UNIVERSITÉ DE STRASBOURG





## ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ [UMR 7242 - Biotechnologie et signalisation cellulaire]



## [Sébastien DAVID]

soutenue le : 13 novembre 2019

pour obtenir le grade de : Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline/ Spécialité : Biotechnologie

## Altération de déchets amiantés par des bactéries et des sidérophores en vue du développement d'un procédé de bioremédiation

INVITÉS : [M. REGIS Robert]	Dr., SOMEZ Montpellier
AUTRES MEMBRES DU JURY : [Mme. SCHMITT Anne-Désirée]	Dr., université de Strasbourg
RAPPORTEURS : [M. LEBEAU Thierry] [M. ECHEVARRIA Guillaume]	Pr., université de Nantes Pr., université de Lorraine
THÈSE dirigée par : [Mme. GEOFFROY Valérie]	Dr., université de Strasbourg

[M. REGIS Robert] [M. BORDEBEURE Sylvain] [M. CAMBON Olivier] Dr., SOMEZ Montpellier Ing., ADEME Angers Pr., université de Montpellier











à Emilie et Ellia ...

### **Remerciements**

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, le Pr. Thierry Lebeau, le Pr. Guillaume Echevarria et le Dr. Anne-Désirée Schmitt pour avoir accepté de juger ce travail. Je tiens à remercier le Dr. Jean-Luc Galzi, directeur de l'unité UMR 7242 de m'avoir acceuilli au sein de l'unité.

Je tiens à remercier le Dr. Isabelle Schalk et le Dr. Gaëtan Mislin de m'avoir acceuilli au sein de l'équipe « Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications », où j'ai eu l'opportunité d'effectuer ma thèse.

Je voudrais particulièrement exprimer mes remerciements au Dr. Valérie Geoffroy, pour son encadrement lors de ma thèse. Merci à toi pour tout ce que tu m'as apporté. Merci pour tous tes conseils scientifiques, pour ta confiance durant ces trois années. Merci de m'avoir laissé une grande liberté dans le choix des expériences, même lors de mes expériences « MacGyver » ou mes tests un peu farfelus notamment avec le jus de choucroute dont l'odeur restera dans nos narines ! Merci pour tout le temps que tu as pris durant ces années, notamment lors des différentes expériences qui ont parfois terminé tard et surtout lors de l'écriture des articles qui nous ont pris quelques week-end et soirées (je m'excuse d'ailleurs auprès de Philippe... :-P). Je pense que nous avons eu une très bonne complémentarité durant ce projet et gràce à toi j'ai passé de très belles années de thèse que je n'oublierai pas.

Merci à tous les membres de l'équipe, déjà partis ou encore présents. Béa, ma marseillaise préférée et ma voisine de bureau durant deux ans et demi. Merci pour ta bonne humeur, pour nos discussions et nos rigolades (Ok !!!). Merci à mes autres voisines de bureau Anne et Gwen qui sont devenues de vraies amies et avec qui j'ai partagé de très bons moments. Nos pauses « commères » vont me manquer ;-). Merci à Gaëtan et Françoise (ma future voisine) pour leur bonne humeur et leurs passages réguliers dans notre bureau pour manger des gâteaux :-P. Merci à Véro la chasseuse de croix (la gourmandise est un vilain défaut :-P). Merci à Quentin avec qui j'ai pu faire honneur à la bière lors des barbecues ;-). Merci à Anne F., Coraline et Pierre pour leur extrême gentillesse. Merci à Ana, Aurélie, Mathilde et Vincent.

Je voudrais également remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de ces années, notamment les différents membres des équipes du 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> étage.

Merci à Pascaline sans qui je n'aurais pas pu effectuer mes deux années de monitorat et merci à Salah qui fut mon formateur et qui m'a transmis le plaisir d'enseigner.

Je tiens à remercier Sylvain Bordebeure (ADEME) pour avoir suivi mon travail au cours de ces trois années ainsi que toute la cellule thèse de l'ADEME (Valérie Pineau, Maguy Favreliere et Nicolas Tonnet). Je remercie également l'ADEME de m'avoir accordé une bourse m'ayant permis d'effectuer mon doctorat. Je tiens aussi à remercier le Dr. Robert Regis, gérant de la Société Méditerranéenne des Zéolithes (SOMEZ) pour avoir financé cette thèse.

Je remercie aussi tous les collaborateurs du projet. Merci à Olivier Cambon et Gaël Talbi pour la préparation et l'analyse des échantillons d'amiante. Merci à Jean-Michel Chiapello, gérant de l'entreprise CEFASC Environnement sans qui nous n'aurions pas eu de déchets de fibrociment. Merci à Erwann Hamon et Raphael Recht d'AERIAL pour les analyses effectuées sur le petit lait. Je tiens également à remercier Dris Ihiawakrim sans qui nous n'aurions pas eu d'aussi belles images de microscopie et des analyses aussi intéressantes.

Je tiens aussi à remercier tous mes stagiaires : Dylan, Caroline, Sarah F., Sarah S., Kevin, Agathe, Joshua, Clara, Lea, Maria. Ce fut une expérience très enrichissante qui m'a permis d'avancer dans mon projet.

Merci à mes amis de plus ou moins longue date qui m'ont toujours soutenu sans savoir exactement ce que je faisais :-P : Florian, Amélie, Fred, Maxime, Lisa, Yannick et Aurélie.

Un grand merci à ma famille et ma belle-famille de m'avoir supporté pour aller si loin. Merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu et qui ont toujours été présent autour de moi. Un grand merci à mon grand-père pour son soutien tout au long de mes études.

Pour finir, je dédie cette thèse à Emilie et Ellia, mes deux amours. Merci Emilie pour tout ce que tu as fait pour moi pendant cette thèse. Ces trois ans de thèse ont été remplis de belles choses et de grands projets. Merci de m'avoir supporté dans les moments de bonheur comme dans les moments difficiles...

# **SOMMAIRE**

apitre 1: Les amiantes	
Nature des annantes     Origine géologique	
<ol> <li>Origine geologique</li> <li>Structure cristalline des fibres</li> </ol>	
2. Structure cristalline des libres	••••••
h Amnhibale	••••••••••••••••
3 Pronriétés des amiantes	••••••••••••••••
a. Composition chimique	
b. Propriétés physiques	
c. Propriétés chimiques	
II. Production et utilisation	
1. Principaux producteurs	
2. Usage industriel de l'amiante	
III. Impact sur la santé	
1. Biopersistance	
2. Pathologies	
a. Toxicité chronique	
b. Effets cancérogènes	
IV. Réglementation et détection	
1. Réglementations et recommandations face à l'amiante	
2. Méthodes de détection de l'amiante	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
V. Gestion des déchets	,
1. Procédés de traitement utilisés en France	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
a. Le stockage en centre d'enfouissement	
b. Vitrification par fusion plasma	••••••••••••••••••••••••••••••
2. Traitements en développement	
a. Solidification et stabilisation de l'amiante	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
<ul> <li>D. I faitements thermques</li> <li>Traitements méaoniques.</li> </ul>	
d Traitements chimiques	•••••••
e Traitements biologiques	•••••••••••••••
<u>apitre 2</u> : Interactions entre les micro-organismes et les minéraux	ζ
I. Mécanismes physiques d'altération des minéraux	
II. Altérations biochimiques	
1. Réaction d'oxydo-réduction	
2. Libération d'acides organiques	

Chapitre 3: Acquisition du fer et du magnésium chez Pseudomonas ......47

I.	Importance des métaux chez les bactéries	49
II.	Sources de fer et de magnésium	51
1.	Le fer dans l'environnement	
2.	Accessibilité du magnésium	
III.	Mécanismes d'acquisition du fer chez les bactéries du genre Pseudomonas.	52
1.	Acquisition par les sidérophores	
	a. La pyoverdine : principal sidérophore chez les Pseudomonas fluorescents	
	La biosynthèse des pyoverdines	
	Sécrétion, import et recyclage de la pyoverdine	
	Régulation de la voie pyoverdine	59
	b. Production de sidérophores secondaires	60
	Voie de biosynthèse de la pyochéline	
	Sécrétion et import de la pyochéline	
	Régulation de la voie pyochéline	
	c. Utilisation de sidérophores exogènes	
2.	Utilisation de l'hème par les pseudomonades	
3.	Autres systèmes d'acquisition du fer	
	a. Acquisition du fer ferreux via les phénazines	
4	b. Système d'import du fer ferrique	
4.	Regulation de l'acquisition du fer	
	a. Regulation via la proteine Fur	
117	<ul> <li>D. Les petits AKN regulateurs</li> <li>Méconismos d'acquisition du mognérium</li> </ul>	
IV.	Miecanismes d'acquisition du magnesium	
1.	Acquisition du magnesium	
Ζ.	Kegulation	
<u>Chapi</u>	tre 4: Altération biologique de l'amiante	73
I.	Altération par différents organismes	76
1.	Capacité des champignons à altérer l'amiante	
2.	Altération par les lichens	77
3.	Utilisation des plantes	
4.	Potentiel de dégradation des bactéries	
II.	Dissolution des amiantes via les sidérophores	82
III.	Dégradation de l'amiante par les acides organiques	83
Object	ifs	87
Deuxiè	me Partie: Résultats	
<u>Chapi</u>	tre 5: Altération d'amiantes natifs	91
I.	Introduction	93
II.	Contribution des auteurs	95
III.	Résumé des résultats obtenus sur l'altération des amiantes natifs	95
<u>Chapi</u>	tre 6: Altération de déchets de flocage	97
I.	Introduction	99
II.	Contribution des auteurs	101
III.	Résultats complémentaires (non publiés)	101

