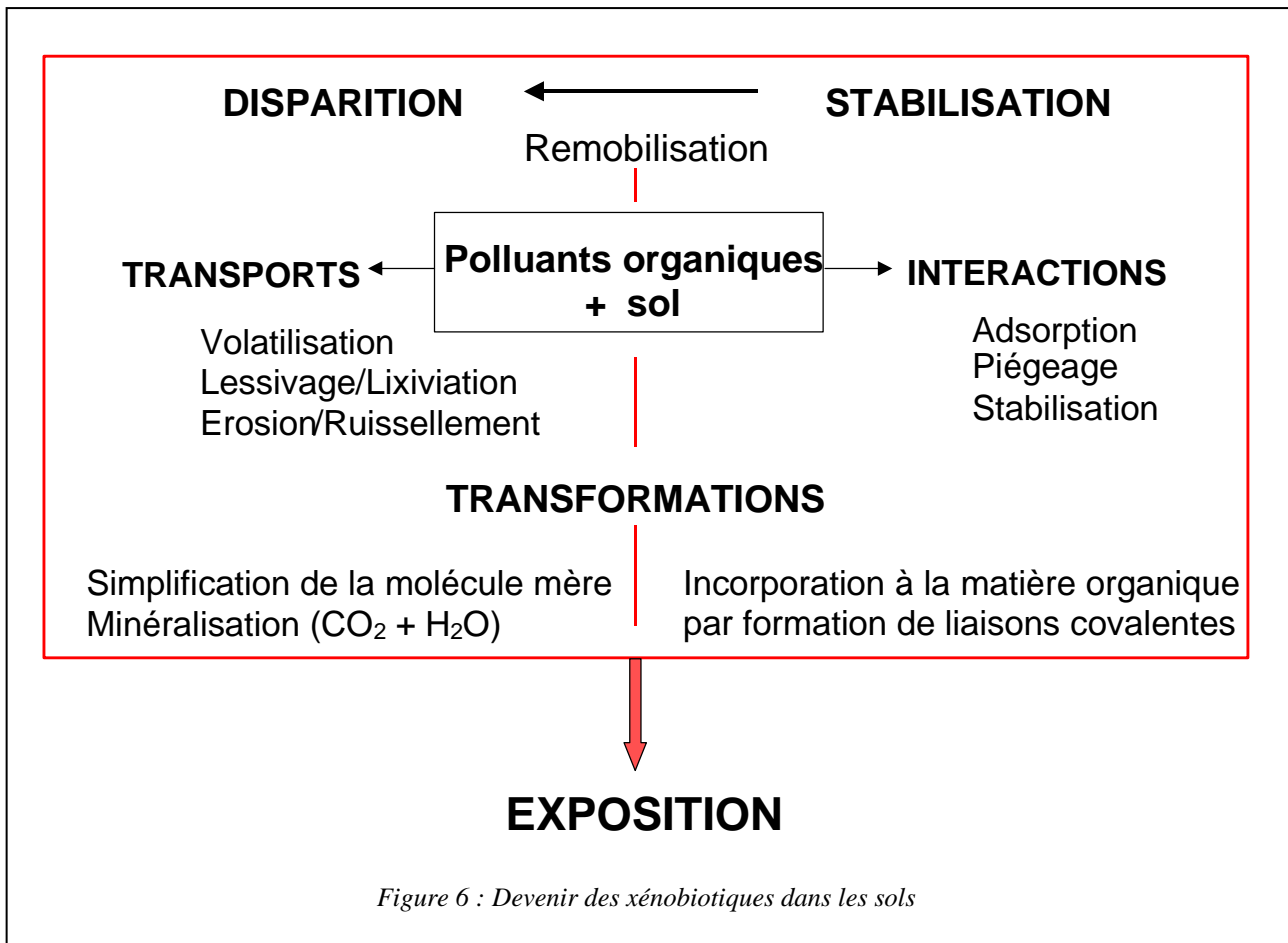
B.2. TRANSFORMATION DES XENOBIOTIQUES DANS LES SOLS

Selon un rapport de l'OCDE datant de 1993, il existe plus de 70 000 molécules de synthèse organique, et ce nombre augmente quotidiennement : on estime à 1000 le nombre de molécules nouvelles qui apparaissent sur le marché chaque année. Certaines d'entre elles (produits à usage pharmaceutique ou cosmétique, additifs alimentaires) n'ont *a priori* pas d'impact environnemental direct, mais beaucoup d'autres composés sont continuellement introduits dans l'environnement en grande quantité (pesticides, solvants, détergents, composés indésirables formés lors des processus industriels : HAP, dioxines...). Sauf dans le cas des produits utilisés en agriculture (produits phytosanitaires, médicaments vétérinaires), l'évaluation du devenir et de l'impact de ces polluants dans l'environnement n'est pas toujours effectuée avant leur mise sur le marché.

Le sol occupe une place prépondérante dans l'environnement, en tant que support physique des activités humaines et d'une partie des écosystèmes. Cette ressource non renouvelable, qui joue le rôle d'interface entre la lithosphère, l'hydrosphère et l'atmosphère, est la première contaminée. Les polluants sont introduits dans les sols agricoles, urbains ou péri-urbains par le biais de l'activité humaine (agriculture, collectivités locales et industrie) ou à la suite d'événements accidentels. Le sol devient alors un vecteur de pollution vers les autres milieux et les organismes vivants.

Le devenir des xénobiotiques dans les sols, qui conditionne l'exposition des organismes, est gouverné par des processus qui se répartissent en deux grandes catégories : **disparition et stabilisation**, qui conduisent tous deux à la dissipation apparente des composés (Figure 6).

- Les processus de **disparition** englobent les phénomènes de **transport** (volatilisation, lessivage, ruissellement...) et les réactions de **transformation** physico-chimiques ou biologiques (oxydation, réduction, hydrolyse), lorsque ces réactions conduisent à la **simplification de la structure** chimique de la molécule mère. Cette transformation peut aller jusqu'à une minéralisation complète de la molécule (biodégradation)(Bollag et Liu, 1990).
- Les processus de **stabilisation** comprennent d'une part les **interactions physico-chimiques** avec les constituants minéraux, organiques ou biologiques des sols qui conditionnent l'adsorption aux interfaces, le piégeage physique entre les feuillets d'argile ou dans des structures organiques colloïdales, la bioaccumulation dans des structures cellulaires. D'autre part, les réactions de **transformation** (couplage, oligomérisation), biologiques ou physico-chimiques, conduisent à **l'incorporation de la molécule** ou de métabolites, dans des matières organiques constitutives des sols ou des organismes vivants par formation de liaisons covalentes (Bollag et Liu, 1990).



Problématique - Les études classiques de transformation des pesticides dans les sols sont aujourd'hui majoritairement menées dans un contexte réglementaire à des fins d'homologation par les firmes phytosanitaires elles-mêmes. Cependant, des études ponctuelles restent indispensables pour évaluer le devenir, la transformation de certains composés, lorsqu'ils sont peu étudiés et que nous ne disposons que de données scientifiques limitées, lorsque les résultats des études sont la propriété des firmes qui ne les diffusent pas, lorsque qu'ils posent des problèmes spécifiques d'ordre agronomique ou environnemental.

Le but de ce type d'études est en général de déterminer le temps de demi-vie de xénobiotiques dans les sols, éventuellement d'en identifier les principaux métabolites. Les expériences, réalisées au laboratoire dans des conditions contrôlées parfois normalisées, doivent garantir une bonne activité de la microflore endogène du sol, principal facteur de transformation des polluants. On étudie également l'effet de l'introduction d'organismes dégradants dans les sols, pour synergiser l'activité de la microflore endogène.

1. Transformation des xénobiotiques dans les sols par la microflore autochtone

Un exemple d'étude dans un but de normalisation de protocoles : la biodégradation accélérée du carbofuran

J'ai participé de 1995 à 1998 à plusieurs tests de comparaison interlaboratoire (dans le cadre du réseau européen COST 66) portant sur la dégradation du carbofuran, un insecticide abondamment utilisé en traitement de sol. Les objectifs de cette campagne étaient d'établir un protocole expérimental simple appliqué à l'étude de la dégradation de pesticides dans les sols, permettant aux laboratoires de fournir des données valides.

Le carbofuran subit souvent au champ des mécanismes de biodégradation accélérée (Fournier, 1996). De ce fait, il perd toute efficacité sur le plan agronomique. Pour les expériences, le même sol est fourni à tous les participants, ainsi que la solution de carbofuran formulée. Le protocole (traitement, incubation, extraction, analyse) est fixé pour tous par rapport à des paramètres physico-chimiques du sol à déterminer par chacun des laboratoires. Les résultats collectés ont montré une grande dispersion des valeurs des paramètres mesurés. Dans ces conditions, la demi-vie du carbofuran varie de 5 (dégradation accélérée) à 84 jours, avec une valeur médiane à 20 jours. Il semble que le paramètre critique soit la mesure de la capacité de rétention du sol en eau, dont la détermination fait appel à des méthodes non normalisées. Ce paramètre capital détermine la teneur du sol en eau utilisée lors des incubations, à la base de l'activité des microorganismes et de la biodisponibilité du pesticide. La méthode de mesure de ce paramètre devrait donc faire l'objet d'une norme.

Ces études s'intègrent désormais dans le réseau européen EUROSOL dont un des objectifs majeurs est la standardisation des méthodes de détermination des paramètres physico-chimiques et biologiques des sols, des tests de dégradation et de toxicité des xénobiotiques.

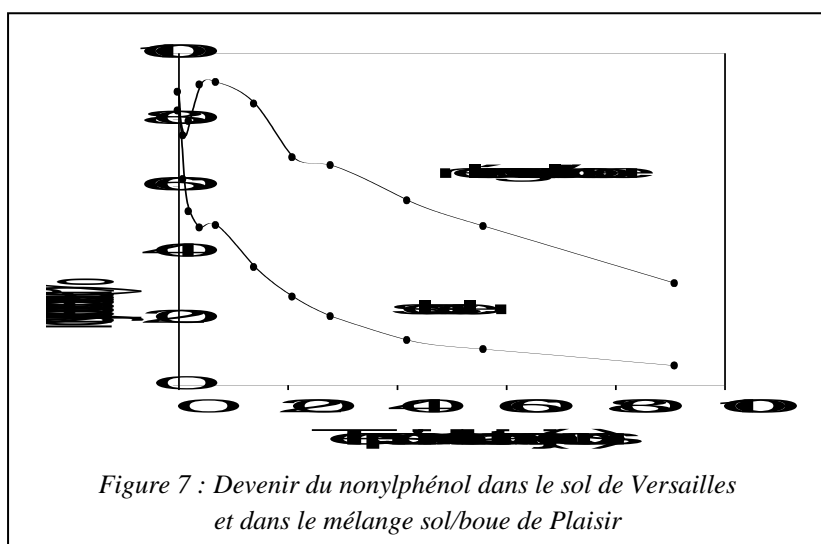
Un exemple de polluant apporté dans les sols lors de la valorisation agricole des déchets : les alkylphénols

Les alkylphénols polyéthoxylés sont des surfactants neutres entrant dans la composition de détergents ménagers et industriels. Les principaux représentants de cette catégorie de substances sont les nonylphénols polyéthoxylés qui subissent dans les stations d'épuration (STEP) plusieurs étapes de dégradation conduisant aux nonylphénols, un mélange d'isomères dont le composé majoritaire est le 4-*n*-nonylphénol (Figure 1). Ce composé est plus difficilement pris en charge par les micro-organismes des sols et des boues (Chaloux *et al.*, 1994). De ce fait, les boues d'épuration peuvent contenir des teneurs élevées en nonylphénol (>100 mg/kg). Dans un premier temps, ces concentrations n'ont pas alerté les hygiénistes et les toxicologues, compte tenu de la faible réactivité de ces composés. La découverte de leur estrogénicité, puis de leur action cancérogène chez l'homme (Arnold *et al.*, 1996 ; Soto *et al.*, 1991) a été à l'origine de nombreuses études visant à une meilleure évaluation du risque associé au nonylphénol. Les études ont dans un premier temps porté sur le devenir du nonylphénol dans le milieu aquatique, notamment chez les poissons (Thibaut *et al.*, 1998).

La valorisation des boues de STEP par épandage sur les sols agricoles soulève quelques interrogations. Un projet pluridisciplinaire a donc vu le jour à l'INRA dans le but d'étudier le

risque de transfert du nonylphénol et de ses principaux métabolites, des boues vers le sol, les végétaux et la chaîne alimentaire. Ma contribution à ce projet consiste à étudier le devenir du nonylphénol dans le sol (dégradation, disponibilité) et de mesurer l'incidence d'un amendement en boues de stations d'épuration sur le devenir de ce polluant.

Dans le sol de Versailles traité par 40 mg/kg de nonylphénol, le temps de demi-vie du composé est de 3 jours (Figure 7). Des échantillons de boues provenant de deux STEP différentes (Plaisir et Bordeaux, contenant du nonylphénol à des teneurs supérieures à 100 mg/kg) ont été mélangés au sol. Dans le sol amendé par la boue de Plaisir, le temps de demi-vie du nonylphénol est de 50 jours. Les expériences sont en cours avec le sol amendé par la boue de Bordeaux.



D'autre part, l'utilisation de traceurs radioactifs montre qu'une fraction importante de la radioactivité provenant du nonylphénol (25 %) reste stabilisée dans le sol de Versailles incubé seul. Cette fraction est inférieure à 10 % dans le mélange sol/boue. A l'inverse, la minéralisation du nonylphénol est doublée dans le mélange sol/boues par rapport au sol seul. Cette différence de métabolisation peut avoir plusieurs causes : une modification de la biodisponibilité du nonylphénol contenu dans les boues au contact du sol, le détournement des capacités métaboliques des microorganismes vers des substrats préférentiels présents dans les boues, une toxicité initiale des boues vis-à-vis des microorganismes dégradants ou l'apport par les boues d'une microflore aux capacités métaboliques nouvelles.

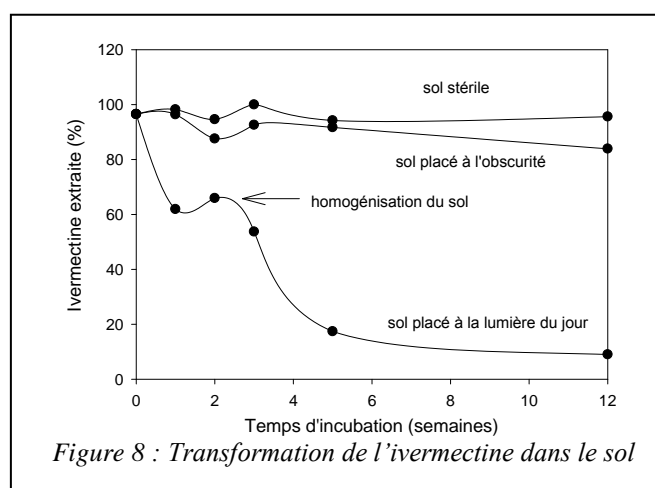
La boue de Bordeaux ne semble pas modifier de façon importante le devenir du nonylphénol dans le mélange par rapport au sol seul.