1.	Composition des déchets de chrysotile gypse	101
2.	Etude de l'altération de déchets de chrysotile-gypse par les pyoverdines	102
	a. Altération sur le long terme par les pyoverdines	102
	b. Effet de la concentration en pyoverdine sur l'altération du chrysotile-gypse	103
3.	Altération des déchets de chrysotile-gypse par les bactéries du genre <i>Pseudomonas</i>	105
	a. Dépendance des <i>Pseudomonas</i> au magnésium	105
	b. Cinétique d'altération du chrysotile-gypse en présence de <i>Pseudomonas mandelii</i> SB8.	.3
		107
	c. Comparaison de l'altération du milieu succinate et casaminoacides sur des déchets de	111
	Ilocage	111
	u. Alteration sur le long terme de déchets de chrysothe-gypse par <i>rseudomonus mandelli</i>	112
IV	Bilan d'altération des déchats de flocage par les <i>Psaudomonas</i> et les pyoyerdines	
1	bhan a alteration des dechets de notage par les r seudomonds et les pyoverames	
Chapi	tre 7: Altération de déchets de fibrociment	121
I.	Introduction	123
II.	Résultats	125
1.	Composition des déchets de fibrociment	125
2.	Etude de l'altération de déchets de fibrociment par les pyoverdines	125
	a. Efficacité des pyoverdines dans l'altération de tuile de toit en fibrociment	125
	b. Altération sur le long terme par les pyoverdines	128
3.	Altération des déchets de chrysotile-gypse par les bactéries du genre Pseudomonas	. 130
	a. Suivi de l'expression des voies sidérophores en présence de fibrociment	130
	b. Implication de la pyoverdine et de la pyochéline dans l'altération du fibrociment	131
III.	Bilan d'altération des déchets de fibrociment par les pyoverdines et les	
	Pseudomonas	135
<u>Chapi</u>	tre 8: Altération de déchets amiantés par des acides organiques	139
I.	Introduction	141
II.	Résultats	143
1.	Altération du chrysotile-gypse par des solutions d'acides organiques	143
	a. Comparaison d'altération entre le jus de choucroute et le petit lait	143
	b. Altération du chrysotile-gypse par du petit lait inoculé avec Lactobacillus plantarum	. 146
2.	Altération de tuyau de fibrociment par du jus de choucroute ou du petit lait	148
3.	Altération de tuile de toit en fibrociment par du petit lait en présence de <i>Lactobacillus</i>	
	plantarum	149
4.	Production d'acides organiques par <i>Lactobacillus plantarum</i> en présence de déchets	
	amiantés	151
III.	Bilan d'altération des déchets amiantés par des solutions d'acides organiques	153
<b>—</b> • • •		
Troisiè	me Partie : Conclusions et Perspectives	.157
Quatri	ème Partie : Matériels et Méthodes	165
Bibliog	raphie	183
Annexe	2S	201
Monito	rat	211
Comme		
Comm	unications scientifiques	215

# Liste des tableaux et des figures

Tableau 1 : Composition et caractéristiques des fibres d'amiantes       7
Tableau 2: Valeurs limites d'exposition professionnelle aux fibres d'amiante dansdifférents pays21
Tableau 3: Différentes pyoverdines variant par leurs chaînes peptidiques et leurs pointsisoélectriques
Tableau 4: Sidérophores secondaires produits par des pseudomonades et leurs activitésbiologiques ou chimiques61
Tableau 5 : Pourcentage de perte de croissance entre 2 et 0,2 mg/L de Mg dans du milieusuccinate de différentes espèces de <i>Pseudomonas</i> après 35,5 h de culture
<b>Tableau 6</b> : Concentrations en acides organiques (acide et base conjuguée) identifiés dansle petit lait non traité et dans le petit lait avec ajout de Lactobacillus plantarum incubéavec ou sans chrysotile-gypse ou fibrociment durant 72 h152
Figure 1 : Représentation schématique d'une fibre de chrysotile
Figure 2: Représentation schématique d'une chaine simple et d'une double chaine de silicate tétraédrique
Figure 3 : Structure cristalline d'une amphibole vue le long de l'axe c
Figure 4 : Structure d'une amphibole monoclinique vue du dessous par rapport à l'axe c 12
Figure 5 : Mine d'amiante à ciel ouvert (mine Jeffrey dans la région d'Asbestos, Québec, Canada)
Figure 6 : Production mondiale d'amiante entre 1920 et 2000
Figure 7 : Mécanismes possibles de la carcinogénèse induits par les fibres d'amiante
Figure 8 : Principaux produits amiantés dans les bâtiments
Figure 9 : Casier amiante en cours d'exploitation
Figure 10 : Cofalit obtenu après vitrification de déchets amiantés
Figure 11 : Voie de décomposition du chrysotile à haute température
Figure 12 : Voie de décomposition de la trémolite à haute température
Figure 13 : Dissolution du chrysotile dans une solution d'acide fluorosulfurique
Figure 14 : Principales interactions entre les micro-organismes et les minéraux
Figure 15 : Différentes étapes de formation d'un biofilm multi-espèces sur une surface rocheuse
Figure 16 : Réactions d'oxydo-réduction en utilisant les minéraux comme accepteurs et
donneurs d'électron pour la respiration des micro-organismes41

<b>Figure 18</b> : Différentes structures de sidérophores et les groupes fonctionnels impliqués dans la chélation du fer
Figure 19 : Tableau périodique des éléments chimiques
Figure 20 : Structure de la pyoverdine I produite par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 54
<b>Figure 21</b> : A : Etape d'assemblage du précurseur cytoplasmique de la pyoverdine (PVDI) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> effectuées dans le sidérosome B : Voie de biosynthèse de PVDI
<b>Figure 22</b> : Schéma de la biosynthèse, de la sécrétion, de l'import et du recyclage de la pyoverdine chez <i>Pseudomonas fluorescens</i> A506
Figure 23 : Les principales voies de régulation de la production de pyoverdine60
Figure 24 : Structure de la pyochéline I produite par <i>P. aeruginosa</i>
Figure 25 : Voie de biosynthèse de la pyochéline chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Figure 26 : Voie d'import de la pyochéline chez Pseudomonas aeruginosa
Figure 27: Les systèmes d'acquisition de l'hème Phu et Has chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<u>Figure 28</u> : Représentation schématique des trois grandes familles de transporteurs de magnésium
<b>Figure 29</b> : Systèmes de régulation des transporteurs MgtA chez <i>Salmonella</i> (a) et MgtE chez <i>Bacillus subtilis</i> (b)71
<b>Figure 30</b> : Représentation schématique des processus de phytoextraction du nickel par la plante hyperaccumulatrice <i>Leptoplax emarginata</i>
<b>Figure 31</b> : Représentation schématique des mécanismes favorisant la croissance végétale des bactéries rhizosphériques dans les sols serpentiniques
<b>Figure 32</b> : Schéma illustrant le mécanisme d'altération des exudats microbiens sur des fibres d'amiante via la chélation du fer
<b>Figure 33</b> : Procédé de traitement de déchets de fibrociment, utilisant la fermentation obscure, un traitement hydrothermal et une digestion anaérobie
<b>Figure 34</b> : Extraction de magnésium de déchets de chrysotile-gypse après des cycles de 24 et 96 heures en présence de surnageants de culture de <i>Pseudomonas mandelii</i> SB8.3 ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, contenant 100 $\mu$ M (T24-1 à 9 et T96-1 à 7) ou 200 $\mu$ M (T24-C et T96-C) de pyoverdine
<b>Figure 35 :</b> Effet de différentes concentrations en pyoverdine produite par <i>Pseudomonas mandelii</i> SB8.3 sur la dissolution du fer (A) et du magnésium (B) de déchets de chrysotile-gypse après 24, 48 et 96 heures de contact
<b>Figure 36</b> : Cinétique de croissance de différentes espèces de <i>Pseudomonas</i> dans du milieu succinate, contenant différentes concentrations en Mg allant de 0 à 2 mg/L 106
<b>Figure 37</b> : Suivi de la croissance de <i>Pseudomonas mandelii</i> SB8.3 durant 24 heures dans un milieu succinate avec (Succ) ou sans magnésium (Succ-Mg) en présence ou non de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY)
<b>Figure 38</b> : Suivi de la concentration en pyoverdine après 24 heures de croissance de <i>Pseudomonas mandelii</i> SB8.3 dans un milieu succinate avec (Succ) ou sans magnésium (Succ-Mg) en présence ou non de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY)109

**Figure 45**: Pourcentage de fer (A) et de magnésium (B) extrait dans des déchets de chrysotile-gypse, après 10 cycles de 24 heures en présence de *Pseudomonas mandelii* SB8.3

**Figure 54** : Cinétique d'extraction de fer (A) et de magnésium (B) de déchets de chrysotilegypse durant 96 h en présence de petit lait avec ou sans ajout de *Lactobacillus plantarum*. 147

Figure 61 : Schéma de principe d'un procédé de bioremédiation de déchets amiantés...... 162

# Liste des abréviations

**ABC** : ATP Binding Cassette ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie ADN : Acide DésoxyriboNucléique ARN : Acide RiboNucléique ATP : Adénosine TriPhosphate **CAA** : Milieu Casaminoacides CAA-Mg : Milieu Casaminoacides sans Magnésium **CHR-GY** : Chrysotile-Gypse **DO** : Densité Optique EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétraacétique Fibro : Fibrociment Fur : Ferric uptake regulator META : Microscopie Electronique à Transmission Analytique MOLP : Microscopie Optique à Lumière Polarisée NRPS : Non Ribosomal Peptide Synthase **PCH** : Pyochéline **PVD** : Pyoverdine **ROS** : Reactive Oxygen Species Succ : Milieu Succinate Succ-Mg : Milieu Succinate sans Magnésium Surn : Surnageant **UFC** : Unité Formant Colonie

### **Introduction**

En 1997, compte tenu de ses effets néfastes sur la santé, l'utilisation de l'amiante a été interdite en France sans qu'aucun procédé de traitement des déchets amiantés ne soit envisagé. Le désamiantage des bâtiments est actuellement un challenge entrainant la gestion de tonnages importants de déchets. Néanmoins, seules deux méthodes, non satisfaisantes, de gestion des déchets sont à l'heure actuelle utilisées, l'enfouissement ou la vitrification par la technologie plasma. Le développement de nouveaux procédés de traitement de l'amiante est donc devenu nécessaire.