Nous avons isolé des mélanges sol/boues 9 souches de champignons dont l'identification est en cours. Nous réalisons aussi une étude comparée de leur métabolisation du nonylphénol.

A ce jour, ces résultats, combinés avec ceux de nos collègues de Toulouse, font apparaître que le risque de transfert du nonylphénol du sol vers les plantes est faible, mais réel. La modification de la transformation naturelle du nonylphénol dans les sols amendés pourrait accroître ce risque de transfert, et entraîner alors un risque d'accumulation du composé dans les récoltes, avec des effets potentiels sur la chaîne alimentaire.

Un exemple de polluant persistant : l'ivermectine

Un autre projet pluridisciplinaire de l'INRA tend à évaluer l'impact écotoxicologique des médicaments antiparasitaires utilisés massivement en élevage extensif. Les endectocides de type avermectine (avec comme produit phare l'ivermectine), produits par l'actinomycète *Streptomyces avermitilis*, sont actuellement très utilisés. Ils constituent un groupe d'antiparasitaires à large spectre insecticide et nématocide. Active à faible concentration, l'ivermectine est rémanente et peu métabolisée chez le bétail (Alvinerie *et al.*, 1993 ; Chiu *et al.*, 1986). L'écotoxicité du principe parental, éliminé dans les fèces de bovins, est mal évaluée et fait l'objet de controverses avec les firmes pharmaceutiques. Le bolus, un nouveau type de formulation contenant une charge importante de médicament à libération lente (4 mois) et massive (plusieurs grammes) est suspecté d'accroître le risque pour l'environnement. J'ai étudié le devenir dans les sols de l'ivermectine (Figure 8) ainsi que son effet éventuel sur des organismes non-cibles, les champignons du sol.



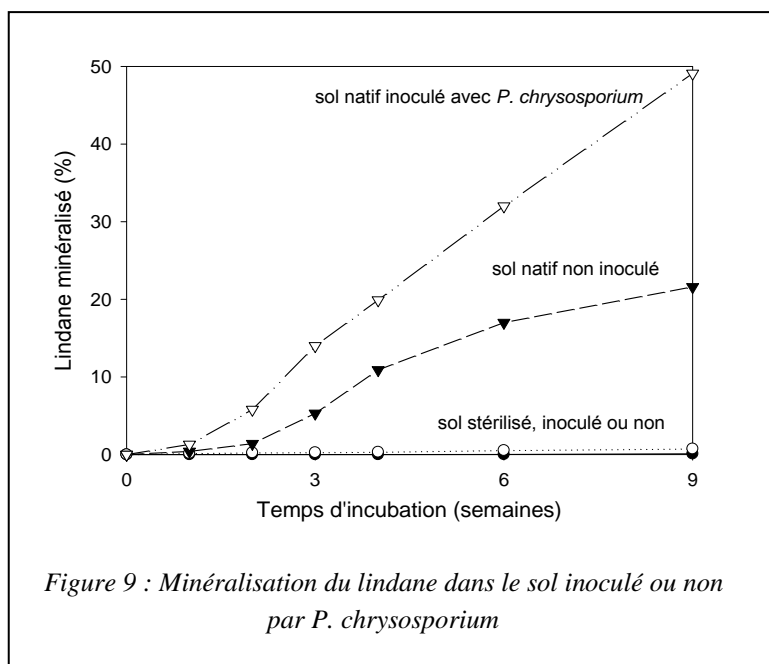
L'étude du devenir de l'ivermectine dans le sol a montré que le temps de demi-vie de l'ivermectine est supérieur à 240 jours à l'obscurité. Pour cette molécule, la dégradation est essentiellement de nature photochimique, les incubations sous fort ensoleillement réduisent le temps de demi-vie à 21 jours. Nous avons aussi montré que l'ivermectine, une molécule très persistante, est peu mobile dans les sols. Il convient maintenant d'étudier le transfert de la matière active des bouses au sol.

2. Transformation des xénobiotiques dans les sols par des organismes allochtones

Des organismes allochtones peuvent être utilisés pour stimuler la transformation des xénobiotiques dans le sol. Ce dernier, stérilisé ou non, est inoculé ou non par le basidiomycète *P. chrysosporium*, puis incubé en présence de polluants marqués au [^{14}C]. L'objectif de ces travaux est de mettre en évidence un effet du champignon sur la transformation naturelle des xénobiotiques par la microflore endogène du sol.

Dans le cas de l'atrazine, la présence du champignon ne modifie ni la cinétique de transformation de l'herbicide due à l'activité microbienne, ni la nature des produits de biotransformation que sont les dérivés N-déalkylés, ni le taux de minéralisation.

A l'inverse, le taux de minéralisation du lindane lié à l'activité catabolique de la microflore endogène est doublé en présence du champignon pendant les 9 semaines d'incubation (Figure 9).



Cependant, les quantités de lindane non transformé extraites des sols sont similaires en présence ou en absence du champignon. Celui-ci semble modifier le schéma de dégradation du pesticide en augmentant la conversion en dioxyde de carbone des métabolites volatils produits par la microflore endogène (Mougin *et al.*, 1997b).

K L'ensemble de ces résultats confirme que les réactions de biotransformation constituent un facteur clé régissant l'écodynamique des xénobiotiques dans les sols. Cette biodégradation est liée à l'activité microbienne du sol, elle peut être stimulée après l'introduction dans le sol de champignons filamenteux particuliers.

B.3. ETUDE DE LA TRANSFORMATION DES XENOBIOTIQUES PAR DES ORGANISMES ENTIERS : LE CAS DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

Problématique - Les champignons filamenteux, en particulier les basidiomycètes ligninolytiques (pourritures blanches), font l'objet de nombreuses études depuis plusieurs années, en raison de leur utilisation dans l'industrie agroalimentaire (synthèse d'arômes) et dans l'industrie papetière (traitement d'effluents, délignification de la pâte à papier : Asther *et al.*, 1987 ; Lomascolo *et al.*, 1999). Ces champignons font partie des rares organismes capables de dégrader la lignine, un polymère insoluble, à structure oligomérique non répétitive et non stéréosélective. Le mécanisme développé par les champignons ligninolytiques pour dégrader la lignine est radicalaire, tout comme le système de synthèse de la lignine par les plantes. La réaction radicalaire se déroule comme une réaction en chaîne dont le résultat final est la dépolymérisation de la lignine, dont les monomères sont ensuite utilisés par le métabolisme cellulaire fongique. Les radicaux sont formés par un ensemble d'enzymes exocellulaires (peroxydases, laccases) dont la production est régulée par la disponibilité des éléments nutritifs (Barr et Aust, 1994).

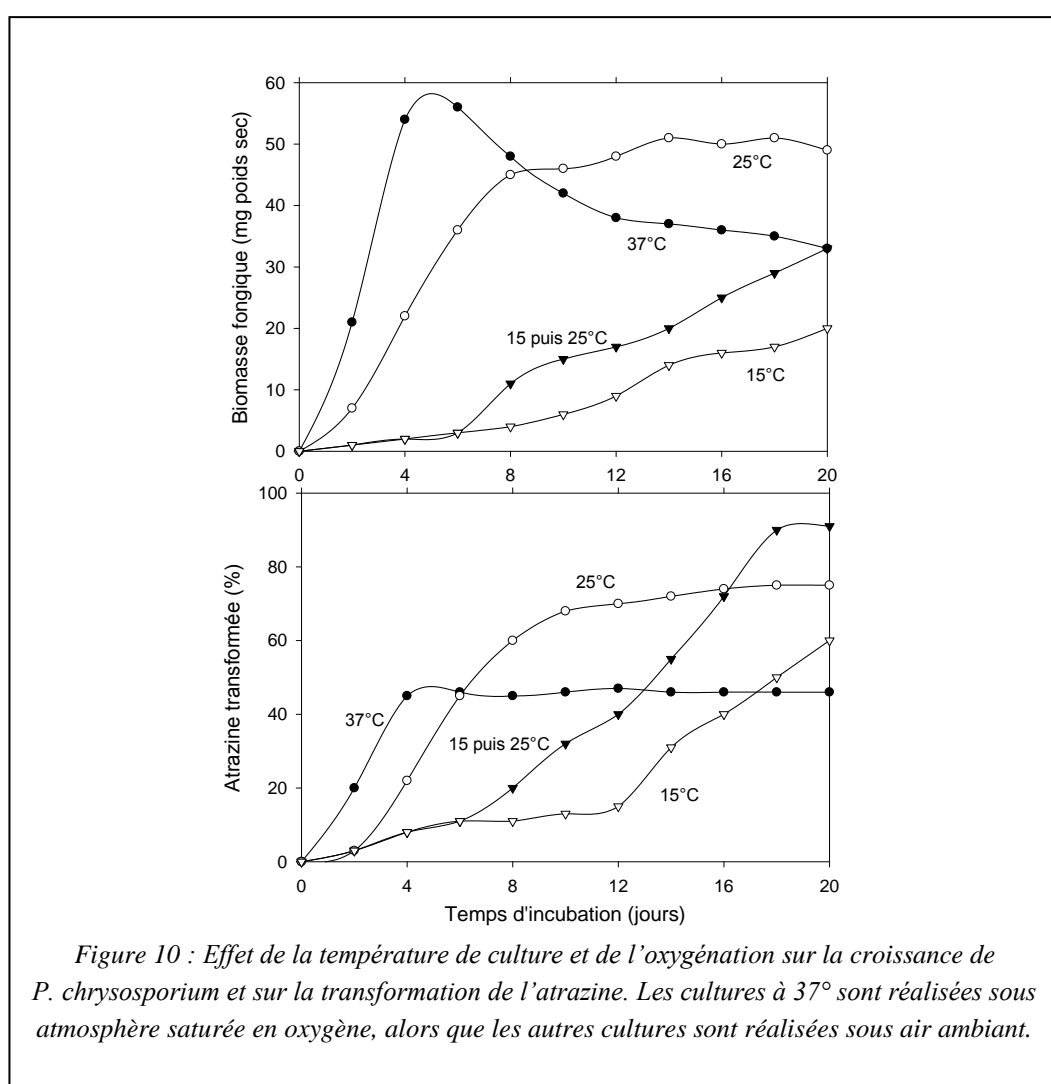
De nombreux auteurs ont postulé que ce système ligninolytique confère aux basidiomycètes de la pourriture blanche la capacité de dégrader un large éventail de polluants récalcitrants car les systèmes enzymatiques présentent une faible spécificité vis-à-vis du substrat (Higson, 1991). Mes études ont alors pour but de renforcer les connaissances sur la physiologie des champignons filamenteux et d'évaluer leurs capacités de dégradation à l'égard de xénobiotiques particuliers.

Les études ont porté en premier lieu sur les pourritures blanches, elles ont été ensuite étendues à des champignons filamenteux appartenant aux classes des basidiomycètes cellulolytiques (pourritures brunes), aux ascomycètes, aux zygomycètes et aux deutéromycètes.

Etude des paramètres influant sur l'efficacité des champignons à transformer les xénobiotiques

Les conditions d'incubation classiquement utilisées pour les études de biotransformation des xénobiotiques par les champignons découlent des conditions mises au point pour des applications agroalimentaires. Les cultures sont majoritairement réalisées en fermenteur à température contrôlée (37°C) sous agitation et sous oxygénation continue. La plus-value apportée aux produits transformés en justifie le surcoût. D'autre part, la composition des milieux de culture doit permettre l'hyperproduction des enzymes ligninolytiques chez les souches productrices (Laugero *et al.*, 1996), car ces enzymes sont connues pour être responsables d'un bon nombre de bioconversions.

Pour une application environnementale comme la dépollution de sol, la taille et la durée des chantiers imposent des conditions les plus simples et les moins onéreuses possibles. De ce fait, j'ai progressivement modifié les paramètres de culture des champignons tout en suivant la transformation de quelques xénobiotiques modèles, pour évaluer les capacités de biotransformation des souches fongiques dans des conditions de culture simples. Tout d'abord, dans le cas de *P. chrysosporium*, l'utilisation d'un milieu de culture riche en carbone, azote et phospholipides a permis le développement rapide de la biomasse fongique, avec une bonne production d'exoenzymes. Ensuite, l'étude combinée de l'abaissement de la température de culture et l'aération des cultures maintenues en conditions statiques par de l'air naturel ont montré que la transformation de pesticides comme l'atrazine et le lindane est corrélée à la longueur de la phase de croissance de la biomasse, qui augmente avec les basses températures (Figure 10).



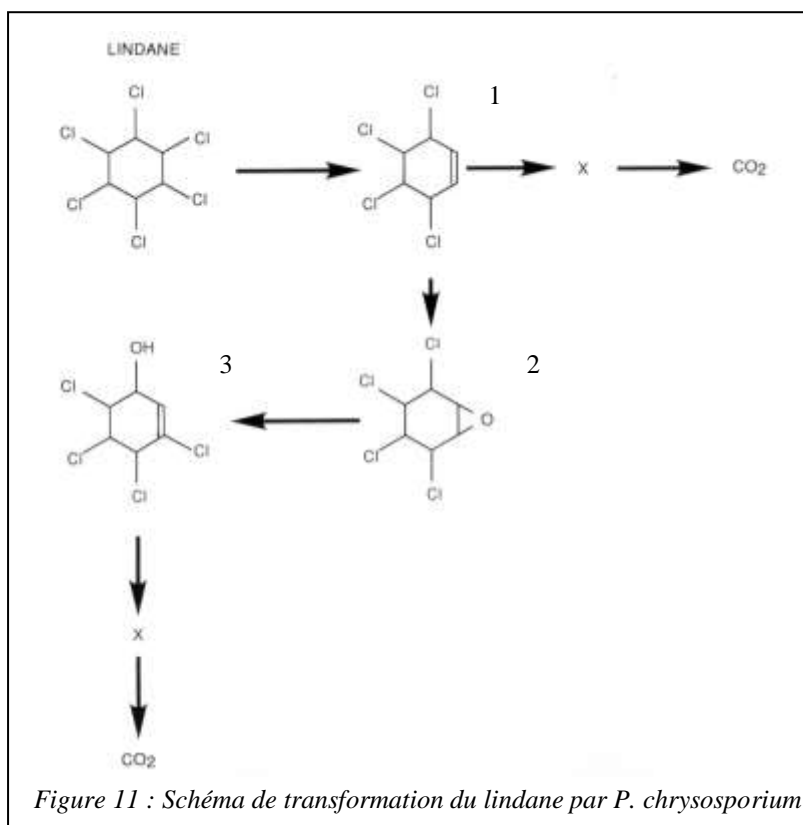
En d'autres termes, la transformation de l'atrazine reste importante même lorsque le champignon croît à des températures modérées sous air ambiant. Ces conditions ralentissent la phase de croissance fongique et modifient aussi la production des lignines et manganèse peroxydases (Mougin *et al.*, 1994, 1996, 1997a). Dans ces conditions de cultures, les

champignons testés se sont montrés capables de transformer, au moins partiellement, tous les composés organiques testés.