L'objectif de ce travail de thèse a été de comprendre dans un premier temps les interactions entre les sidérophores bactériens ou les bactéries et les différents matériaux contenant de l'amiante telles que les amiantes natifs, les déchets de flocage et les fibrociments. Dans un deuxième temps, une voie utilisant des déchets organiques tels que le jus de choucroute ou le petit lait a été testée compte tenu de la sensibilité des matériaux ou de leur matrice aux solutions acides. Enfin, l'objectif à long terme est le développement d'un procédé de bioremédiation. Nos recherches se sont focalisées plus particulièrement sur l'utilisation des sidérophores et plus précisément des pyoverdines, des bactéries du genre *Pseudomonas* et de solutions d'acides organiques afin de traiter les déchets amiantés.

Dans la première partie de ce manuscrit, une synthèse bibliographique est divisée en quatre chapitres. Le premier permettra de mieux connaître les amiantes et la législation. Le deuxième décrira la capacité des micro-organismes à altérer les minéraux présents dans l'environnement. Le troisième fera un état de l'art des connaissances sur l'acquisition du fer et du magnésium chez les bactéries du genre *Pseudomonas*, en mettant l'accent sur les voies sidérophores qui ont été au centre d'une grande partie des recherches effectuées lors de cette thèse. Pour finir le quatrième chapitre se focalisera sur les connaissances actuelles concernant l'altération biologique des amiantes. Cette synthèse bibliographique, non exhaustive, permettra de fixer les objectifs, de comprendre les enjeux de ce projet et d'analyser les résultats obtenus durant ce travail.

La deuxième partie de ce manuscrit sera consacrée à la présentation et la discussion des résultats présentés sous forme de trois publications et de résultats complémentaires obtenus durant cette thèse. Le chapitre 5 portera sur l'altération des amiantes natifs (publication en révision dans Journal of Hazardous Materials, resoumission le 29/09/19, IF

7,6). Le chapitre 6 sera consacré aux traitements des déchets de flocage par les sidérophores bactériens (publication soumise dans Environmental Science and Technology, IF 7,1) et les bactéries (publication soumise dans Science of the Total Environment, IF 5,6). Le chapitre 7 portera sur les mêmes traitements testés sur les fibrociments. Le chapitre 8 s'est focalisé sur l'altération des deux déchets par une voie intéressante apparue au cours de la thèse utilisant les acides organiques.

La troisième partie permettra de mettre en perspective les résultats et de faire un bilan des mécanismes biologiques impliqués dans d'altération des déchets amiantés et de proposer un procédé de bioremédiation. Enfin, **la quatrième** et dernière partie de ce travail décrira les méthodes et les protocoles détaillés utilisés lors de cette thèse.

# Synthèse bibliographique

# **Chapitre 1**

# Les amiantes

## I. <u>Nature des amiantes</u>

L'amiante est un terme industriel désignant certains minéraux à textures fibreuses. Ce sont plus précisément des silicates fibreux qui forment deux groupes minéralogiques :

- Les serpentines dont la variété fibreuse la plus courante est le **chrysotile** (Toyokuni, 2009; Robinson and Bromberg, 2016).
- Les amphiboles comportant cinq espèces minérales : l'anthophyllite, l'amosite, l'actinolite, la trémolite et la crocidolite. Deux ont été très utilisées : l'amosite (ou grunérite amiante, amiante brun) et la crocidolite (amiante bleu) (Toyokuni, 2009; Robinson and Bromberg, 2016).

Les trois principales espèces minérales qui ont été utilisées au niveau industriel sont le chrysotile, l'amosite et la crocidolite (Ruffié and Margery, 2007; Toyokuni, 2009; Scherpereel, 2016). Ces variétés d'amiantes sont des silicates (Toyokuni, 2009; Robinson and Bromberg, 2016), c'est-à-dire composées essentiellement d'atomes de silicium (Si) et d'oxygène (O) structurés en tétraèdres silicate (SiO<sub>4</sub>) qui peuvent se combiner avec plusieurs éléments (**Tableau 1**) :

- Le magnésium pour la chrysotile : Mg<sub>6</sub>Si<sub>4</sub>O<sub>10</sub>(OH)<sub>8</sub> (Toyokuni, 2009).
- Le magnésium et le fer pour l'amosite : (Fe, Mg)<sub>7</sub>Si<sub>8</sub>O<sub>22</sub>(OH)<sub>2</sub> (Toyokuni, 2009).
- Le fer et le sodium pour la crocidolite :  $Na_2(Fe^{3+})_2(Fe^{2+})_3Si_8O_{22}(OH)_2$  (Toyokuni, 2009).

Name	Composition	Source	Morphology
Chrysotile	$Mg_6Si_4O_{10}(OH)_8$	U.S. and Canada	Curly, pliable
Crocidolite	$Na_2(Fe^{3+})_2(Fe^{2+})_3Si_8O_{22}(OH)_2$	South Africa Western Australia	Rodlike, durable
Amosite	$(Fe, Mg)_7 Si_8 O_{22} (OH)_2$	South Africa	Rodlike, durable
Anthophyllite	$(Mg, Fe)_7 Si_8 O_{22} (OH)_2$	Finland	Rodlike, durable
Tremolite	$Ca_2Mg_5Si_8O_{22}(OH)_2$	Exists in some deposits of Canadian chrysotile	Rodlike, durable
Actinolite	$Ca_2(Mg, Fe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$	Not mined	Rodlike, durable

Tableau 1 : Composition et caractéristiques des fibres d'amiantes (Toyokuni, 2009).

#### 1. Origine géologique

De nombreuses roches présentes dans l'environnement, nommées roches « mères », sont capables de former des minéraux asbestiformes ou amiantes. Le processus de cristallisation de serpentines et/ou d'amphiboles se produit grâce à la composition chimique de ces roches et aux conditions physico-chimiques du milieu. Les principales roches « mères » présentant des minéraux asbestiformes sont :

- Les roches magmatiques basiques et ultrabasiques, pauvres en silice et riches en magnésium et en fer. Comme par exemple les métagabbros et les serpentinites (Gosen, 2007; Lahondère *et al.*, 2014).
- Les dolomites, marbre dolomitiques et calcaires dolomitiques (Gosen, 2007; Lahondère *et al.*, 2014).
- Les formations ferreuses (Gosen, 2007; Lahondère et al., 2014).
- Les intrusions alcalines et les carbonatites (Gosen, 2007; Lahondère et al., 2014).

En plus de la composition des roches « mères », les paramètres physico-chimiques subis par celles-ci sont indispensables à l'apparition de minéraux asbestiformes. Il existe deux principaux phénomènes nécessaires à l'apparition des amiantes.

- Les phénomènes de métamorphisme (transformations subies par une roche du fait d'une variation de pression et/ou de température) et de métasomatisme (métamorphisme avec modification de la composition chimique des roches) (Lahondère *et al.*, 2014).
- Les contraintes tectoniques (pression exercée sur les roches par l'action des forces tectoniques), permettant la circulation de fluides hydrothermaux (Lahondère *et al.*, 2014).

Lors du processus de transformation des roches « mères », les minéralisations asbestiformes se localisent dans les zones où la perméabilité aux fluides est augmentée (réseaux de fractures et zones de cisaillements) (Lahondère *et al.*, 2014). La formation des différentes espèces d'amiantes est variable en fonction des conditions de pression et de température. Par exemple, la formation d'amiante-actinolite, d'amiante-trémolite, de chrysotile se produit lors d'un métamorphisme caractérisé par de basses pressions et de basses températures alors que l'anthophyllite se forme lors d'un métamorphisme à une température et à une pression moyenne à haute (Lahondère *et al.*, 2014).

#### 2. <u>Structure cristalline des fibres</u>

Les fibres asbestiformes sont caractérisées par une cristallisation et une morphologie spécifique. Ces fibres, très longues et très fines, se rassemblent en faisceau et/ou agglomérat à partir desquels des fibrilles extrêmement fines peuvent être libérées (Lahondère *et al.*, 2014).

#### a. <u>Serpentine</u> :

Le chrysotile est un silicate de magnésium hydraté dont la composition chimique est  $Mg_6Si_4O_{10}(OH)_8$  (Toyokuni, 2009). Les silicates sont des minéraux structurés en tétraèdres, avec un atome de silice central qui est entouré de quatre atomes d'oxygène. La structure cristalline du chrysotile se présente sous la forme d'un feuillet enroulé, composée d'une couche de tétraèdre de silicate  $(SiO_4)^{4-}$  et d'une couche octaédrique de brucite  $Mg(OH)_2$  (**Figure 1**). Les deux couches sont reliées entre elles par des atomes d'oxygène, situés aux sommets des tétraèdres, qui remplacent deux groupements hydroxyles sur trois au niveau du feuillet brucitique (Bernstein *et al.*, 2013). Ces couches vont donc former un feuillet qui pour compenser la différence de dimension, va tendre à se recourber et former un cylindre creux de 25 nm de diamètre environ et composé d'environ 12 à 20 couches (Virta, 2002; Bernstein *et al.*, 2013). Ces cylindres sont appelés fibrilles et forment après agglomération la fibre de chrysotile qui possède un diamètre total de l'ordre de 0,1 à 1 µm (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018) et une longueur de quelques millimètres (Virta, 2002; Dériot and Godefroy, 2005). Ces fibres présentent une courbure qui est typique du chrysotile (Douguet *et al.*, 1997).



Figure 1 : Représentation schématique d'une fibre de chrysotile (Bernstein et al., 2013).