Identification des produits de transformation et schémas métaboliques

Lorsque j'ai débuté mes recherches, les métabolites de xénobiotiques formés par les champignons n'étaient pas systématiquement identifiés. De plus, lorsque les expériences étaient réalisées avec des substrats marqués, les différents auteurs quantifiaient souvent uniquement le dioxyde de carbone dégagé, métabolite ultime du substrat initial.

Mes expériences montrent que *P. chrysosporium* et *T. versicolor* convertissent l'atrazine en dérivés N-déalkylés selon un schéma comparable à celui fourni par d'autres champignons filamenteux ou par certaines bactéries. En revanche, à l'inverse de ces dernières, les champignons sont incapables d'ouvrir l'hétérocycle triazinique. Le lindane (γ -hexachlorocyclohexane) est quant-à-lui transformé par *P. chrysosporium* en tétrachlorocyclohexène **1**, tétrachlorocyclohexène-époxyde **2** et tétrachlorocyclohexénol **3**, ainsi qu'en plusieurs autres métabolites minoritaires **X** et en dioxyde de carbone (Figure 11).



Ce schéma métabolique est similaire à celui décrit chez d'autres organismes (mammifères, insectes), dont on sait qu'il est en partie catalysé par des cytochromes P450.

Le pentachlorophénol, un composé biocide, est lui aussi faiblement minéralisé par *P. chrysosporium*. Le champignon le convertit majoritairement en pentachloroanisole par méthylation (Laugero *et al.*, 1997). Cette réaction ferait intervenir une méthyl-transférase membranaire.

Implication de systèmes enzymatiques de métabolisation

Nous avons montré que le traitement des cultures par des inducteurs ou des inhibiteurs de cytochromes P450 modifie la transformation de pesticides comme l'atrazine ou le lindane. Ainsi, le traitement des cultures par l'aminobenzotriazole (un inhibiteur suicide de beaucoup de cytochromes P450) inhibe fortement le métabolisme de l'atrazine et du lindane, en diminuant la formation de tous les métabolites comme le dégagement de dioxyde de carbone pour le second composé. Dans ce cas également, le traitement des cultures par le phénobarbital (un inducteur des cytochromes P450) ne modifie pas la minéralisation du lindane, mais augmente l'oxydation du tétrachlorocyclohexène en tétrachlorocyclohexène-époxyde et tétrachlorocyclohexénol (Mougin *et al.*, 1996). Ces résultats laissent penser que la participation d'un ou de plusieurs cytochromes P450 dans le métabolisme de l'atrazine et du lindane chez *P. chrysosporium* est probable. Des incubations réalisées avec des milieux de culture concentrés enrichis en lignine et/ou en manganèse peroxydases n'ont révélé aucune métabolisation des pesticides avec ces enzymes.

K Ces résultats montrent que les champignons filamenteux, en particulier les basidiomycètes ligninolytiques, sont capables de transformer les xénobiotiques sous des conditions de culture simples à mettre en oeuvre. D'autre part, la nature des métabolites suggère souvent la participation de systèmes de métabolisation de type cytochrome P450. L'attaque directe des composés par les enzymes ligninolytiques n'a pas été mise en évidence lors de ces études.

B.4. ETUDE DE LA TRANSFORMATION DES XENOBIOTIQUES PAR DES FRACTIONS CELLULAIRES

Problématique - Chez les organismes eucaryotes, la majorité des réactions de biotransformation qui affectent la structure des xénobiotiques sont des réactions d'oxydation. Les études sur fractions cellulaires permettent d'accéder à des systèmes enzymatiques membranaires ubiquistes comme les cytochromes P450. Ceux-ci constituent une vaste famille d'oxygénases qui catalysent l'activation de l'oxygène moléculaire grâce à 2 électrons et 2 protons, avec insertion de l'un des deux atomes d'oxygène sur le substrat et formation d'eau (Black et Coon, 1987). De ce fait, ces mono-oxygénases aboutissent principalement à des réactions d'hydroxylation et de N-déalkylation sur de nombreux substrats naturels ou xénobiotiques, incluant notamment les pesticides et les HAPs. Dans la plupart des cas, ils contribuent à la détoxification de la molécule mère. Les monooxygénases à cytochrome P450 sont des complexes multi-enzymatiques comprenant les cytochromes P450 proprement dit (hémoprotéines qui fixent l'oxygène et le substrat) et les chaînes transporteuses d'électrons (les réductases)(Dawson et Eble,

1986). Une meilleure connaissance de ces systèmes enzymatiques, incluant la caractérisation fonctionnelle des protéines et des gènes reste nécessaire pour gérer les potentialités des cytochromes P450.

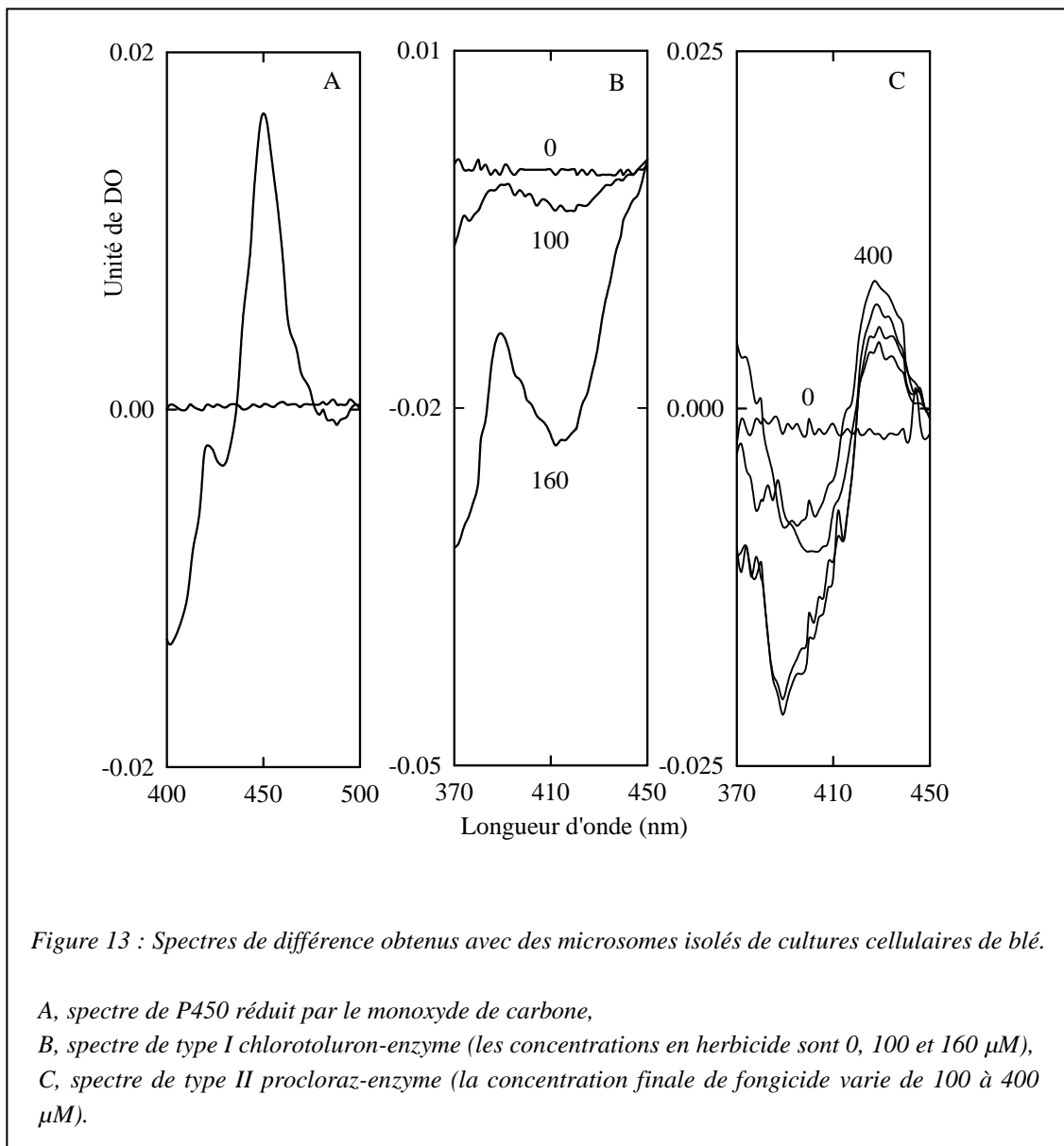
- En agronomie, les cytochromes P450 des végétaux supérieurs, en jouant un rôle important dans le métabolisme des herbicides, constituent un facteur clé de la sélectivité de ces composés (Werck-Reichhart, 1995), et sont impliqués dans les résistances multiples aux herbicides développées depuis plusieurs années par certains biotypes d'espèces adventices. Des preuves définitives de l'implication de cytochromes P450 dans le métabolisme des pesticides chez les champignons filamenteux n'ont pas encore été obtenues.

- Dans le domaine de l'environnement, les potentialités des cytochromes P450 de plantes et de microorganismes pour la détoxification et la dégradation restent à exploiter en biodépollution des eaux et des sols.

Rôle des cytochromes P450 de végétaux supérieurs dans le métabolisme des herbicides

Le chlortoluron est un herbicide de la famille des phénylurées largement utilisé en traitement de pré ou post-levée des céréales d'hiver. Les systèmes enzymatiques responsables du métabolisme oxydatif de l'herbicide n'avaient pas été identifiés. De ce fait, j'ai étudié le métabolisme du chlorotoluron dans des microsomes isolés de cultures cellulaires de blé, qui renferment également de bons niveaux de cinnamate 4-hydroxylase et de laurate hydroxylase, activités enzymatiques du métabolisme cellulaire endogène catalysées par des cytochromes P450 (Benveniste et Durst, 1974 ; Salaun *et al.*, 1978). Le chlortoluron est oxydé en un dérivé hydroxylé sur le méthyle du cycle aromatique et en un dérivé N-monodéméthylé, deux réactions clés à la base du schéma métabolique de l'herbicide (Figure 12). Les deux activités enzymatiques conduisant à ce type de transformation possèdent les propriétés caractéristiques des monooxygénases à cytochrome P-450 : localisation subcellulaire, besoins en cofacteurs, sensibilité à des inhibiteurs connus de monooxygénases à cytochrome P450 (Mougin *et al.*, 1990, 1991, 1992).

L'implication d'un cytochrome P450 dans une réaction peut être également obtenue par spectrophotométrie différentielle (Black et Coon, 1987). Lorsque le cytochrome est réduit, il peut fixer le monoxyde de carbone à la place de l'oxygène, ce qui forme un complexe qui déplace le maximum d'absorbance de la bande de Soret de la protéine entre 447 et 452 nm. D'autre part, un déplacement de cette même bande est obtenu avec le cytochrome oxydé lorsqu'un substrat se fixe sur la protéine (spectre de type I) ou lorsque des inhibiteurs comme les hétérocycles interagissent avec le site actif (spectre de type II). Ces trois types de spectres ont été obtenus dans le cas du système microsomes de blé/chlortoluron (Mougin *et al.*, 1992), confirmant ainsi l'implication des cytochromes P450 dans la métabolisation de l'herbicide (Figure 13).



Les quatre activités mesurées (cinnamate 4-hydroxylase, laurate hydroxylase, hydroxylase et N-déméthylase du chlortoluron) et les teneurs en cytochrome P450 sont augmentées dans les microsomes après le traitement des cellules par des composés agropharmaceutiques variés (herbicides, fongicides et antidotes d'herbicides) (Mougin *et al.*, 1991). Après traitement des cultures, les microsomes préparés sont aussi capables de métaboliser diuron et isoproturon, deux autres herbicides de type phénylurée.

Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que des monooxygénases à cytochrome P450 sont impliquées dans les réactions d'hydroxylation et de N-déméthylation de l'herbicide chez le blé. Les propriétés des deux activités laissent penser que des enzymes distinctes catalysent chacune des deux réactions chez cette espèce. La purification de ces systèmes est à faire, bien qu'elle reste problématique chez les végétaux et qu'elle aboutisse le plus souvent à l'obtention d'enzymes purifiées inactives.

Une étude similaire a ensuite été réalisée sur la véronique de Perse, une adventice du blé. Elle a révélé que les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase s'expriment

différemment chez cette espèce : l'activité N-déméthylase étant la plus exprimée. Chez les deux espèces, les activités présentent des sensibilités différentes vis à vis de composés inhibiteurs ou inducteurs connus de cytochrome P450 (Tableau 1)(Mougin *et al.*, 2001).

Inhibiteurs	Inhibition (%)				
	Blé		Véronique		
	CPUH	CPUDM	CPUH	CPUDM	
Monoxyde de carbone	50	35	75	98	
Tetcyclacis	10 µM	20	10	74	45
	100 µM	60	40	99	80
Aminobenzotriazole	10 µM	74	57	0	0
	100 µM	100	100	35	7

Tableau 1 : Différences de sensibilité des activités chlortoluron hydroxylase (CPUH) et N-déméthylase (CPUDM) du blé et de la véronique à l'égard d'inhibiteurs reconnus de cytochromes P450

Ainsi, le métabolisme de l'herbicide chez le blé apparaît sensible à l'aminobenzotriazole alors que le tetcyclacis est l'inhibiteur le plus puissant chez la véronique de Perse. L'ensemble de ces résultats montre que la sélectivité naturelle d'un herbicide peut-être modifiée en modulant l'activité des enzymes de biotransformation par voie chimique, en utilisant des synergistes ou des antidotes d'herbicides.

A la suite de ce travail pionnier réalisé sur le métabolisme d'une phénylurée, de nombreuses études ont prouvé la participation des cytochromes P450 végétaux dans le métabolisme de pesticides appartenant aux principales familles d'herbicides (sulfonylurées, alkoxy-phénoxyalcanoates, chloroacétanilides, imidazolinones...) chez les espèces cultivées ou adventices. Récemment, les gènes de deux cytochromes P450 métabolisant les phénylurées ont été isolés chez des plantes supérieures. Il s'agit du gène CYP76B1 isolé chez le topinambour par l'équipe de D. Werck-Reichhart (Robineau *et al.*, 1998), il ne code que pour l'activité N-déméthylase. Un second gène, CYP71A10, a été isolé chez le soja (Siminski *et al.*, 1999), et code à la fois pour les activités hydroxylase et N-déméthylase. Les outils du génie biomoléculaire sont donc utilisables pour modifier, cette fois par voie génétique, la sélectivité naturelle des herbicides (Ohkawa *et al.*, 1999).

Implication des cytochromes P450 fongiques dans la biotransformation des xénobiotiques

Actuellement, seuls les cytochromes P450 fongiques impliqués dans le métabolisme des stérols et des acides gras sont relativement bien connus (Vanden Bossche et Koymans, 1998 ; van den Brink *et al.*, 1998). Un seul cytochrome P450 fongique impliqué dans la

métabolisation des xénobiotiques (hydroxylation du benzo[a]pyrène) a été caractérisé chez les champignon filamenteux (Ferris *et al.*, 1973).