#### b. <u>Amphibole</u>:

Les amphiboles sont des silicates qui sont combinés avec différents éléments, suivant le type d'amiante. La principale caractéristique de la structuration cristalline des amphiboles est l'assemblage par leurs oxygènes, de deux chaînes simple de silicate tétraédrique, formant une double chaîne qui s'étend le long de l'axe cristallographique c (direction d'élongation du

cristal) (Simmons, 2016). Les tétraèdres partagent alternativement deux et trois atomes d'oxygène produisant un ratio silice oxygène de 4:11 (Simmons, 2016). Les doubles chaines de silicate se répètent à un intervalle d'environ 5,3 angströms (Å), définissant l'axe c de la maille élémentaire ou unité cellulaire (Simmons, 2016) (**Figure 2**).



<u>Figure 2</u> : Représentation schématique d'une chaine simple et d'une double chaine de silicate tétraédrique (Simmons, 2016).

La **Figure 3**, représentant la structure cristalline vue le long de l'axe c, montre les doubles chaines ainsi que les couches octaédriques avec lesquels elles se lient. En effet, les doubles chaines sont séparées des autres doubles chaines et liées latéralement les unes aux autres par des plans de cations et ions hydroxydes, qui forment les couches octaédriques (Simmons, 2016). La structure contient donc des sites cationiques nommés A, M4, M3, M2 et M1. Le site A contient de gros ions alcalins, principalement du sodium, et est lié à des atomes d'oxygène (10 à 12) et des ions hydroxydes. Cependant, ce site peut être vide comme c'est le cas pour les amphiboles asbestiformes (**Tableau 1**) (Simmons, 2016). Les sites octaédriques M1, M2 et M3 contiennent les cations Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ti<sup>4+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>. En ce qui concerne les amphiboles asbestiformes, les cations Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup> sont principalement retrouvés au niveau de ces sites. Les sites M1 et M3 se lient à quatre atomes d'oxygène et deux anions hydroxydes. Le site M2 quand à lui est lié à six atomes d'oxygène (Simmons, 2016). Le site M4 contient les cations Na<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et possède une coordinence de six à huit (Simmons, 2016). Les amphiboles ont au total sept cations octaédriques dans la maille élémentaire avec deux sites M1, M2 et M4 et un site M3.



Figure 3 : Structure cristalline d'une amphibole vue le long de l'axe c (Simmons, 2016).

La **Figure 4**, qui représente la structure d'une amphibole monoclinique vue du dessous par rapport à l'axe c, montre les structures tétraèdrique-octaèdrique-tétraèdrique (T-O-T), également appelé unité I. Les points de rupture autour des unités I les plus fortes, produisent des angles de clivage 56° et 124° caractéristiques des amphiboles (Simmons, 2016).



**Figure 4** : Structure d'une amphibole monoclinique vue du dessous par rapport à l'axe c (Simmons, 2016).

Les fibres d'amphibole sont droites et ne présentent pas de fibrilles bien définies contrairement au chrysotile. Concernant la taille des fibres, le diamètre varie selon le type d'amphibole et au sein d'un même type selon le gisement (exemple : crocidolite 0,06  $\mu$ m à 1,2  $\mu$ m et amosite 0,15  $\mu$ m à 1,5  $\mu$ m) (Douguet *et al.*, 1997). La longueur quant à elle est de l'ordre de quelques millimètres (Dériot and Godefroy, 2005).

#### 3. Propriétés des amiantes

#### a. <u>Composition chimique</u> :

La composition théorique du chrysotile,  $Mg_6Si_4O_{10}(OH)_8$ , varie en fonction des gisements. En effet, les fibres peuvent tout d'abord subir des phénomènes de substitutions d'éléments constitutifs, notamment le magnésium et le silicium, par d'autres éléments comme le fer, le nickel, le chrome ou l'aluminium (Douguet *et al.*, 1997; Virta, 2002). En plus de ces substitutions, les fibres peuvent également subir des phénomènes de contamination par des amphiboles. La présence de trémolite, qui n'a pas été utilisé industriellement, a par exemple été trouvée comme contaminant du chrysotile (Virta, 2002; Bernstein *et al.*, 2013).

La composition chimique des amphiboles est plus variable et complexe que celle du chrysotile, en raison des sites cationiques pouvant contenir différents éléments (Douguet *et al.*, 1997; Virta, 2002).

#### b. <u>Propriétés physiques</u> :

La résistance thermique des amiantes est extrêmement importante. Cependant les différents types d'amiantes commencent à se décomposer aux alentours de 500°C et sont complétement déshydroxylés à environ 800°C pour le chrysotile et 1000°C pour les amphiboles, produisant un produit amorphe (Douguet *et al.*, 1997; Virta, 2002; Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

La résistance mécanique à la traction des différentes amiantes a également été décrite. Elle est liée à la résistance des liaisons Si-O-Si dans la chaine de silicate mais également à la teneur en fer des amiantes. En effet, les liaisons fer-oxygène, notamment avec du fer (III), possèdent une forte résistance à la traction (Virta, 2002). La résistance varie donc suivant les espèces d'amphiboles. Le chrysotile possède une résistance intermédiaire entre la crocidolite, qui possède une plus grande résistance et l'amosite qui possède une résistance moindre (Douguet *et al.*, 1997; Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

D'autres propriétés physiques ont également été mises en avant, notamment la faible conductivité thermique, acoustique et électrique (Virta, 2002; Ruffié and Margery, 2007; Lahondère *et al.*, 2014). La haute résistivité électrique des amiantes est particulièrement bien connue et a été très largement utilisée. Le plus souvent, la résistivité du chrysotile est plus faible que celle des amphiboles, notamment en milieu humide lié à la disponibilité des ions solubles (Virta, 2002).

#### c. Propriétés chimiques :

Etant donné la différence de structure du chrysotile et des amphiboles, la résistance aux acides n'est pas la même. Le chrysotile est particulièrement sensible au pH acide. En effet, la couche externe de brucite se dissout en milieu acide, libérant le magnésium et laissant un résidu de silice. Les amphiboles possèdent quant à eux une résistance variable aux acides, lié à l'emprisonnement des cations dans des couches de silice, mais qui reste nettement supérieur au chrysotile. La crocidolite a notamment une résistance plus importante à l'acide comparé à l'amosite (Douguet *et al.*, 1997; Virta, 2002; Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

D'autres part, toutes les espèces d'amiante résistent aux bases fortes, hormis à des températures supérieures à 100°C. Effectivement, la couche de silice des amphiboles est particulièrement sensible aux bases fortes à température élevée (Virta, 2002).

## II. <u>Production et utilisation</u>

#### 1. Principaux producteurs

De 1920 jusqu'à la seconde guerre mondiale, la production était relativement faible et le principal producteur était le Canada qui possède de nombreuses mines d'amiantes et notamment de chrysotile (Virta, 2002) (**Figure 5**).



**Figure 5** : Mine d'amiante à ciel ouvert (mine Jeffrey dans la région d'Asbestos, Québec, Canada) (Bryn Pinzgauer).

Après la seconde guerre mondiale, la production d'amiante a fortement augmenté jusqu'à atteindre un pic en 1975 avec une production mondiale d'environ 4,8 millions de tonnes d'amiantes produit seulement pour cette année (**Figure 6**). A ce moment là, 80% du chrysotile était produit par le Canada et la Russie, tandis que la crocidolite et l'amosite provenaient principalement de l'Afrique du Sud (Douguet *et al.*, 1997; Virta, 2002). Aujourd'hui, les principaux producteurs d'amiantes sont la Russie, la Chine, le Kazakhstan et le Brésil. Le Canada ayant cessé sa production d'amiante en 2011 (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).



Figure 6 : Production mondiale d'amiante entre 1920 et 2000 (Virta, 2002).

#### 2. Usage industriel de l'amiante

Le chrysotile, seule espèce minérale asbestiforme du groupe des serpentines, représente 95% de l'utilisation industrielle de l'amiante. Tandis que les 5% restant sont représentés que par deux espèces minérales asbestiformes du groupe des amphiboles, l'amosite et la crocidolite (Lahondère *et al.*, 2014; Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

Le secteur du BTP (Bâtiment et Travaux Publics) concentre 90% de la consommation d'amiante en France. En dehors de ce secteur, l'amiante a été utilisé dans divers secteurs d'activités très variés (ferroviaire, aérien, maritime...) (Gautier *et al.*, 2017). On estime qu'il existe plus de 3500 produits dérivés de l'amiante (Bordebeure, 2017).

Les principaux produits à base d'amiante comprennent :

- Amiante-ciment : environ 80% de la production mondiale d'amiante utilisé notamment dans la toiture des bâtiments (plaques ondulées, tuiles ; ardoises) et dans les canalisations (Dériot and Godefroy, 2005; Lahondère *et al.*, 2014; Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).
- Amiante brut en vrac : utilisé dans les procédés de flocage pour l'isolation thermique ou phonique (Dériot and Godefroy, 2005).
- Amiante mélangé à des matières plastiques : notamment dans les dalles de revêtement de sol ou les câbles électriques (Dériot and Godefroy, 2005; Amiante -Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).
- Produits textiles : cordes ou tresses, joints d'étanchéités, vêtement de protection contre le feu et la chaleur (Dériot and Godefroy, 2005; Lahondère *et al.*, 2014; Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).
- Matériaux de friction : dans de nombreuses pièces mécaniques (freins et embrayages de véhicules, ascenseurs, moteurs) (Lahondère *et al.*, 2014; Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).
- Papiers, cartons, feutres: pour l'isolation thermique et électrique (Dériot and Godefroy, 2005; Lahondère *et al.*, 2014; Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).
- Additif : peintures, colles, bitumes (Dériot and Godefroy, 2005; Lahondère *et al.*, 2014).

### III. <u>Impact sur la santé</u>

L'effet toxique est provoqué suite à l'inhalation des fibres d'amiante qui peuvent atteindre les alvéoles pulmonaires. Une partie des fibres présentent dans la région alvéolaire peut ensuite être transférée vers l'interstitium pulmonaire. A partir de là, les fibres peuvent atteindre la plèvre ou être éliminée dans le système lymphatique et pénétrer dans les capillaires pour être distribuées vers différents organes et tissus (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018). Les principaux facteurs qui déterminent la pénétration de l'amiante et sa distribution dans les voies respiratoires sont la taille et la géométrie des fibres (Scherpereel, 2016; Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018). En effet, les fibres sont principalement retrouvées au niveau des aires proches des bifurcations bronchiques. Cependant, la région alvéolaire est accessible aux fibres ayant un diamètre inférieur à 3  $\mu$ m même avec des longueurs allant de 100 à 200  $\mu$ m (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

#### 1. **Biopersistance**

La biopersistance des fibres, définie par l'efficacité d'élimination ou d'altération via des processus physico-chimiques, dépend de différents paramètres :

- La taille des fibres : Les fibres courtes retrouvées au niveau alvéolaire sont plus facilement phagocytées par les macrophages comparé aux fibres longues, ce que explique leurs temps de rétention plus court et donc leur biopersistance moins importante (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).
- La composition chimique et la stabilité physico-chimique des fibres : Le milieu biologique peut solubiliser les fibres et/ou les casser en fibres plus petites les rendant moins biopersistantes (Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).

De manière générale, les fibres de chrysotile présentent une biopersistance moins importante que les fibres d'amphiboles du fait de leur clairance pulmonaire plus rapide. En effet, les fibres de chrysotile se clivent longitudinalement en fibrilles qui peuvent se fracturer et être phagocytées plus facilement. La demi-vie des fibres d'amphiboles dans les poumons se compte en années alors que celle des fibres de chrysotile se compte en mois (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

#### 2. Pathologies

Toutes les formes d'amiantes, chrysotile ou amphiboles, sont cancérogènes et l'exposition aux fibres d'amiante peut conduire à des pathologies non malignes (toxicité chronique) ou à des cancers.

#### a. <u>Toxicité chronique</u> :

Concernant les pathologies non cancéreuses, nous pouvons citer :

Les plaques pleurales qui sont une des pathologies les plus fréquemment décrites suite à l'inhalation de fibres d'amiante. Celles-ci apparaissent en général après une latence d'au moins 15 ans après le début de l'exposition à l'amiante (Scherpereel, 2016; Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

- L'asbestose qui est une fibrose pulmonaire débutant en général 10 à 20 ans après le début de l'exposition à l'amiante. L'asbestose augmente le risque de cancer bronchopulmonaire (Scherpereel, 2016; Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).
- La pleurésie bégnine qui correspond à un épanchement de liquide et qui possède un temps de latence d'environ 30 ans mais pouvant parfois être plus court. Cette pathologie peut évoluer vers une fibrose de la plèvre viscérale (Scherpereel, 2016; Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).
- Fibrose de la plèvre viscérale qui possède le même temps de latence que la pleurésie bégnine, 30 ans, mais pouvant également être plus court (Scherpereel, 2016; Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).

#### b. Effets cancérogènes :

L'exposition à l'amiante possède un effet cancérogène avéré et les principaux cancers que l'on peut observer sont :

- Le cancer broncho-pulmonaire qui peut survenir dans un délai qui varie de 10 à plus de 20 ans (Scherpereel, 2016; Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).
- Le mésothéliome malin localisé le plus fréquemment au niveau de la plèvre et qui possède une très longue latence allant de 20 à 50 ans (Scherpereel, 2016; Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).

Les dernières évaluations sur l'effet cancérogène de l'amiante ont également montré un lien entre l'exposition aux fibres d'amiante et l'apparition des cancers du larynx, de l'ovaire et de l'appareil digestif (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

Les mécanismes de toxicité de l'amiante ne sont pas encore très bien connus. Cependant, trois hypothèses ont été avancées concernant l'effet cancérogène de l'amiante (**Figure 7**) :

- Le stress oxydatif, fait suite à la phagocytose des fibres d'amiantes par les macrophages. Le fer (Fe) présent dans ces fibres va produire des radicaux libres via la réaction de Fenton (Toyokuni, 2009; Valko *et al.*, 2015).
- La ségrégation anormale des chromosomes, basée sur le fait que les fibres d'amiante provoquent des dommages chromosomiques lors de la division cellulaire (délétion, translocation) (Toyokuni, 2009; Valko *et al.*, 2015).
L'adsorption de protéines spécifiques et de produits chimiques cancérogènes sur les fibres d'amiantes, favorisant le processus de carcinogénèse (Toyokuni, 2009; Valko et al., 2015).



**<u>Figure 7</u>**: Mécanismes possibles de la carcinogénèse induits par les fibres d'amiante (Toyokuni, 2009).

Le processus de carcinogénèse induit par l'amiante est donc assez complexe. Cependant, L'hypothèse du stress oxydatif est généralement mise en avant, car la production de radicaux libres via le fer semble jouer un rôle important dans ce processus (Toyokuni, 2009; Valko *et al.*, 2015; Toyokuni, 2016).

## IV. <u>Réglementation et détection</u>

La réglementation liée à l'utilisation de l'amiante a mis un certain temps à se mettre en place, alors que ces dangers sont connus depuis très longtemps. En effet, Pline l'Ancien, un écrivain et naturaliste romain, mentionne dès le 1<sup>er</sup> siècle après J-C ces dangers chez les esclaves romains qui travaillaient dans les mines d'amiante (Dériot and Godefroy, 2005; Lahondère *et al.*, 2014). Alors que l'usage industriel de l'amiante a commencé à se développer à partir de 1860, les premiers réels soupçons sur sa dangerosité n'ont été découverts qu'en 1906 (Dériot and Godefroy, 2005). Mais ce n'est qu'en 1945 que les fibroses pulmonaires associées à l'inhalation des fibres d'amiantes sont reconnues comme maladie professionnelle en France. Il faudra attendre plus de 30 ans pour que le cancer broncho-pulmonaire et le mésothéliome lié à l'amiante soient reconnus comme maladie professionnelle en 1976. Un an plus tard en 1977, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) classe toutes les variétés d'amiante cancérogènes n° 1 (Dériot and Godefroy, 2005; Lahondère *et al.*, 2014). Après l'interdiction d'utiliser l'amiante de type amphibole en 1988, la France interdit totalement l'utilisation de toutes les formes d'amiantes à compter du 1<sup>er</sup> janvier 1997.

## 1. <u>Réglementations et recommandations face à l'amiante</u>

Suite à l'interdiction de l'amiante en France, une réglementation relative à la santé publique et à la protection des travailleurs a été mise en place afin d'encadrer juridiquement les dangers liés à l'amiante. Cette réglementation a beaucoup évolué ces 10 dernières années et risque encore de changer suite aux différentes études et rapports sur les risques pour la santé des fibres d'amiante. A l'heure actuelle, le code de la santé publique a fixé un seuil à 5 fibres par litre le niveau d'empoussièrement mesuré dans d'air. Concernant les salariés, la valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP) fixée par le code du travail est de 10 fibres par litre sur 8 heures (Lahondère *et al.*, 2014; Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018). La VLEP peut varier selon les pays (**Tableau 2**), mais lorsque ces seuils sont dépassés le désamiantage est obligatoire.

<u>Tableau 2</u>: Valeurs limites d'exposition professionnelle aux fibres d'amiante dans différents pays (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

Pays	Concentration moyenne en fibres d'amiante							
France	10 fibres/L sur 8 heures							
Union européenne	0,1 fibre/cm <sup>3</sup> sur 8 heures (soit 100 fibres/L)							
Allemagne, Pays-Bas, Suisse	10 fibres/L sur 8 heures							
États-Unis	0,1 fibre/cm <sup>3</sup> sur 8 heures (soit 100 fibres/L)							
Japon	0,15 fibre/cm <sup>3</sup> sur 8 heures (soit 150 fibres/L)							
Québec	1 fibre/cm <sup>3</sup> sur 8 heures (soit 1000 fibres/L)							

En cas de chantier de désamiantage, le code du travail impose des mesures de prévention et de protection, liées aux risques importants d'exposition à l'amiante selon les types d'activités :

- Activités de sous-section 3 ou de retrait : correspondant à des travaux de retrait ou d'encapsulage d'amiante ou de matériaux en contenant (Lahondère *et al.*, 2014; Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).
- Activités de sous-section 4 ou d'interventions et de maintenance : lorsqu'on intervient sur des matériaux contenant de l'amiante et pouvant provoquer l'émission de fibres (Lahondère *et al.*, 2014; Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).

Lors des opérations de désamiantage, 3 niveaux d'empoussièrements sont fixés par le code du travail, afin d'encadrer les règles techniques et les moyens de protection à mettre en œuvre lors de travaux (Lahondère *et al.*, 2014; Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018) :

- 1<sup>er</sup> niveau : **inférieur à 100 fibres/L**.
- 2<sup>ème</sup> niveau : entre 100 et 6000 fibres/L.
- 3<sup>ème</sup> niveau : entre 6000 et 25 000 fibres/L.

Ainsi selon le niveau d'empoussièrement, différentes protections notamment respiratoires sont mis en œuvre. Pour les chantiers de sous-section 3, des vérifications du niveau d'empoussièrement sont effectuées de façon périodique, tandis qu'en sous-section 4 une

vérification est effectuée à chaque changement du mode opératoire (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

## 2. Méthodes de détection de l'amiante

Les méthodes de détection des fibres d'amiantes varient selon l'environnement analysé :

- Dans le matériaux : L'identification des fibres dans les matériaux s'effectue par observation en microscopie optique à lumière polarisée (MOLP). Si cette analyse ne permet pas de conclure à la présence d'amiante dans les matériaux, une analyse en microscopie électronique à transmission analytique (META) est effectuée afin de confirmer le résultat (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).
- Dans l'air : le prélèvement s'effectue à l'aide d'une pompe fixe qui va aspirer l'air et permettre la récupération des fibres sur une membrane filtrante. A la suite de cela, une analyse en META est effectuée afin d'identifier la nature des fibres et de déterminer la concentration en fibre d'amiante exprimée en fibres par litre d'air (f/L) (Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS, 2018).