Les modèles que nous avons retenus sont *P. chrysosporium* et *C. elegans*. Nous avons montré que des microsomes isolés de cultures de ces souches renferment des cytochromes P450, avec des teneurs proches de celles mesurées chez les plantes (100 pmoles/mg protéines microsomiques).

Pour l'instant, les protocoles de broyage des tissus et de séparation des fractions membranaires n'ont pas permis d'obtenir des microsomes suffisamment actifs pour mesurer des activités d'oxydation sur des xénobiotiques (EROD, pesticides) ou des composés du métabolisme cellulaire (acide laurique). Cependant, l'activité NADPH cytochrome c réductase (une des composantes du complexe multienzymatique P450) s'est montrée fonctionnelle (Mougin *et al.*, 1997a).

Κ Mon travail sur la caractérisation des cytochromes P450 végétaux impliqués dans le métabolisme des herbicides a été l'un des plus complet dans ce domaine. Il a permis de vérifier au niveau enzymatique des résultats expérimentaux antérieurs obtenus in vivo sur cultures cellulaires et sur plantes entières. Il a constitué les bases des recherches ultérieures menées par d'autres équipes pour isoler les gènes des systèmes enzymatiques impliqués. Une approche similaire reste à faire chez les champignons filamenteux.

B.5. ETUDE DE LA TRANSFORMATION DES XENOBIOTIQUES PAR DES SYSTEMES ENZYMATIQUES PURIFIES

Problématique - Les laccases sont des glycoprotéines à cuivre impliquées dans l'oxydation de nombreux composés aromatiques (phénols naturels et xénobiotiques) et la réduction concomitante de l'oxygène moléculaire en eau (Thurston, 1994). Elles présentent de nombreuses applications industrielles (délignification, synthèse d'arômes,...). Dans le domaine de l'environnement, elles pourraient intervenir comme agents de dépollution des sols et effluents liquides (eaux, eaux usées ou lixiviats, Gianfreda *et al.*, 1999) provenant d'installations de biodépollution de sols. Depuis 10 ans, environ 30 formes de laccases ont été identifiées chez les champignons filamenteux et les végétaux supérieurs, et 15 gènes ont été clonés, séquencés et caractérisés. Cependant, en dépit de nombreuses recherches notamment sur le plan moléculaire, certaines zones d'ombre subsistent notamment quant à leur structure, mode d'action et fonction.

Mes recherches concernent les aspects suivants :

- fonctions : rôle des laccases dans les réactions de biotransformation des xénobiotiques,

- propriétés structurales des enzymes,
- étude du mécanisme catalytique et du rôle des médiateurs.

Elles sont nécessaires pour une valorisation optimisée des laccases. Ces études visent aussi à apporter des renseignements sur les mécanismes impliqués dans la stabilisation par formation des résidus liés dans les sols, l'hypothèse étant que les laccases, par couplage oxydatif, lient les xénobiotiques ou leurs métabolites à des composés du sol.

Cet axe thématique bénéficie du soutien de C. Jolivald (maître de conférence ENSCP) en détachement au sein de notre équipe depuis 1999 et pour une durée de deux ans.

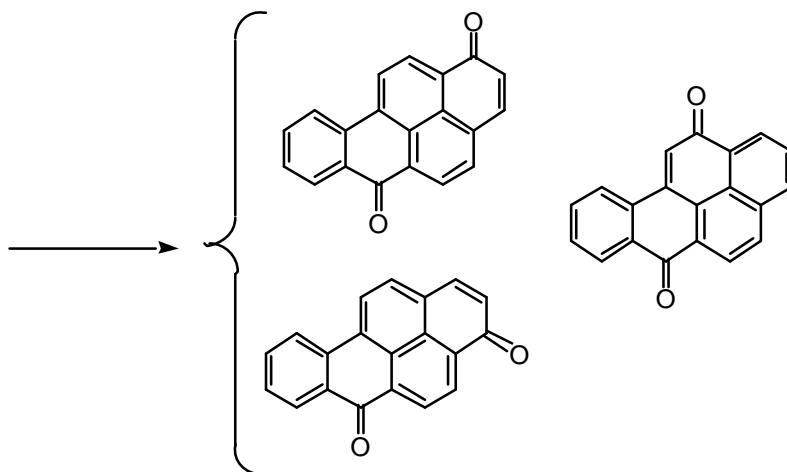
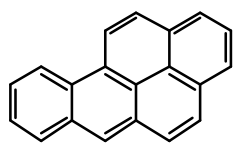
Etude du rôle des laccases dans les réactions de biotransformation des xénobiotiques

L'étude de la transformation de plusieurs xénobiotiques (isoxazole, nonylphénol, phénylurées, HAPs) par des laccases purifiées est en cours. On observe en général avec ces enzymes, et pour les xénobiotiques considérés plusieurs types de réactions dépendant de la nature et de la position des substituants sur le cycle phénolique. Ces réactions conduisent à la formation de quinones, la coupure de liaison carbone/azote ou carbone/carbone, ou encore des oligomérisations et des couplages (Jolivald *et al.*, 1999, 2000 ; Mougin *et al.*, 2000). Le pH du milieu d'incubation modifie à la fois la cinétique des réactions, et la nature des produits formés (Figure 14). Nous avons réalisé un réacteur enzymatique et isolé les métabolites du benzo[a]pyrène. Trois formes de quinones ont été identifiées (Rama *et al.*, 1998b). Nous étendons actuellement le système à la transformation des 16 HAPs classés polluants prioritaires, dans des extraits ou des lixiviats de sols provenant de sites industriels pollués. Si les laccases sont capables de transformer plusieurs de ces HAPs d'origine commerciale présents dans un mélange synthétique, les HAPs extraits de sols industriels ne subissent dans des conditions identiques aucune métabolisation.

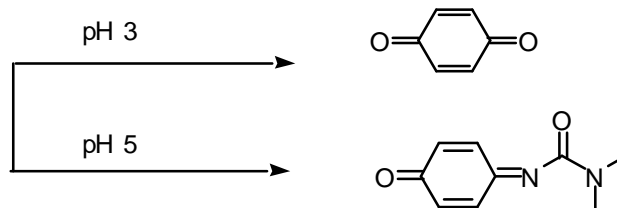
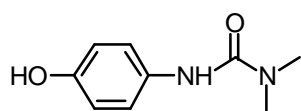
Etude des propriétés structurales des laccases fongiques

Le basidiomycète *T. versicolor* a été cultivé en présence ou non de 2,5-xylidine, un inducteur reconnu des laccases. Dans chaque cas, deux formes majeures de laccases sont produites et séparées par chromatographie. La forme induite présente une séquence N-terminale similaire à celle déterminée par Bourbonnais *et al.* en 1995. Après purification jusqu'à l'obtention d'une seule bande en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, nous avons mis au point une technique de séparation des isoformes de cette laccase induite par isofocalisation. Cinq isoformes sont ainsi obtenues, dont la masse moléculaire semble être corrélée à leur taux de glycosylation. Nous avons obtenu des quantités suffisantes de 2 isoformes et leurs masses ont été déterminées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). L'isoforme 5 (58453 Da) apparaît moins glycosylée que l'isoforme 4 (>59000 Da). Actuellement, nous déterminons la masse des fragments obtenus par digestion protéique ainsi que la position de sites de glycosylation, dans le but d'établir l'homogénéité protéique des isoformes.

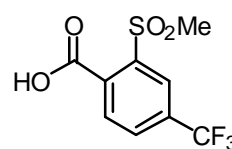
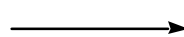
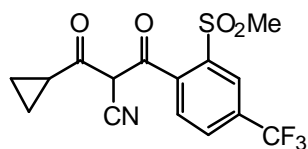
Oxydation du benzo[a]pyrène



Oxydation du 4-hydroxyfénuron



Oxydation du dérivé "dicétonitrile" de l'isoxaflutole



Couplage oxydatif de la 3-(5-chloro-2-hydroxy-phényl)-1,1-diméthyl-urée

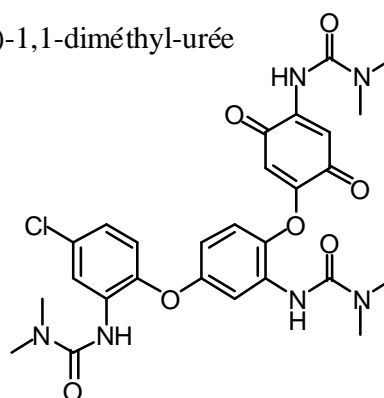
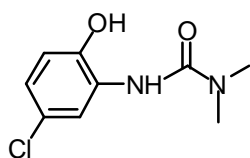


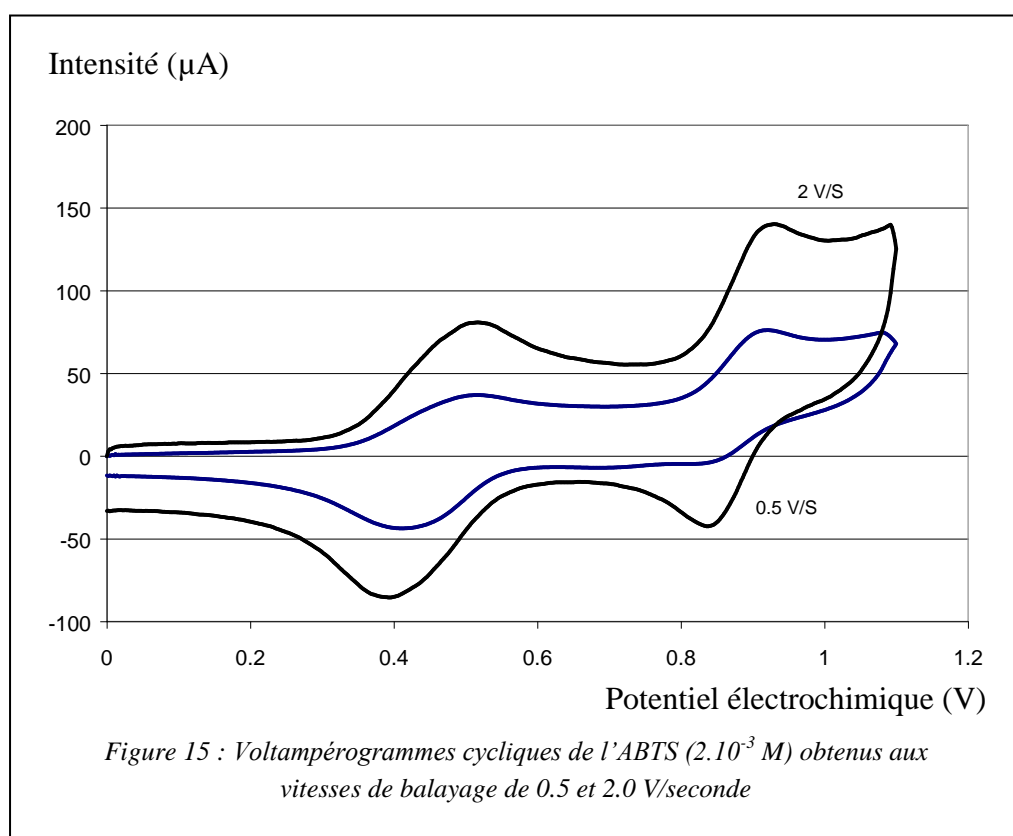
Figure 14 : Exemples de réactions de biotransformation de xénobiotiques catalysées par les laccases purifiées de *Pycnoporus cinnabarinus* et de *T. versicolor*

Etude de la catalyse et du rôle des médiateurs

L'oxydation des composés non phénoliques fait intervenir dans la plupart des cas une molécule organique de faible poids moléculaire, le plus souvent exogène, qui joue le rôle supposé de médiateur redox ou transporteur diffusible d'électrons entre l'enzyme et son substrat (Bourbonnais et Paice, 1996 ; Li *et al.*, 1999). Nous étudions actuellement par voltampérométrie cyclique les potentiels d'oxydation de l'ABTS (Figure 15). Nous avons montré que le médiateur est oxydé en $\text{ABTS}^{\circ+}$ (potentiel d'oxydation = 0.5 V), puis en ABTS^{++} (potentiel d'oxydation = 0.9 V). En effectuant les mesures à deux vitesses de balayage différentes, nous montrons l'instabilité du dication ABTS^{++} , forme active du médiateur sur les xénobiotiques substrats. Malheureusement, ces mêmes résultats ont été simultanément publiés par l'équipe de Bourbonnais au Canada. Cependant, nous pensons utiliser cette méthode rapide pour identifier des xénobiotiques (composés naturels ou de synthèse) se comportant comme des médiateurs potentiels, présentant à la fois des potentiels d'oxydation élevés (> 0.9 V) et utilisables à de plus faibles concentrations que les médiateurs actuellement connus.

De la même façon, cette méthode montre que les métaux et les complexes métalliques (ferro cyanures) présents dans les sols industriels présentent souvent des potentiels d'oxydation inférieurs à ceux des polluants organiques, et peuvent se comporter comme des inhibiteurs de l'oxydation des xénobiotiques par le système laccase/ABTS.

Ainsi, le dication ABTS^{++} oxyde préférentiellement les métaux par rapport aux polluants organiques comme les HAP, ce qui induit un temps de latence de la réaction. Ce résultat n'explique cependant pas l'absence totale de métabolisation des HAPs. L'étude d'autres modes d'inhibition des interférents coextraits des sols est en cours.



K Connues et étudiées depuis de nombreuses années, les laccases fongiques nécessitent encore beaucoup de recherches pour permettre leur valorisation optimisée dans le domaine de l'environnement. De par les réactions qu'elles catalysent, ces enzymes sont susceptibles de jouer un rôle à la fois dans les processus de disparition et de stabilisation des xénobiotiques dans les sols. En effet, l'oligomérisation des xénobiotiques ou le couplage oxydatif de ces composés avec des produits naturels constituant les matières organiques des sols, constitueraient un des mécanismes impliqués dans la formation des résidus liés.

B.6. OPTIMISATION DE L'ACTIVITE DES ENZYMES DE BIOTRANSFORMATION

Problématique – Les systèmes enzymatiques de biotransformation, naturellement exprimés chez les êtres vivants, présentent souvent une affinité réduite pour les xénobiotiques dont la faible biodisponibilité limite aussi la transformation. Pour augmenter la biodégradabilité de tels composés, une stratégie consiste à augmenter l'activité globale des systèmes enzymatiques de façon quantitative (augmentation de la production d'enzymes) ou qualitative (optimisation de l'activité catalytique des enzymes).

Augmentation de la production d'enzymes

L'augmentation de la production d'enzymes peut être obtenue selon différentes stratégies. La première consiste à cultiver le champignon dans des conditions optimisées pour l'hyperproduction sélective de systèmes enzymatiques. Ainsi, le basidiomycète *P. chrysosporium* immobilisé sur un support synthétique, cultivé en réacteur dans un milieu complexe contenant du glycérol et des phospholipides, produit de grandes quantités de manganèse peroxydases (Laugero *et al.*, 1996).

La seconde utilise la génétique classique et conduit à l'obtention de souches hyperproductrices d'une enzyme d'intérêt. Cette approche est actuellement pratiquée chez nos collègues de Marseille, qui, en association avec des conditions de culture optimisées, permet, par exemple, de fortes productions de laccases (Sigoillot *et al.*, 1999).

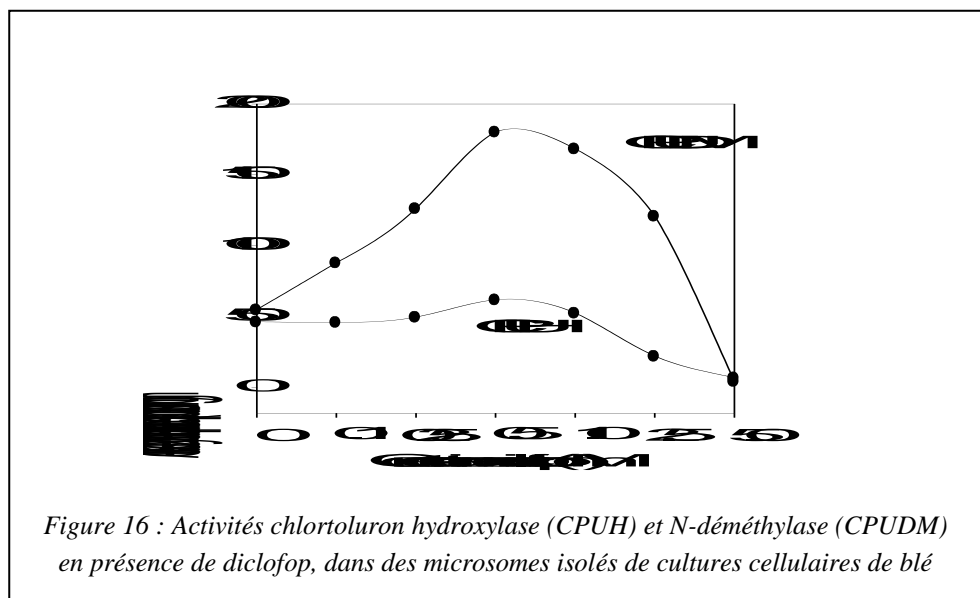
Une autre approche consiste à induire la production des enzymes, c'est-à-dire à utiliser des « agents » physiologiques, physiques ou chimiques qui vont entraîner l'expression différentielle de certaines protéines par activation de leurs gènes structuraux, et conduire à l'augmentation de leur concentration cellulaire. Les xénobiotiques, et plus particulièrement les composés aromatiques, sont souvent de bons inducteurs des enzymes de biotransformation (Gianfreda *et al.*, 1999). Nous utilisons actuellement la 2,5-xylidine pour induire la production de laccases.

Enfin, les outils du génie biomoléculaire permettent depuis plusieurs années de cloner, puis d'exprimer chez un organisme hôte le gène codant pour une enzyme donnée. Cet organisme hôte est le plus souvent une bactérie (*Escherichia coli*), mais récemment des levures et des champignons filamenteux sont apparus comme de bons candidats. En collaboration avec le Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire de Grignon, nous réalisons actuellement l'expression hétérologue des laccases de *T. versicolor* chez la levure *Yarrowia lipolytica*, qui, couplée à des conditions de cultures optimisées, permettra de forts niveaux de production d'enzymes.

Optimisation de l'activité catalytique des enzymes

L'optimisation de l'activité catalytique des enzymes peut aussi être abordée et utilisant des composés chimiques qui vont augmenter l'activité catalytique des enzymes produites.

En ce qui concerne les cytochromes P450, j'ai montré que l'activité chlortoluron *N*-déméthylase est presque triplée lorsque du diclofop (un herbicide) est ajouté à la concentration de 0.5 mM avec le chlortoluron dans le milieu d'incubation des microsomes isolés des cultures cellulaires de blé (Figure 16)(Mougin et al., 1991). L'effet est moins important sur l'activité CPUH. Il est possible que le diclofop favorise le transport d'électrons entre les réductases et le cytochrome P450, mais ce mode d'action reste à confirmer.



Dans le cas des laccases, la sélection de médiateurs rédox performants vis-à-vis de substrats non phénoliques est une voie de recherche à explorer, même si, d'un point de vue environnemental, elle n'est pas satisfaisante car nécessitant l'emploi de fortes quantités de médiateurs.

Une alternative consiste en la modification du site actif de l'enzyme. La modélisation du site actif de la laccase de *T. versicolor* est en cours, et s'effectue par remplacement moléculaire à partir des données cristallographiques de la laccase de *Coprinus cinereus* (Ducros et al.,

1998), enzyme dont le taux d'identité avec la laccase de *T. versicolor* est très élevé, de l'ordre de 60%. Une meilleure connaissance du site d'interaction enzyme/substrat permettra d'élaborer une stratégie d'optimisation de l'activité catalytique de l'enzyme et de ses potentialités dans le domaine de la biodépollution (modification du potentiel redox, pH,...), en utilisant les outils de la biologie moléculaire tels que la mutagenèse dirigée.

C. RECHERCHES APPLIQUEES

C.1. BIODEPOLLUTION DES SOLS INDUSTRIELS ET DES EAUX

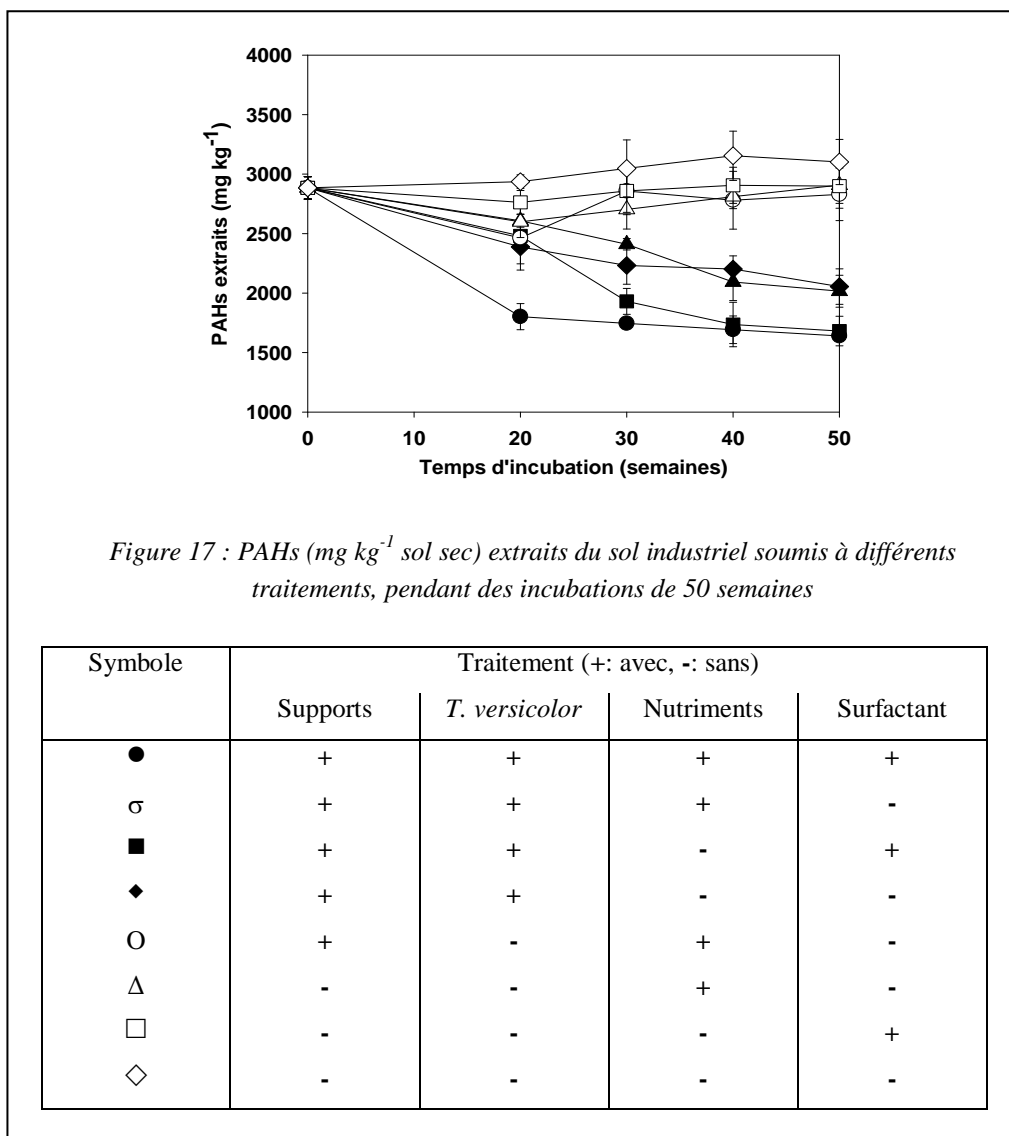
Problématique – Les sols agricoles, mais surtout les sols péri-urbains sont aujourd'hui contaminés par un grand nombre de xénobiotiques, et constituent des foyers de dispersion de ces composés dans l'environnement. En raison de leur faible coût, des procédés biologiques de dépollution sont utilisés pour la réhabilitation des sols de sites industriels. Longtemps mis en œuvre en utilisant les populations microbiennes des sols, une seconde génération de procédés fait intervenir des champignons filamenteux allochtones (Holroyd et Caunt, 1994). Dans ce contexte, un programme de recherche a été exploré dans le cadre du partenariat INRA-Krebs à l'origine de la thèse de R. Rama. Il consistait à mettre en évidence le potentiel de champignons filamenteux pour la dépollution de sols provenant d'anciennes usines à gaz, et fortement contaminés par des HAP. D'autre part, nous évaluons les capacités des laccases fongiques à épurer des eaux renfermant des polluants.

Nous disposons maintenant d'une collection de souches présentant des potentialités cataboliques variées liées à la production de plusieurs systèmes enzymatiques (peroxydases, laccases, P450). Nous possédons également les outils de criblage, d'inoculation, de mesure de la croissance ainsi que l'activité métabolique dans les sols. D'autre part, les études sur la solubilisation des HAP ont permis de sélectionner des tensio-actifs capables de les solubiliser dans les sols industriels, sans induire d'effets toxiques sur les champignons.

Nous avons donc réalisé différents essais d'inoculation de sols industriels provenant d'une ancienne usine à gaz, et contenant de fortes teneurs de HAP (2800 mg/kg) et de cyanures (220 mg/kg). Le basidiomycète *T. versicolor* a été retenu pour cette étude. Le sol, placé en microcosmes (6 kg), est aéré, humidifié périodiquement, et incubé à l'obscurité à température ambiante, sur une durée de 50 semaines. Les incubations sont réalisées dans des conditions se rapprochant de celles susceptibles d'être utilisées en pratique : sol grossièrement tamisé, éléments nutritifs du commerce (fertilisants agricoles), surfactant industriel, aération forcée et température ambiante. Différents essais correspondent à des conditions d'incubation variées

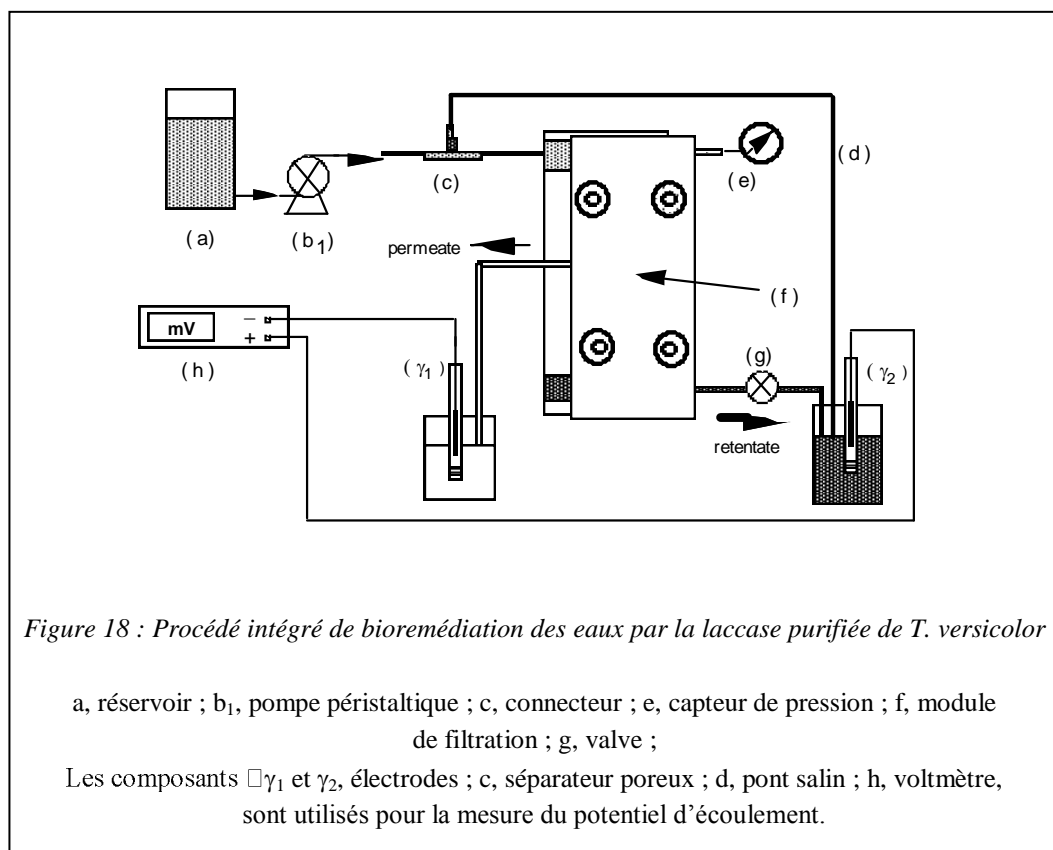
(avec ou sans support d'inoculation, avec ou sans champignon, avec ou sans surfactant, avec ou sans éléments nutritifs) (Rama *et al.*, 2001).

Parmi les différentes conditions d'incubation testées, les résultats montrent que la dégradation des HAPs est la plus rapide en présence du champignon, du tensio-actif et des éléments nutritifs (diminution de 38 % des quantités extractibles initiales en 20 semaines), mais atteint ensuite un plateau (Figure 17). La présence du tensio-actif est prépondérante par rapport à celle des éléments nutritifs.



Les performances du champignon sont limitées par la très faible biodisponibilité des polluants dans les sols. *T. versicolor* se développe dans le sol, puis il est concurrencé et remplacé après 20 semaines par d'autres souches fongiques.

Les métabolites polaires de phénylurées (fénuron, monuron) que nous avons synthétisés se sont avérés de bons substrats des laccases, qui, en fonction du pH du milieu d'incubation, sont capables de les transformer en de nombreux composés (Jolival *et al.*, 1999). Nous avons conçu et réalisé un procédé couplé d'élimination des xénobiotiques dans les eaux (Figure 18).