Les fibres d'amiante prises en compte, afin de déterminer la concentration dans l'air, sont celles de longueur supérieure à 5  $\mu$ m, de diamètre inférieur à 3  $\mu$ m et de rapport longueur sur diamètre supérieur à 3. La META permet d'identifier et de comptabiliser les fibres les plus fines dont le diamètre est de l'ordre de 0,02  $\mu$ m. Cependant, les fibres courtes (de longueur inférieure à 5  $\mu$ m, de diamètre inférieur à 3  $\mu$ m et de rapport longueur sur diamètre supérieur à 3) ne sont jamais prises en compte dans les mesures que ce soit dans le code de santé publique ou dans le code du travail. Un rapport récent préconise la prise en compte de ces fibres pour lesquelles on ne peut pas exclure un effet cancérogène. Ce rapport préconise donc de fixer le seuil à 50 f/L de fibres courtes ans l'air (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

## V. <u>Gestion des déchets</u>

L'utilisation massive de l'amiante durant de nombreuses années a abouti à la fabrication de tonnes de produits contenant de l'amiante et notamment dans le BTP. De ce fait, l'amiante est encore présent dans de nombreux bâtiments. En effet, depuis l'interdiction de l'utilisation de toutes les formes d'amiantes en 1997, de nombreux chantiers de désamiantage sont réalisés, aboutissant à la gestion de tonnages importants de déchets amiantés.

Les trois principaux déchets d'amiante (Figure 8) retrouvés, issus du domaine du BTP sont :

- Les matériaux en amiante-ciment dont la quantité utilisée dans les bâtiments est estimée à environ 24 millions de tonnes (Bordebeure, 2017; Gautier *et al.*, 2017). L'amiante-ciment est un mélange homogène d'environ 10% de fibres et 90% de ciment (Douguet *et al.*, 1997; Lahondère *et al.*, 2014). La principale forme d'amiante retrouvée dans ce déchet est le chrysotile mais des amphiboles ont également été utilisées dans la fabrication de l'amiante-ciment (Douguet *et al.*, 1997).
- Les dalles-vinyles dont la quantité totale en France est estimée à 390 000 tonnes (Gautier *et al.*, 2017). Ces dalles sont composées au maximum de 15% de fibres d'amiante mélangées à une matrice plastique (Retrait des revêtements de sol collés, 2017). D'après une étude effectuée sur ces dalles-vinyles, ce produit contient uniquement de l'amiante de type chrysotile.
- Le flocage et le calorifugeage sont les moins représentés. Cependant la quantité totale retrouvée en France est tout de même estimée à 200 000 tonnes (Gautier *et al.*, 2017). La proportion d'amiante dans le flocage varie selon les types de flocage. Le premier type qui est en couche épaisse, duveteuse, de basse densité et friable, se compose de 50 à 90% d'amiante. Tandis que le second type, qui est en couche mince, dur, de plus haute densité et moins friable, se compose de 5 à 30% d'amiante (Douguet *et al.*, 1997). Les deux formes d'amiantes, chrysotile et amphibole, peuvent être retrouvées dans le flocage et le calorifugeage (Chateau, 2015).

La diversité des formes d'amiante et des matrices (cimentaire, plastique...) utilisées dans les produits amiantés complexifie le traitement des déchets.



**Figure 8** : Principaux produits amiantés dans les bâtiments (Santé et sécurité au travail - INRS). (A) Toiture amiantée en fibrociment (B) Dalles de sol amiantées (C) Flocage d'amiante.

## 1. Procédés de traitement utilisés en France

Actuellement, seulement deux méthodes sont utilisées pour traiter l'amiante, le stockage et la vitrification par fusion plasma (Damien, 2016; Bordebeure, 2017).

## a. <u>Le stockage en centre d'enfouissement</u> :

Le stockage en centre d'enfouissement des déchets amiantés est la méthode de gestion des déchets la plus utilisée. En effet, 99% de l'amiante est enfoui (Spasiano and Pirozzi, 2017). Cependant, l'élimination de ces déchets est bien réglementée et seules certaines installations sont autorisées du point de vu législatif à stocker ces déchets. Il existe différentes possibilités d'élimination en installation de stockage selon l'intégrité des déchets :

 Les déchets d'amiantes sont autorisés en installation de stockage non dangereux dans des casiers spécifiques (Figure 9) dédiés à l'amiante sous réserve d'autorisation par arrêté préfectoral. Seul les amiantes-liés ayant conservé leur intégrité sont acceptés (Bordebeure, 2017; Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).  Tous les autres déchets sont éliminés en installation de stockage de déchets dangereux ou sont vitrifiés (Bordebeure, 2017; Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).



Figure 9 : Casier amiante en cours d'exploitation (Santé et sécurité au travail - INRS).

L'élimination des déchets amiantés est strictement interdite en installation de stockage de déchets inertes ainsi que son recyclage.

L'avantage de la gestion des déchets en centre d'enfouissement est le faible coût. En effet, le stockage de l'amiante libre coûte 450 à 700 €/tonne tandis que l'amiante lié coûte 100-150 €/tonne. Cependant, l'inconvénient de cette gestion est la surface de stockage nécessaire pour entreposer les déchets mais également le fait qu'on ne traite pas les dangers de l'amiante (Damien, 2016).

#### b. <u>Vitrification par fusion plasma</u> :

Ce traitement consiste à chauffer l'amiante à haute température (1200-1600°C) par torche plasma afin de convertir l'amiante en verre de silicate stable par fusion des déchets (Spasiano and Pirozzi, 2017). En plus de détruire les déchets, ce traitement réduit le volume. Cependant, une seule usine en France, Inertam, une filiale d'Europlasma qui est spécialisée dans le traitement et la destruction définitive des déchets amiantés, utilise ce procédé. Cette société traite 7 000 tonnes d'amiante par an, ce qui représentent seulement 1% des déchets (Spasiano and Pirozzi, 2017). Le cofalit (**Figure 10**), matériau issu de la vitrification de l'amiante, est inerte et valorisable dans la construction. Le problème est que cette méthode est très coûteuse 1 000-2 500 €/tonne et très couteuse en énergie (Spasiano and Pirozzi, 2017).



<u>Figure 10</u> : Cofalit obtenu après vitrification de déchets amiantés (Inertam, la solution de destruction définitive des déchets d'amiante).

## 2. Traitements en développement

Etant donné le peu de traitement satisfaisant, le développement de nouveaux procédés d'élimination est devenu un enjeu essentiel dans la gestion des déchets amiantés. Différents types de traitements sont donc actuellement en développement ou en cours d'industrialisation.

#### a. Solidification et stabilisation de l'amiante :

La solidification ou l'encapsulation consiste à emprisonner l'amiante dans une matrice inerte qui va permettre une réduction de la libération des fibres d'amiante, une diminution de la surface exposée et une réduction de la porosité et de la perméabilité des déchets. La stabilisation est une étape qui permet une réduction de la mobilité des fibres par l'ajout d'adjuvant (Spasiano and Pirozzi, 2017; Paolini *et al.*, 2019).

Des déchets amiantés provenant d'une usine de fabrication de freins d'automobiles ont par exemple été encapsulés dans une matrice de ciment (Chan *et al.*, 2000) et dans des résines polymères (Chan *et al.*, 2004). Ces procédés sont des méthodes d'immobilisation simple des fibres d'amiante non liées, limitant directement la toxicité liée à l'inhalation des fibres et pourrait donc être utilisé comme prétraitement avant la mise en décharge des déchets d'amiante friables. La solidification et la stabilisation sont donc des procédés de gestion des déchets sûrs mais qui n'éliminent pas la toxicité de l'amiante et n'aboutissent pas à un produit final réutilisable (Spasiano and Pirozzi, 2017; Paolini *et al.*, 2019). De plus, le volume de déchets destinés à l'enfouissement peut augmenter de 30 à 200% (Spasiano and Pirozzi, 2017).

D'autre part, il a été proposé d'utiliser la solidification et la stabilisation directement dans la gestion de l'amiante présent dans les bâtiments. En effet, cette méthode éviterait de retirer les produits amiantés qui y sont présents. L'encapsulation de matériaux denses et durs contenant de l'amiante, par précaution contre la détérioration et les dommages futurs, pourrait donc être effectué. En revanche, Cette méthode ne constitue pas une solution durable car l'amiante reste dans le bâtiment. De plus, pour des raisons de sécurité, le matériau encapsulé devra être vérifié périodiquement pour s'assurer que le produit d'encapsulation n'a pas été endommagé. En effet, les stabilisants, se détérioreront avec le temps et il sera donc nécessaire de recouvrir à nouveau de stabilisant les produits amiantés de façon périodique tout au long de la vie du bâtiment. Dans cette optique, ce traitement n'est pas utilisé en France pour la stabilisation de l'amiante dans les bâtiments (Spasiano and Pirozzi, 2017).

## b. <u>Traitements thermiques</u> :

Il a été montré que les fibres d'amiantes étaient instables à haute température. En effet, les traitements thermiques sont basés la modification de la structure cristalline des amiantes. Trois grandes étapes se produisent lors de la déstructuration des fibres (Paolini *et al.*, 2019) :

- Evaporation de l'eau adsorbée.
- Elimination des groupements OH structuraux présent dans la structure cristalline des fibres.
- Cristallisation des matériaux amorphes et croissance de nouvelles structures cristallines.

Le chrysotile commence par exemple à perdre ses groupements hydroxyles entre 500 et 600°C et se transforme en forsterite qui recristallise à 820°C (Spasiano and Pirozzi, 2017) (Figure 11).



<u>Figure 11</u>: Voie de décomposition du chrysotile à haute température (Spasiano and Pirozzi, 2017).

La décomposition des amphiboles à haute température a également été décrite. La déhydroxylation de la trémolite commence par exemple à 950°C et recristallise en diopside et enstatite à 1050°C (Spasiano and Pirozzi, 2017) (**Figure 12**).



<u>Figure 12</u> : Voie de décomposition de la trémolite à haute température (Spasiano and Pirozzi, 2017).