Dans ce système, l'activité de l'enzyme est conservée après son immobilisation sur membrane de microfiltration (Jolival *et al.*, 2000). La membrane est d'abord activée par l'hydrazine pour fournir des groupes amines qui serviront de sites d'accrochage. Ensuite, des groupes aldéhydes sont introduits sur la laccase en utilisant du périodate de sodium. Enfin, membrane et enzyme sont couplées par mise en contact.

La mesure du potentiel d'écoulement permet d'évaluer la charge électrique de la membrane, qui rend compte du taux de greffage de l'enzyme. La transformation enzymatique des xénobiotiques contenus dans l'eau est très rapide et la majeure partie des métabolites formés est éliminée par filtration simultanée. Ce pilote s'avère être un procédé performant de dépollution des eaux.

κ L'ensemble de ces résultats illustre l'utilisation possible des champignons dans le domaine de la dépollution. Cependant, dans les sols, il apparaît indispensable d'augmenter la biodisponibilité des polluants pour une meilleure efficacité du procédé.

C.2. ETUDE DES EFFETS NON INTENTIONNELS DES XENOBIOTIQUES SUR DES ORGANISMES NON CIBLES

• **Problématique** – Dans un contexte agronomique, nous manquons d'outils pour évaluer le risque résultant de l'usage des pesticides pour les micro-organismes des sols. Les effets à long terme des composés les plus persistants sont aussi difficiles à apprécier sur ces mêmes organismes. Sur le plan environnemental, des outils sont également indispensables pour suivre la réhabilitation des sites et milieux pollués. La finalité d'une bonne part de mes recherches fondamentales est la mise au point de tests d'écotoxicité ou de **biomarqueurs** d'exposition ou d'effet pour la surveillance de l'environnement. Un biomarqueur est « *une variation dans les constituants cellulaires ou moléculaires, dans les processus, les structures ou les fonctions ; cette variation induite par un xénobiotique est mesurable dans un système biologique ou un échantillon* » (National Research Council, 1989). Dans un premier temps, j'ai évalué l'effet de quelques xénobiotiques sur des organismes non cibles, en étudiant des activités métaboliques.

Modification du métabolisme et des activités P450 dépendantes chez le blé

Le fenpropimorphe est un fongicide systémique inhibiteur de la biosynthèse des stérols abondamment utilisé en protection de céréales, notamment contre le mildiou. Cette molécule, sous certaines conditions, interfère avec la biosynthèse des stérols chez la plante, en remplaçant les Δ^5 -stérols par les Δ^8 -stérols et les cyclopropylstérols (Corio-Costet et Benveniste, 1988). Cette accumulation de stérols anormaux dans les feuilles et les racines de blé est due à l'inhibition de deux enzymes cibles : la cycloeucaalénol obtusifoliol isomérase et la Δ^8 - Δ^7 -stérol-isomérase. L'aminobenzotriazole (un inhibiteur de cytochromes P450) et l'anhydride naphthalique (un inducteur) utilisés seuls augmentent également les taux de Δ^8 -stérols en diminuant ceux de Δ^5 -stérols. En mélange avec le fenpropimorphe, l'aminotriazole accumule les précurseurs (cyclopropylstérols) dans les racines, en synergisant l'effet du fenpropimorphe. Comme la première cible du fenpropimorphe est la cycloeucaalénol obtusifoliol isomérase, il est probable que l'aminobenzotriazole conduise à une inhibition totale de cette enzyme. Le mélange fenpropimorphe/anhydride naphthalique conduit à une modification du profil stérolique principalement dans les feuilles. En diminuant les taux de Δ^8 -stérols et de cyclopropylstérols élevés causés par l'action du fongicide, l'anhydride exerce un effet antagoniste, soit en activant la métabolisation du fenpropimorphe, soit en stimulant une enzyme cytochrome P450-dépendante impliquée dans la biosynthèse des stérols, comme la 14α -déméthylase (Mougin *et al.*, 2001).

Les teneurs en cytochrome P450 des microsomes isolés de plantules de blé traitées par différents composés chimiques sont-elles aussi modifiées. Le fenpropimorphe seul double les

quantités de cytochromes. En combinaison avec l'anhydride naphthalique ou le clofibrate, ces quantités sont triplées. En mélange avec le fenpropimorphe, l'aminobenzotriazole ou le tetcyclacis exercent un effet antagoniste à celui du fongicide sur les teneurs en cytochromes P450 microsomiques, en conduisant à la transformation du cytochrome P450 induit en cytochrome P420 inactif. Le fenpropimorphe est transformé en un métabolite polaire (probablement un dérivé N-oxyde) par un cytochrome P450. Le traitement de plantes par l'anhydride naphthalique double la vitesse de métabolisation du fongicide (Mougin *et al.*, 2001).

Modification de la production d'exoenzymes chez les basidiomycètes ligninolytiques

Dans les sols, les champignons sont directement au contact des polluants potentiellement toxiques, ce qui les dispense des contraintes liées à l'absorption racinaire et aux translocations existant chez les végétaux. Ceci en fait des organismes de choix pour tester d'éventuels effets écotoxiques de xénobiotiques en milieu terrestre. Dans un premier temps, il convient d'identifier de bons indicateurs des perturbations physiologiques induites. Pour ce faire, des basidiomycètes ligninolytiques (*P. chrysosporium* et *T. versicolor*) ont été cultivés en milieu liquide en présence des composés étudiés précédemment (pesticides, HAP, ...).

Les effets d'une large gamme de xénobiotiques sont mesurés sur la croissance et sur la production de peroxydases et laccases (Figure 19). Des concentrations de 10^{-6} à 10^{-3} M n'induisent pas d'effets significatifs sur la croissance des champignons cultivés en milieu liquide. En revanche, elles modifient sélectivement en fonction du composé, de la dose et du temps de contact, la production (inhibition ou induction) des enzymes. Ces résultats confirment que la production d'exoenzymes ligninolytiques chez les champignons n'est pas uniquement régulée par les éléments nutritifs disponibles, mais qu'elle est aussi inductible par des xénobiotiques, notamment des polluants présents dans l'environnement.

Ainsi, chez *T. versicolor*, la production de laccases est stimulée par un facteur variant de 8 à 28 par certains pesticides (diquat, phénylurées) et leurs métabolites, des produits de transformation de HAPs, le nonylphénol, un produit naturel : la viniférine, pour des concentrations comprises entre 10^{-4} et 10^{-3} M. En comparaison, la 2,5-xylydine, souvent utilisée comme composé inducteur de référence, stimule la production des laccases d'un facteur 15.

K Ces premiers résultats confirment que le métabolisme d'organismes non cibles peut être affecté par certains xénobiotiques ou leurs produits de transformation. Si des effets sur leur métabolisme général ou leur croissance ne sont pas facilement observables, par contre la production de systèmes enzymatiques est modifiée, avec pour conséquences une stimulation ou une inhibition. Les cytochromes P450 de vertébrés ou de mollusques sont fréquemment utilisés comme biomarqueurs d'exposition et d'effet aux xénobiotiques, principalement dans les écosystèmes aquatiques. Les cytochromes P450 de plantes, voire de champignons filamenteux, ainsi que pour ces derniers certaines activités

exocellulaires pourraient également être utilisés dans les écosystèmes terrestres dans le même but.

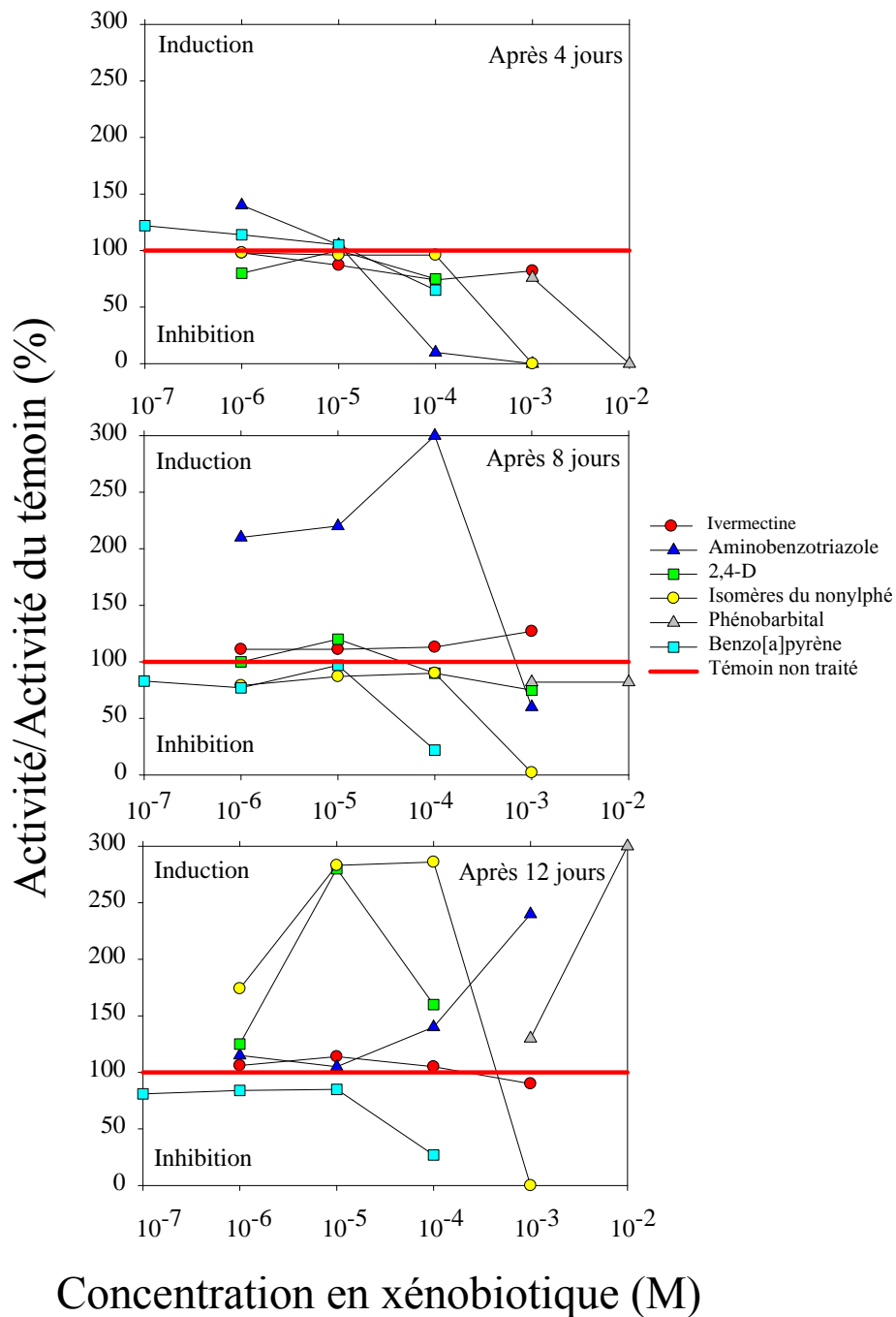


Figure 19 : Effets de divers xénobiotiques sur la production de lignine peroxydases par le champignon *P. chrysosporium* cultivé en milieu liquide

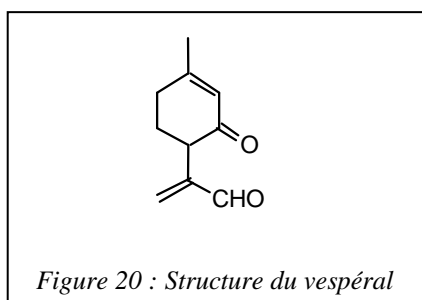
C.3. UTILISATION DES SYSTEMES ENZYMATIQUES FONGIQUES EN SYNTHÈSE ORGANIQUE

En collaboration avec l'équipe Physico-Chimie des Produits Naturels, nous étudions l'utilisation d'enzymes pour la bioconversion de composés naturels à travers deux types de réactions : hydroxylations régio- et stéréo-sélectives et oligomérisation oxydative.

Hydroxylations régio- et stéréo-sélectives

Nous avons étudié les capacités de *C. elegans* à réaliser sur des produits naturels des hydroxylations régio- et stéréo-sélectives difficiles ou impossibles à obtenir par synthèse organique.

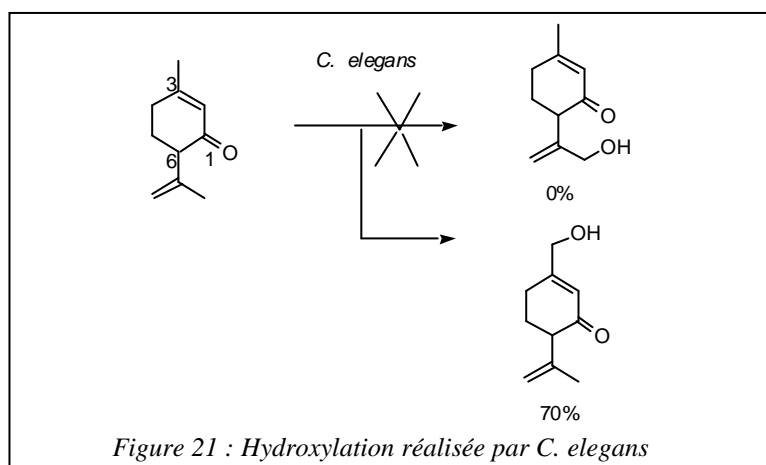
Le premier substrat considéré est le vespéral, phéromone sexuelle de la femelle de *Vesperus xatarti*, un coléoptère longicorne de la famille des *cerambycidae*. Cette molécule, dont le nom scientifique est la 10-oxoisopipériténone, a été identifiée en 1997 dans l'Unité (Boyer *et al.*, 1997) (Figure 20).



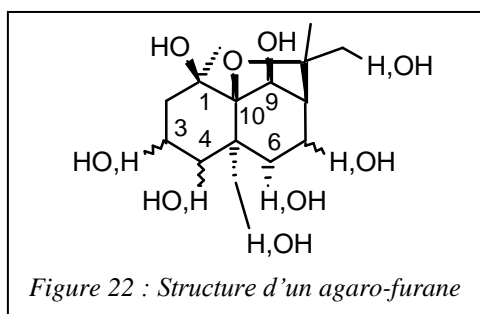
Cette molécule a été choisie pour deux raisons :

- Certaines biotransformations de molécules du même type (7-hydroxyisopipériténone) ont déjà été réalisées à l'aide de culture cellulaires de *Mentha piperita* (Park *et al.*, 1994),
- La synthèse chimique de cette molécule est laborieuse et nécessite 6 étapes dont les rendements sont inférieurs à 80% (Boyer *et al.*, 1997).

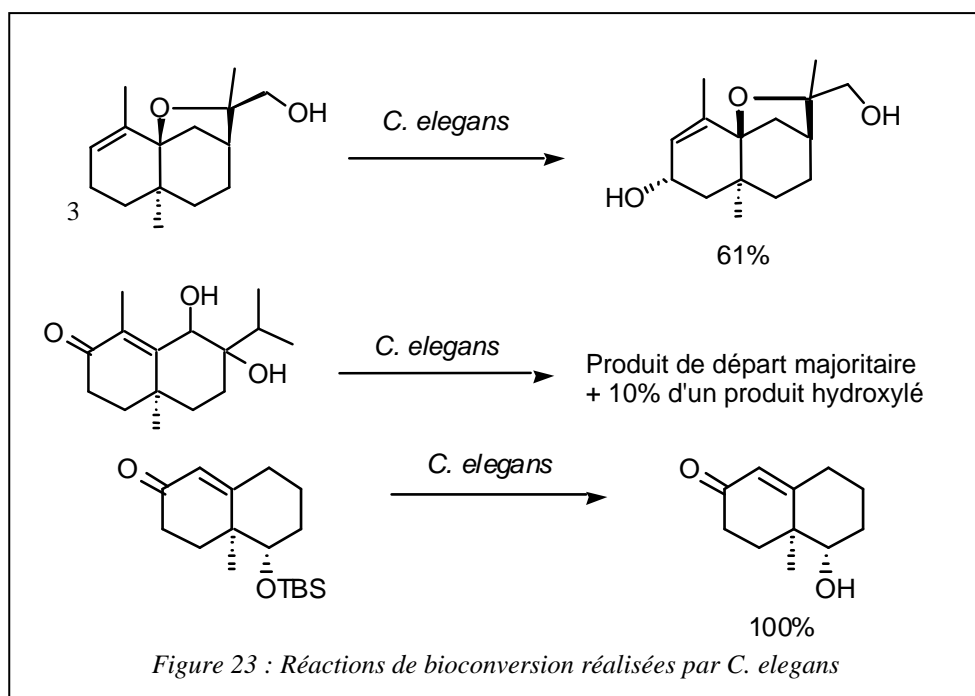
A l'aide du champignon, nous souhaitons créer une hydroxylation sur la chaîne isopropylénique. Ceci n'a pas été réalisé, mais une hydroxylation s'est bien produite avec un rendement de 70% sur le méthyle en position 3 (Figure 21).



Les agaro-furanes (Figure 22) constituent la seconde classe de produits naturels pris en compte. Ces sesquiterpènes tricycliques, isolés de la famille des *Celastraceae*, possèdent de nombreuses propriétés thérapeutiques, insecticides ou encore antiappétentes (Gonzales *et al.*, 1997). Notre but est d'hydroxyler le squelette carboné de plusieurs molécules de synthèse.



Par exemple, *C. elegans* réalise l'hydroxylation d'un premier composé sur le carbone **3** avec un rendement de 61% (Figure 23). Un second composé est aussi métabolisé en 8 jours avec le champignon mais celui-ci n'a été hydroxylé qu'à raison de 10%. Du fait de la faible quantité de produit obtenue, seule la spectrométrie de masse nous a permis de montrer qu'il s'agissait d'une hydroxylation mais sa position est inconnue. La dernière molécule testée comporte une fonction hydroxyle protégée sous la forme d'un éther silylé. Après trois jours de culture, il s'est avéré que la seule transformation était la déprotection de cette même fonction sans aucune autre hydroxylation du squelette.

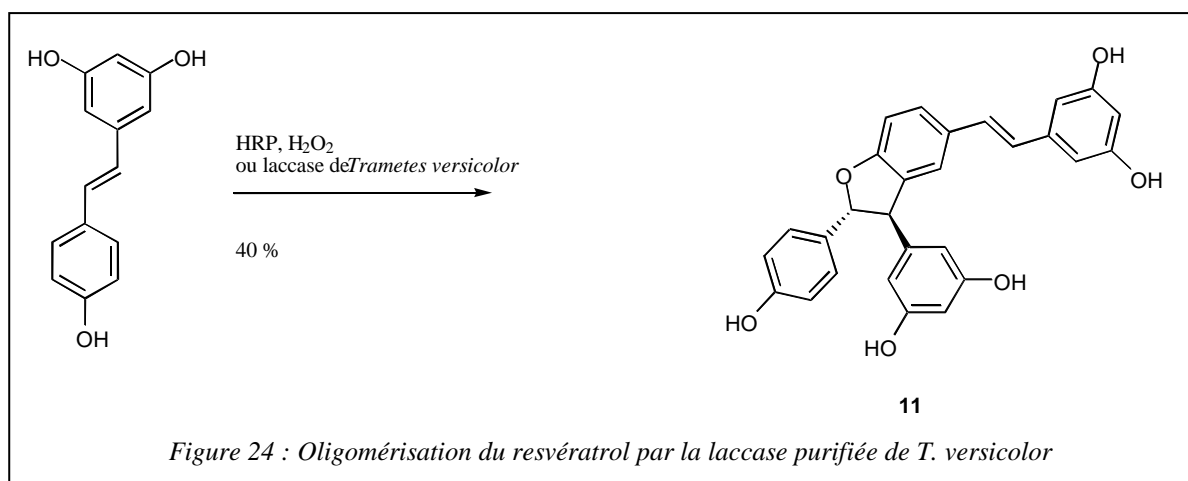


Nos résultats ont mis en évidence les capacités de *C. elegans* à réaliser non seulement des hydroxylations, mais aussi des l'O-désacétylations et des l'O-désilylations de fonctions protégées.

Oligomérisation oxydative

Le resvératrol (trihydroxy stilbène), un composé extrait de nombreuses *Vitaceae*, est considéré comme une phytoalexine de la vigne. Il est très étudié comme un des constituants du vin responsable du "French Paradox". Dans la plupart des plantes où il est présent, le resvératrol est accompagné de nombreux composés issus d'une oligomérisation anarchique. On rencontre ainsi de nombreux dimères, dont le plus connu est la ϵ -viniférine, des trimères et des polymères d'ordres supérieurs, la variabilité structurale de ces composés étant bien évidemment fonction de leur degré de polymérisation. Si les voies de biosynthèse du resvératrol sont bien connues et dépendent notamment de la stilbène synthase (STS), son oligomérisation a été peu étudiée. Du fait de la faible disponibilité des oligomères du resvératrol, ceux-ci ont été peu étudiés du point de vue de leurs activités biologiques potentielles.

La méthode chimique de synthèse ne donne que des rendements modestes et les produits obtenus, majoritairement la viniférine et le pallidol, sont difficiles à purifier. Par contre, une deuxième méthode, biologique, met en jeu les potentialités des systèmes enzymatiques oxydatifs. Dans un premier temps, nous avons repris des travaux anciens utilisant la peroxydase de raifort (HRP) en présence d'eau oxygénée (Pryce, 1983). Dans ce cas, le seul produit obtenu est le dimère **11**, non naturel (Kollmann *et al.*, 2000)(Figure 24).



Parallèlement, nous avons étudié les possibilités d'utilisation de systèmes enzymatiques de champignons filamenteux. Le meilleur résultat est obtenu avec les laccases de *T. versicolor* qui conduit aussi au composé **11**. L'utilisation du champignon entier dans des conditions de fermentation est possible et permet de traiter de grandes quantités de produit de départ. Le résultat le plus remarquable concerne l'activité des dimères par rapport à celle du monomère. Que ce soit dans des tests d'activité antifongique ou antitumorale, les dimères se révèlent 10 fois plus actifs que le monomère. De plus, la toxicité sur cellules saines du composé **11** est plus faible (environ 10 fois) que celle du resvératrol.

K Les potentialités de bioconversion de C. Elegans et de T. versicolor peuvent être utilisées sur des substrats comme les produits naturels (en particulier dans le cas de l'utilisation comme substrats d'extraits faiblement purifiés de végétaux) ou non naturels. Ces études devraient permettre d'obtenir des pistes nouvelles dans la recherche de nouveaux composés antitumoraux.

IV. REFLEXIONS SUR LES ACTIVITES DE RECHERCHE ET PERSPECTIVES

Les activités de recherche que j'ai menées jusqu'à aujourd'hui concernent principalement l'étude des **réactions de biotransformation des xénobiotiques** mises en œuvre par les populations microbiennes des sols, les champignons filamenteux et les végétaux supérieurs.

Les retombées scientifiques de mon programme concernent l'amélioration de notre **connaissance des mécanismes**, notamment **physiologiques** et **biochimiques**, développés par ces organismes, suscitant des implications environnementales et agronomiques importantes.

Ainsi, dans ce mémoire, j'ai essayé, en utilisant plusieurs modèles de complexité décroissante (sols, organismes entiers, fractions cellulaires, enzymes purifiées), de montrer :

- l'importance des réactions de biotransformation dans le devenir des xénobiotiques dans l'environnement (milieu physique et organismes vivants),
- le rôle de ces réactions dans la modulation d'effets intentionnels ou non-intentionnels de ces composés sur les être vivants,
- donc de fournir des informations qui visent à évaluer le risque écotoxicologique lié à l'introduction et à la présence des polluants dans l'environnement.

L'évaluation du risque écotoxicologique semble être une préoccupation majeure de nos concitoyens. En effet, une étude récente effectuée par le Comité Français d'Education pour la Santé (Le Monde, 4 octobre 2000) a montré que 3 thèmes liés à l'environnement et la sécurité alimentaire figurent parmi les 5 plus grandes craintes des français : ils concernent la pollution de l'air, les aliments pollués ou transformés et la pollution de l'eau. Ce résultat est aussi à rapprocher de la mauvaise information dont se plaignent également nos concitoyens, alors qu'une actualité fournie nous rappelle presque quotidiennement l'existence de nombreux problèmes.

Cette demande sociale est pleinement en accord avec le schéma d'orientation qui dessine les priorités scientifiques de l'INRA pour les 4 ans à venir, qui a été présenté à la presse par B. Hervieu (président) et M. Guillou (directrice générale) le 19 janvier 2001. Les priorités de recherche comprennent en particulier les **sciences de l'environnement** et la **sécurité des aliments**. Face aux inquiétudes ressenties par la population par rapport à la contamination de l'environnement et des denrées alimentaires par les produits chimiques dans leur ensemble, il convient en effet à un organisme comme l'INRA d'apporter des réponses à ces préoccupations ou du moins des éléments d'information. Enfin, le comité d'évaluation de l'Unité, réuni en octobre 2000, a souligné la pertinence des axes de recherche abordés de manière cohérente et pluridisciplinaire au sein de notre équipe.

En conséquence, je propose pour ma part de poursuivre la thématique de recherche que j'ai développée jusqu'à aujourd'hui, avec quelques évolutions.

Sur le plan cognitif, je renforcerai les études portant sur :

- **L'écodynamique des polluants**, en traitant particulièrement le cas des produits phytopharmaceutiques.

En effet, pour leur mise sur le marché et leur utilisation, ces derniers sont soumis à une procédure européenne d'homologation (directive EC 91/414) qui comprend en particulier une évaluation des risques reposant sur les dossiers fournis par les industriels demandeurs. Il s'ensuit que les études concernant le devenir des produits dans l'environnement, ainsi que leurs effets sur les organismes, sont effectuées directement par les industriels eux-mêmes. Les organismes de recherche publics se sont partiellement désengagés de ce type d'études. De plus, les résultats obtenus par les industriels restent leur propriété et sont maintenus confidentiels pendant une dizaine d'années. Une collaboration sera engagée avec les expertes de la Structure Scientifique Mixte (en charge de l'homologation des molécules phytosanitaires) afin de déterminer les molécules les plus pertinentes du point de vue de leur impact environnemental, pour lesquelles un complément d'études paraît nécessaire.

Dans ce programme seront en particulier abordés les schémas de transformation des pesticides dans les sols, ainsi que l'étude des facteurs régissant leur dégradation ou encore les risques de transfert dans les chaînes alimentaires. L'originalité de ce type d'études repose maintenant sur les modèles de pesticides pris en compte, qui comprennent notamment des produits issus de la transformation de molécules mères, ainsi que sur les techniques utilisables, principalement au niveau de l'analyse chimique et de l'identification structurale. Ce type d'études, réalisé dans les sols, apparaît complémentaire de programmes similaires développés dans d'autres unités de l'INRA chez les animaux et les plantes. Il s'intègre pleinement dans l'IFR Environnement et Gestion de l'Espace Régional (EGER) créé sur le centre de Versailles-Grignon, dont notre équipe constitue la composante majeure en biologie.

- **Les systèmes enzymatiques de biotransformation** chez les champignons filamenteux.

Ces systèmes, en raison de leur implication à la fois dans le devenir et les effets des polluants dans l'environnement et du peu de connaissance à leur égard, doivent faire l'objet de recherches très approfondies quant à leur structure, leur mécanisme d'action et leur régulation. De plus, un des aspects les moins connus actuellement concerne l'impact des xénobiotiques sur les systèmes enzymatiques intervenant dans le métabolisme cellulaire. L'induction de nouvelles voies métaboliques ou l'inhibition de voies constitutives peut entraîner, notamment chez les plantes, une accumulation de métabolites altérant leur saveur ou possédant des effets toxiques ou pharmacodynamiques (phénols, terpènes...). Ces processus sont susceptibles de se produire dans le cas des interactions plantes-champignons. Les approches biochimiques classiques montrent leurs limites dans ce contexte, les outils du génie biomoléculaire permettront de caractériser les systèmes enzymatiques d'intérêt, en impliquant clonage, séquençage, transformation (homologue ou hétérologue), mutagenèse dirigée. Une analyse de leur régulation sous l'effet de xénobiotiques, mais aussi de produits naturels est également envisagée.

Les actions engagées sur les laccases constituent notre programme à court terme. La finalité sera de disposer des outils nécessaires pour réaliser les études d'optimisation de l'efficacité de l'enzyme vis-à-vis de substrats pour lesquels nous disposons de données expérimentales (paramètres cinétiques, constante d'affinité, influence du pH). Ainsi, l'association de la mutagenèse dirigée et de la modélisation moléculaire devrait permettre de modifier le potentiel redox de la protéine.

A plus long terme, nous nous focaliserons sur les monooxygénases à cytochrome P450. L'approche moléculaire, en permettant l'expression de l'enzyme en quantité importante, permettra de mieux caractériser ces systèmes fongiques de biotransformation. Ce programme est désormais envisageable au sein de l'Unité en partenariat avec l'équipe Mode d'action des Fongicides, qui accueillera prochainement un biologiste moléculaire en partie dédié à cette thématique. Les connaissances acquises permettront d'élargir mes activités, actuellement essentiellement orientées dans le domaine de l'environnement, à des aspects plus agronomiques, comme par exemple l'étude de la métabolisation des fongicides chez les champignons filamenteux.

Sur le plan appliqué, les méthodes expérimentales et les modèles développés continueront à être valorisés dans des projets transversaux dans lesquels l'INRA est associé, en partenariat avec d'autres organismes de recherche et des universités.

- Dans ce contexte, je continuerai à développer avec l'Unité de Biotechnologie des Champignons Filamenteux de Marseille-Luminy le programme portant sur la **biodépollution des sols** industriels, dans le cadre du réseau franco latino-américain (BIAS, biotechnologies de l'environnement appliquées à la biodépollution de l'air et des sols).