Ces processus de transformation se produisent sur des amiantes purs. Cependant, la séquence de décomposition thermique est différente sur des déchets d'amiante, notamment sur du fibrociment. En effet, la température de décomposition de ce déchet est plus élevée comparé à l'amiante natif et doit atteindre 1200°C. Le produit obtenu semble être inoffensif et est principalement constitué de SiO<sub>2</sub> et de CaO, lié à la matrice cimentaire. Récemment, une autre étude a montré qu'un traitement thermique à 700°C suffisait à décomposer du fibrociment,

contenant du chrysotile et de la crocidolite, en un produit final sans danger. Tous ces procédés permettent d'obtenir des matériaux inertes réutilisables notamment dans la poterie ou dans le secteur du BTP (Spasiano and Pirozzi, 2017; Paolini *et al.*, 2019).

Afin d'améliorer le traitement thermique des amiantes, des procédés alternatifs ont été testés. En effet, afin diminuer la température et le temps de traitement, l'utilisation de condition hydrothermale pour convertir du chrysotile en forsterite a été proposé. Le traitement hydrothermal consiste à utiliser de l'eau comme unique réactif mais dans des conditions spécifiques, en termes de température et de pression, afin d'obtenir une eau supercritique. Ainsi une décomposition a pu être observée sur du chrysotile à une température de 500-700°C et une pression de 1,75-7,40 MPa. Une autre technique a également été testée mais en utilisant des microondes, afin d'éviter l'utilisation de four ou de technologie plasma qui demandent de fortes températures d'utilisation lié à la résistance des amiantes vis à vis de la chaleur. En effet, les microondes agissent directement sur la structure et permettent une montée en température rapide et uniforme (Spasiano and Pirozzi, 2017).

Le principal avantage de ces traitements thermiques est le coût qui est plus faible que la vitrification et la destruction totale de l'amiante. Cependant, ces procédés consomment beaucoup d'énergie et libèrent des gaz toxiques, constitués de fibres d'amiantes, qui devront être traités (Spasiano and Pirozzi, 2017; Paolini *et al.*, 2019).

#### c. <u>Traitements mécaniques</u> :

Les traitements mécaniques sont basés sur l'énergie mécanique transmise aux déchets d'amiante lors du broyage. Cette énergie permet de détruire les liaisons moléculaires et déstabilise la structure cristalline des amiantes. L'efficacité de ce traitement a été montré sur de l'amiante natif et du fibrociment, quelque soit le type d'amiante chrysotile ou amphibole et a permis de transformer ces déchets en produit amorphe inoffensif pour la santé. Les matériaux obtenus peuvent être valorisés pour la préparation de mortier, améliorant les propriétés mécaniques de celui-ci (Spasiano and Pirozzi, 2017; Paolini *et al.*, 2019).

Le principal inconvénient de ce traitement est son coût, qui est plus élevé que le traitement thermique. Cependant, il est possible de combiner ces deux traitements, mécanique et thermique, afin de réduire le prix du traitement (Spasiano and Pirozzi, 2017).

#### d. Traitements chimiques :

Les traitements chimiques peuvent dénaturer l'amiante en favorisant la dissolution des métaux présents dans la structure cristalline des fibres. Ce procédé est connu depuis

longtemps. En effet, la dissolution du chrysotile et de la crocidolite dans de l'eau à pH 7 a été reportée dans la littérature et a permis d'observer la libération de magnésium dans la solution. Cependant, cette dissolution à pH neutre est très lente (Spasiano and Pirozzi, 2017). C'est dans cette optique que l'utilisation d'un environnement acide a été proposée afin de favoriser et d'améliorer fortement la dissolution du magnésium. De ce fait, de nombreuses études ont été effectuées sur l'attaque acide de l'amiante et plus particulièrement du chrysotile. En effet, la couche de brucite de cette amiante, composé de magnésium, peut être dissoute par l'acide. La cinétique de dissolution du chrysotile est favorisée par une baisse du pH, ainsi plus le pH est bas et plus la dissolution sera rapide (Spasiano and Pirozzi, 2017). L'attaque acide des amphiboles fut moins étudiée étant donné que le magnésium présent dans ce type d'amiante est dissout plus difficilement en milieu acide, du fait de la couche de silice externe plus résistante à l'acide qui protège donc ces ions (Amiante - Fiche toxicologique n°145 - INRS, 2018).

Dans un premier temps, l'utilisation d'acide fluorosulfurique pour dégrader totalement le chrysotile a été proposée (**Figure 13**). Dans ce procédé, l'acide se dissout dans l'eau pour former de l'acide sulfurique, qui attaque le magnésium de la couche de brucite et de l'acide fluorhydrique qui attaque la couche de silicate. L'inconvénient d'utiliser cet acide est sa toxicité et son coût (Spasiano and Pirozzi, 2017; Paolini *et al.*, 2019).



**<u>Figure 13</u>**: Dissolution du chrysotile dans une solution d'acide fluorosulfurique (Spasiano and Pirozzi, 2017).

D'autres acides non toxiques et moins chers ont été testés afin de dénaturer les fibres d'amiante. En effet, il a été montré qu'une simple dissolution de la couche de brucite par des acides organiques tel que l'acide oxalique, acétique et formique, ou inorganique tel que l'acide sulfurique, nitrique et chlorhydrique, permettait d'obtenir un produit inoffensif composé de sels de magnésium et de silice amorphe (Spasiano and Pirozzi, 2017). D'autre part, les traitements chimiques ont été combinés à différents traitements (mécanique, thermique...) afin d'améliorer l'altération des fibres d'amiantes. Ainsi, l'utilisation d'un traitement thermochimique utilisant du chlorodifluorométhane chauffé à 800°C, a permis la

dénaturation de chrysotile, de crocidolite et d'amosite (Spasiano and Pirozzi, 2017). Cependant, étant donné la toxicité du chlorodifluorométhane, d'autres propositions ont été faites comme par exemple l'utilisation d'une voie qui combine un acide organique, l'acide oxalique à l'utilisation des ultrasons. Ce procédé a notamment permis de dissoudre la couche de brucite du chrysotile (Spasiano and Pirozzi, 2017; Paolini *et al.*, 2019).

Tous ces traitements ont été effectués sur des amiantes natifs mais d'autres procédés ont été étudiés sur des déchets d'amiante, notamment le fibrociment. Différents traitements thermochimiques ont été proposés afin de réduire les coûts de traitement sur ces déchets. En effet, le traitement chimique du fibrociment demande l'utilisation d'une plus grande quantité d'acide lié au fait que le ciment, principal constituant de ces déchets, réagit principalement avec l'acide (Spasiano and Pirozzi, 2017). La combinaison d'un traitement thermique et chimique permet donc une attaque plus efficace des déchets de fibrociment. L'acide sulfurique chauffé à 100°C a par exemple permis de convertir du ciment amianté en un produit final inoffensif (Spasiano and Pirozzi, 2017; Paolini et al., 2019). La silice composant l'amiante est connue pour résister aux attaques acides, dans cette optique un autre traitement chimique utilisant des bases fortes a été utilisé. En effet, un pH alcalin peut dégrader les silicates par hydrolyse des ponts silice-oxygène par les ions OH-. Ainsi, différentes méthodes de traitement utilisent ce phénomène, comme par exemple en utilisant de la soude caustique à une certaine pression et à différentes températures (Paolini et al., 2019). Récemment, un traitement combinant l'attaque acide et basique des amiantes a été proposé, utilisant l'acide nitrique pour dégrader le chrysotile et la soude caustique en condition hydrothermale pour dégrader les amphiboles. L'avantage de ce traitement est que les produits obtenus peuvent être valorisés par la précipitation des ions dissous et la synthèse de zéolithe via la silice (Talbi et al., 2019).

#### e. <u>Traitements biologiques</u> :

Bien que l'amiante soit toxique pour de nombreux êtres vivants, des études ont été effectuées sur la capacité d'altération des amiantes par des plantes, des champignons ou des bactéries. Nous développerons en détail les traitements biologiques dans le chapitre 4.

## **Chapitre 2**

# Interactions entre les micro-organismes et les minéraux

Comme il a été vu dans le chapitre 1, les amiantes sont des minéraux d'origine naturelle, possédant une texture fibreuse. Etant donné que les amiantes trouvent leurs origines dans l'environnement, nous allons décrire maintenant les interactions entre les micro-organismes et les minéraux.

Un minéral est un solide inorganique naturel homogène avec une structure interne ordonnée et une composition chimique bien définie. L'assemblage de minéraux forme des roches. Les silicates, dont les amiantes font partie, sont les minéraux les plus courants de la croute terrestre et représentent 90% des minéraux. Les roches et les minéraux représentent un vaste réservoir d'éléments essentiels à la vie et peuvent être libérés sous des formes assimilables par les organismes vivants (Gadd, 2007). En effet, les micro-organismes sont capables d'utiliser les éléments présents dans les minéraux comme source d'énergie pour leurs métabolismes, comme accepteur final d'électron ou pour leurs besoins nutritifs (Mapelli *et al.*, 2012). Les principaux micro-organismes responsables de l'érosion des minéraux sont les champignons, les lichens et les bactéries (Warscheid and Braams, 2000; Mapelli *et al.*, 2012; Gadd, 2017). Deux grands mécanismes sont impliqués dans cette bio-détérioration des roches et des minéraux (**Figure 14**) :

- Les mécanismes physiques qui incluent la pénétration des organismes filamenteux ou des biofilms; l'action des rhizines (structures d'ancrage en forme de racines) des lichens; les actions d'expansion et de contraction des systèmes biologiques. (Sterflinger, 2000; Mapelli *et al.*, 2012; Gadd, 2017).
- Les mécanismes chimiques incluant l'excrétion de métabolites tels que les acides organiques et les sidérophores; les réactions d'oxydo-réduction via la respiration (Mapelli *et al.*, 2012; Gadd, 2017).

Ces mécanismes d'actions indirects, via la dégradation chimique, sont des processus plus importants que les mécanismes directs mettant en jeu la dégradation mécanique (Gadd, 2010). Nous allons détailler ces mécanismes dans ce chapitre.