- Je souhaite enfin poursuivre mes recherches vers l'utilisation des systèmes enzymatiques de biotransformation comme outil de bioindication de l'état des milieux (écosystèmes terrestres). Ces outils permettraient, dans un contexte agronomique, d'évaluer sur les (micro)organismes des sols le risque résultant de l'usage des pesticides, pour les plus persistants d'en évaluer les effets à long terme sur ces mêmes organismes.

Sur le plan environnemental, l'évaluation de l'état des sites et milieux pollués relève de la circulaire du 10 décembre 1999 qui doit permettre aux responsables territoriaux d'*apprécier l'existence effective ou potentielle de risques ou de nuisances*, pour en tirer les objectifs de réhabilitation à atteindre sur la base d'un niveau de risque résiduel acceptable. Comme il est très difficile d'identifier avec précision tous les contaminants présents dans un sol industriel, l'évaluation du risque lié à leur présence avant dépollution est capitale en ce qui concerne le recensement de sites pollués, et les décisions devant être prises en matière de gestion. L'évaluation doit conduire à la sélection de sites présentant *a priori* le plus de risques pour l'homme et son environnement, doivent faire l'objet d'expertises plus complètes et d'éventuelles actions de dépollution. Après traitement, il est également important d'évaluer le risque résiduel.

Cette évaluation du risque, tant à des fins agronomiques qu'environnementales, nécessite la mise au point de méthodes de mesure adaptées. En effet, on ne dispose pas actuellement d'approche entièrement satisfaisante utilisable dans le cas des écosystèmes terrestres. Notre objectif est d'utiliser les enzymes fongiques de biotransformation comme biomarqueurs d'effet et d'exposition aux xénobiotiques dans le cadre de tests d'écotoxicité.

Je terminerai en précisant que ce programme nécessite une complémentarité de compétences qu'il convient de renforcer soit au sein de l'équipe et de l'Unité, soit au travers de partenariats. En effet, seule une démarche scientifique pluridisciplinaire, associant physico-chimie, chimie, microbiologie, enzymologie et biologie moléculaire permettra de fournir rapidement les résultats escomptés.

V. BIBLIOGRAPHIE

- Alvinerie M., Sutra J.F., Galtier P., Toutain P.L. 1993. Cinétiques plasmatiques de l'ivermectine chez la vache. *Rec. Méd. Vétér.* 169:259-261.
- Arnold S.F., Klotz D.M., Collins B.M., Vonier P.M., Guillette L.J.Jr, McLachlan J.A. 1996. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 272:1489-1492.
- Asther, M., Corrieu G., Monties, B., Odier E. 1987. Ligninases : l'INRA fait feu de tout bois. *Biofutur* septembre 1997, pp. 55-60.
- Barr D.P. et Aust S.D. 1994. Mechanisms white rot use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol*, 28:78A-86A.
- Benveniste I. et Durst F. 1974. Mise en évidence dans les tissus de tubercule de topinambour (*Helianthus tuberosus L.*) d'une enzyme à cytochrome P-450, l'acide trans-cinnamique-4-hydroxylase. *C.R. Acad. Sci. Paris* 278:1487-1490.
- Black S.D. et Coon M.J. 1987. P-450 cytochromes: structure and function. *Adv. Enzymol.* 60:35-87.
- Bollag J.-M. et Liu S.-Y. 1990. Biological transformation processes of pesticides. *Dans Pesticides in the soil environment. Soil Science Society of America Book Series N°2*, pp. 162-208.
- Bourbonnais R. et Paice M.G. 1996. Enzymatic delignification of Kraft pulp using laccase and a mediator. *TAPPI J.* 79:199-204.
- Bourbonnais R., Paice M.G., Reid I.D., Lanthier P. et Yagushi M. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1876-1880.
- Boyer F.-D., Malosse C., Zagatti P., Einhorn J. 1997. Identification and synthesis of vesperal, the female sex pheromone of the longhorn beetle *Verperus xatarti*. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 134:757-764.
- Chaloux N., Bayona J.M., Albaiges J. 1994. Determination of nonylphenols as pentafluorobenzyl derivatives by capillary gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection in environmental matrices. *J. Chromatogr. A* 686:275-281.
- Chiu, S.H., Sestoskas E., Taub R., Buhs R., Green M., Vandenheuvel J.A., Arison B.H., Jacob T.A. 1986. Persistence of ivermectin in plasma and faeces in tissues of cattle, sheep and rats. *Drug. Metab. Dispos.* 14:590-600.
- de Cruz I., Lacroix G., Mougin C., Grolleau G. 1996. Residues of chlorinated pesticides in eggs of the gray heron (*Ardea cinerea L.*) : contribution of capillary gas chromatography ion-trap mass detection. *J. High Resol. Chromatogr.* 19:62-64.
- de Cruz I., Mougin C., Grolleau G. 1997. Chlorinated hydrocarbons in eggs of grey heron (*Ardea cinerea L.*) in France (Lac de Grandlieu). *Chemosphere* 35:1003-1009.
- Corio-Costet M.-F. et Benveniste P. 1988. Sterol metabolism in wheat treated by *N*-substituted morpholines. *Pestic. Sci.* 22:343-357.
- Dawson J.H. et Eble, K.S. 1986. Cytochromes P-450: heme iron coordination structure and mechanism of action. *Adv. Inorg. Bioorg. Mech.* 4:1-64.

- Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S, Brown S.H., Ostergaard P., Schneider P., Yaver, D.S., Pedersen A.H. et Davies G.J. 1998. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* 5: 310-316.
- Dur J.C., Rama R., Parola H., Chaplain V. 1999. Heterogenous dissolution of benzo[a]pyrene by surfactant solutions. *Colloids and Surfaces A* 162:249-257.
- Dur J.C., Rama R., Mougin C., Chaplain V. 2000. Solubilization of soil-bound PAHs by mixtures of surfactant solutions. *Polycyclic Aromatic Compounds* 20:143-154.
- Erikson D.C., Loehr R.C., Neuhauser E.F. 1993. PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. *Water Res.* 27:911-919.
- Ferris J.P., Fasco M.J., Stylianopoulou F.L., Jerina D.M., Daly J.W. et Jeffrey A.M. 1973. Monooxygenase activity in *Cunninghamella bainieri*: evidence for a fungal system similar to liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 156:97-103.
- Fournier J.-C. 1996. Accelerated biodegradation of pesticides. Dans *Pesticides, soil microbiology and soil quality*. SETAC Europe Editeur, Bruxelles, pp. 146-152.
- Gianfreda L., Xu Feng et Bollag J.-M. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed. J.* 3:1-25.
- Gonzalez A.G., Jimenez I.A., Ravelo A.G., Coll J., Gonzales J.A., Lloria J. 1997. Antifeedant and insecticidal activity of *Celestraceae* sesquiterpenes. *Biochem. Syst. Ecol.* 25:513-519.
- Harms H.H. 1996. Bioaccumulation and metabolic fate of sewage sludge derived organic xenobiotics in plants. *Science Total Environ.* 185:83-92.
- Higson F.K. 1991. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Rev. Environ. Contamin. Toxicol.* 122:111-153.
- Holroyd M.L. et Caunt P. 1994. Fungal processing: a second generation biological treatment for the degradation of recalcitrant organics in soil. *Land Contamin. Reclam.* 2:183-188.
- Jolivalt C., Brenon S., Caminade E., Mougin C., Pontié M. 2000. Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. *J. Membrane Sci.* 180:103-113.
- Jolivalt C., Raynal A., Caminade E., Kokel B., Le Goffic F. and Mougin C. 1999. Transformation of N',N'-dimethyl-N-(hydroxyphenyl)ureas by laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:676-681.
- Kollmann A., Mougin C., Ducrot P.-H. 2000. Vers une stratégie de bioconversion dans la recherche de nouveaux antitumoraux dérivés du resvératrol. Congrès de la Société Française de Chimie, Rennes.
- Laugero C., Mougin C., Sigoillot J.-C., Moukha S., Asther M. 1997. Comparison of static and agitated immobilized cultures of *Phanerochaete chrysosporium* for the degradation of pentachlorophenol and its metabolite pentachloroanisole. *Can. J. Microbiol.* 43:378-383.
- Laugero C., Sigoillot J.-C., Moukha S., Frasse P., Bellon-Fontaine M.-N., Bonnarme P., Mougin C., Asther M. 1996. Selective hyperproduction of manganese peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium* I-1512 immobilized on nylon net in a bubble-column reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:717-723.
- Li K., XU F. et Eriksson K.-E.L. 1999. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2654-2660.
- Lomascolo A., Stentelaire C., Asther M. et Lesage-Meessen L. 1999. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *TibTech.* 17:282-289.
- Mougin C., Boyer F.-D., Caminade E., Rama R. 2000. Cleavage of the diketone nitrile derivative of the herbicide isoxaflutole by extracellular fungal oxidases. *J. Agr. Food Chem.* 48:4529-4534.

- Mougin C., Cabanne F., Canivenc M.-C., Scalla R. 1990. Hydroxylation and N-demethylation of chlorotoluron by wheat microsomal enzymes. *Plant Sci.* 66:195-203.
- Mougin C., Cabanne F. et Scalla R. 1992. Additionnal observations on the chlorotoluron hydroxylase and N-demethylase activities in wheat microsomes. *Plant Physiol. Biochem.* 30:769-778.
- Mougin C.P., Corio-Costet, M.-F. and Werck-Reichhart, D. 2001. Plant and fungal cytochrome P450's: their role in pesticide transformation. *Dans Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences.* Hall C., Hoagland R. & Zablutowicz, R. eds, ACS Book n°777, Washington, Chapter 9, pp. 166-181.
- Mougin C., Dubroca J. and Barriuso E. 1996. On-line supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography for determination of triazine compounds in soil. *J. High Resol. Chromatogr.* 19:700-702.
- Mougin C., Laugero C., Asther M. and Chaplain V. 1997a. Biotransformation of *s*-triazine herbicides and related degradation products in liquid cultures by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Pestic. Sci.* 49:169-177.
- Mougin C., Laugero C., Asther M., Dubroca J., Frasse P., Asther M. 1994. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:705-708.
- Mougin C., Pericaud C., Dubroca J., Asther M. 1997b. Enhanced mineralization of lindane in soils supplemented with the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biol. Biochem.* 29:1321-1324.
- Mougin C., Pericaud C., Malosse C., Laugero C., Asther M. 1996. Biotransformation of the insecticide lindane by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Pestic. Sci.* 47:51-59.
- Mougin C., Polge N., Scalla R., Cabanne F. 1991. Interactions of various agrochemicals with cytochrome P-450-dependent monooxygenases of wheat cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 40:1-11.
- Ohkawa H., Tsujii H., Ohkawa Y. 1999. The use of cytochrome P450 genes to introduce herbicide tolerance in crops: a review. *Pestic. Sci.* 55:867-874.
- Park S.H., Chae Y.A., Lee H.J., Lim Y.H., Kim S.U. 1994. Production of (-)-7-hydroxyisopiperitenone from (-)-isopiperitenone by a suspension cell culture of *Mentha piperita*. *Planta Med.* 60:374-375.
- Pryce R.J. 1983. The search for new agrochemicals leads from natural sources. *Dans Natural products form innovative pest management.* Whitehead D. L. et Bowers W. S. Editeurs, Pergamon Press, New-Pergamon Press, New-York, 1^o édition.
- Rama-Mercier R., Mougin C., Sigoillot J.-C., Sohier L., Chaplain V. and Asther M. 1998a. Wet sand cultures to screen filamentous fungi for the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnol. Tech.* 12:725-728.
- Rama R., Mougin C., Boyer F.-D., Kollmann A., Malosse C. and Sigoillot J.-C. 1998b. Biotransformation of benzo[a]pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Biotechnol. Letters* 20:1101-1104.
- Rama R., Mougin C., Malosse C., Chaplain V., Sigoillot J.-C. and Asther M. 2000. Biotransformation of PAHs by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Dans Remediation of Hazardous Waste Contaminated soils*, 2nd edition. Wise D.L., Trantolo D.J., Cichon E.J., Inyang H.I., Stottmeister U. eds., Dekker Marcel Inc., New York, Chapter 23, pp. 365-372.
- Rama R., Sigoillot J.-C., Chaplain V., Asther M. and Mougin C. 2001. Inoculation of filamentous fungi in manufactured gas plant site soils and PAH transformation. *Polycycl. Aromat. Comp.* (18, sous presse).
- Robineau T., Batard Y., Nedelkina S., Cabello-Hurtado F., LeRet M., Sorokine O., Didierjean L. and Werck-Reichhart, D. 1998. The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. *Plant Physiol.* 118:1049-1056.

- Routaboul J.-M., Mougin C., Ravanel P., Tissut M., Mrlina G., Calmon J.-P. 1991. Effects of *N,N'*-bis-(4-trifluoromethylphenyl)-urea on isolated plant mitochondria and thylakoid membranes. *Phytochemistry* 30:733-738.
- Salaun J.P., Benveniste I., Reichhart D. et Durst F. 1978. A microsomal (cytochrome-P-450)-linked lauric acid monooxygenase from aged Jerusalem artichoke tuber tissues. *Eur. J. Biochem.* 90:155-159.
- Seitz L.M., Mohr H.E., Burroighs R., Sauer D.B. 1977. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chem.* 54:1207-1217.
- Sigoillot J.-C., Herpöel I., Frasse P., Moukha S., Lesage-Meesen L. and Asther M. 1999. Laccase production by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* derived from a dikaryotic strain. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15:481-484.
- Siminsky, B., Corbin, F. T., Ward, E. R., Fleischmann T. J. and Dewey, R. E. 1999. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1750-1755.
- Sipes I.G. et Gandolfi A.J. 1991. Biotransformation of toxicants. *Dans Casarett and Doull's toxicology: The basic science of toxicants.* Amdur M. O., Doull J. et Klaassen Editeurs, Pergamon Press, New-York, 4^e édition.
- Soto A.M., Justicia H., Wray J.W. et Sonnenschein C. 1991. *P*-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environ. Health Persp.* 92:167-173.
- Suart I.A., MacLachlan J. et McNaughtan A. 1996. Compounds of agricultural significance using environmental analytical supercritical fluid extraction. *The Analyst* 121:11R-28R.
- Thibaut R., Debrauwer L., Rao D. et Cravedi J.-P. 1998. Characterization of biliary metabolites of 4-*n*-nonylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* 28:745-757.
- Thurston C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19-26.
- Vanden Bossche H. et Koymans L. 1998. Review article: cytochromes P450 in fungi. *Mycoses* 41:32-38.
- van den Brink H.J.M., van Gorcom R.F.M., van den Hondel C.A.M.J.J. et Punt P.J. 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Gen. Biol.* 23:1-17.
- Weissenfels W.D., Kleber H.-J., Langhoff J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particules: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:689-696.
- Werck-Reichhart D. 1995. Herbicide metabolism and selectivity: role of cytochrome P450. Brighton Crop Protection Conference Weeds, part 7B-1, 813-822.