#### Rock- and mineral-based substrates



**<u>Figure 14</u>** : Principales interactions entre les micro-organismes et les minéraux (Gadd, 2017).

## I. <u>Mécanismes physiques d'altération des minéraux</u>

Différents mécanismes biomécaniques d'altération des minéraux peuvent se produire dans l'environnement.

La détérioration biologique des roches et des minéraux par des micro-organismes notamment filamenteux (actinobactérie, cyanobactérie, algue, champignon) peut tout d'abord se produire par pénétration le long des failles de matériaux fragilisés ou par forage le long des plans cristallins dans des matériaux intacts (comme le grès, les roches calcitiques et dolomitiques) (Gadd, 2010, 2017). La pénétration des hyphes fongiques a été très largement étudiée. L'exploration de l'environnement pour localiser et exploiter de nouveaux substrats est une caractéristique importante de la croissance des hyphes. La direction de la croissance est guidée par divers tropismes, tel que le thigmotropisme, qui répond à une stimulation de contact et qui est très bien connu chez les champignons qui se développent sur des substrats solides (Gadd, 2007). Ce tropisme favorise la croissance des hyphes fongiques qui s'étendent dans la roche par des discontinuités entre les cristaux, constituant une zone de faiblesse, ou par des rainures ou des failles. La pénétration des hyphes permet d'explorer et d'exploiter les faiblesses des surfaces minérales afin d'atteindre les cavités internes de la roche où se développent de nouvelles colonies fongiques (Sterflinger, 2000; Gadd, 2007). Cette pénétration aboutit donc à la perte de cristaux, lié à un changement de pression entre ces cristaux (Sterflinger, 2000). D'autres tropismes sont également utilisés lors de la pénétration des hyphes, comme le chimiotropisme, jouant un rôle dans la prévention de stress, tel que la présence de métaux toxiques. Ainsi, l'intensité de la colonisation de la roche par les champignons et la répartition des colonies dépend à la fois des minéraux de la microtopographie et de la composition chimique de la roche (Gadd, 2007).

Les lichens proviennent de la symbiose entre un champignon (mycobionte) et une ou plusieurs algues photosynthétiques ou des cyanobactéries (photobionte). Dans la plupart des cas, les champignons et les algues impliqués dans la symbiose sont absentes à l'état non lichenisés. La plupart des partenaires fongiques sont des ascomycètes, mais certains sont des basidiomycètes, et appartiennent à un large éventail de classes et d'ordres (Gadd, 2007). Les lichens jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biogéochimiques et sont généralement considérés comme des pionniers dans la colonisation des roches. Cette symbiose mycobionte-photobionte permet à ces organismes de se développer dans pratiquement tous les environnements terrestres. Le rôle dans la rétention et la répartition des éléments nutritifs et des oligo-éléments fait que les lichens jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques et dans les processus de formation des sols et d'altération des roches. En effet, ces organismes sont capables de dégrader des minéraux du substrat rocheux et de synthétiser des biominéraux ce qui renforce le rôle important des lichens dans le cycle des nutriments (Gadd, 2007). Les lichens causent des dommages mécaniques importants en raison de la pénétration de structures d'ancrage en forme de racine (rhizines), formées de filaments

fongiques, mais également en raison de la dilatation et de la contraction du corps végétatif des lichens (thalle) lors de phases humides et sèches (Gadd, 2017).

Les micro-organismes présents sur les surfaces rocheuses se développent majoritairement en biofilm et rarement en colonie ne regroupant qu'une seule espèce (Gorbushina, 2007). En effet, ce mode de croissance collectif présente plusieurs avantage : une résistance aux stress de l'environnement, une communication accrue et des échanges génétiques entre les microorganismes (Martino, 2016). Etant donné la complexité du mode de vie en biofilm, des systèmes de communication sont nécessaires afin de réguler le comportement des différents organismes colonisateurs. Le quorum sensing est un mode de communication qui joue un rôle essentiel dans la formation du biofilm. Il est basé sur la sécrétion et la détection de petites molécules diffusibles, appelées autoinducteurs, produites proportionnellement à la densité de la population. A partir d'un seuil, les cellules détectent les autoinducteurs, permettant une action coordonnée de la population. La formation de biofilm est observée sur presque toutes les surfaces solides (les plantes, les sédiments, les sols, les affleurements rocheux...) (Gorbushina, 2007; Martino, 2016). Les biofilms rocheux forment des matrices hétérogènes de micro-organismes maintenus ensemble et étroitement liées aux surfaces sous-jacentes par des substances polymériques extracellulaires (EPS), se développant lorsque les nutriments de l'environnement sont disponibles (Gorbushina, 2007). Le développement des biofilms sur les surfaces rocheuses est un processus complexe et hautement régulé qui suit la topographie du substrat (fissures, pores, grains de minéraux...) (Gorbushina, 2007) et qui comporte différentes étapes successives (Figure 15) (Martino, 2016) :

- Adsorption de molécules et d'ions organiques et inorganiques à la surface afin d'obtenir une surface conditionnée.
- Attachement initial réversible de micro-organismes pionniers autotrophes, capables de se développer en utilisant de la matière minérale.
- Fixation irréversible de micro-organismes suivis de la formation de micro-colonies, de la production de matières organiques et de EPS puis recrutement de colonisateurs hétérotrophes secondaires par co-adhésion.
- Développement dans le biofilm de mosaïques clonales multi-espèces associées au développement et à la maturation de la matrice EPS.
- Dispersion active.



Figure 15 : Différentes étapes de formation d'un biofilm multi-espèces sur une surface rocheuse (Martino, 2016). Les petits cercles jaunes, bruns et noirs correspondent aux molécules et ions organiques et inorganiques. Les cercles verts simples et doubles correspondent aux organismes autotrophes pionniers dans la colonisation, à savoir les cyanobactéries et les algues, respectivement. Les cellules bleues correspondent aux organismes hétérotrophes secondaires dans la colonisation, c'est-à-dire les bactéries et les champignons.

Les différents micro-organismes présents dans le biofilm se répandent de manière caractéristique. Les hyphes fongiques pénètrent dans le substrat, tandis que les algues, les bactéries et les micro-colonies de champignons ressemblant à des levures s'agglutinent. Les micro-organismes se rassemblent donc dans une structure interconnectée comprenant des hyphes fongiques ramifiés et des matrices extracellulaires qui se forment autour et entre les cellules séparées et les micro-colonies. Les organismes sous-jacents du biofilm sécrètent des EPS qui enveloppent les micro-colonies, se répandent sur le substrat et servent à la fois à maintenir les micro-organismes ensemble et à faciliter davantage l'adhésion et la pénétration dans le substrat (Gorbushina, 2007). La répartition du biofilm se fait en réseau car la matrice interstitielle ainsi que le biofilm lui-même s'étalent entre les grains de minéraux remplissant les fissures et les espaces intergranulaires. L'altération des roches est un processus multifactoriel complexe qui dans certains cas peut être accéléré ou ralenti par les biofilms. Il est cependant difficile de séparer les facteurs biologiques et environnementaux de ce

processus d'altération (Gorbushina, 2007). Parmi les mécanismes qui sont induits dans la dissolution de la roche, l'action biomécanique des biofilms joue un rôle important. En effet, les biofilms entraînent un affaiblissement du réseau de minéraux par le biais de cycles de dessiccation et d'hydratation qui induisent une expansion et une contraction du biofilm (Gorbushina, 2007; Martino, 2016; Gadd, 2017). Cette dissolution de la roche permet la pénétration plus profonde et une croissance endolithique étendue des biofilms dans des environnements mieux protégés recouverts de roche.

D'autres mécanismes physiques d'altération des minéraux peuvent être mis en jeu, tel que la pression de turgescence des cellules et la formation d'exopolysaccharide et/ou de minéraux secondaires (Gadd, 2017; Dong and Lu, 2012). Différents sels sont produits par les microorganismes, notamment des oxalates et des carbonates, en particulier par les champignons dans des conditions de faible teneur en nutriments sur des substrats minéraux solides (Gadd, 2007; Gorbushina, 2007). Ces formations de minéraux secondaires peuvent provoquer des gonflements, des dépôts de calcaire, une désintégration granulaire et une desquamation ou un effritement des couches externes. Cela peut souvent être un mécanisme majeur de décomposition de la roche (Gadd, 2017).

## II. <u>Altérations biochimiques</u>

Les actions biochimiques sont considérées comme des processus plus importants que la dégradation mécanique dans l'érosion des roches (Gadd, 2007, 2010). L'altération par voie chimique des substrats rocheux et minéraux peut se produire par excrétion de H<sup>+</sup>, CO<sub>2</sub>, d'acides organiques et inorganiques, de sidérophores et par des réactions d'oxydo-réduction, qui peuvent être associées à des mécanismes biophysiques. Ces processus aboutissent à l'altération de la surface des minéraux pour compléter la dissolution (Gadd, 2007, 2010, 2017; Gorbushina, 2007).

#### 1. <u>Réaction d'oxydo-réduction</u>

Lors des processus de respiration, les eucaryotes utilisent uniquement l'oxygène mais de nombreuses bactéries, notamment anaérobies, sont capables d'utiliser d'autres accepteurs d'électrons. En effet, les métaux contenus dans les minéraux peuvent être utilisés en tant que donneurs et accepteurs d'électrons terminaux pour la respiration. Ainsi les réactions d'oxydo-réductions de ces éléments peuvent entraîner un instabilité et surtout une dissolution des minéraux (Ng *et al.*, 2016; Gadd, 2017).



<u>Figure 16</u>: Réactions d'oxydo-réduction en utilisant les minéraux comme accepteurs et donneurs d'électron pour la respiration des micro-organismes (Ng *et al.*, 2016). A Les ions métalliques (par exemple,  $Mn^{4+}$  et Fe<sup>3+</sup>) dans les oxydes métalliques sont réduits pendant la respiration anaérobie. B La respiration chimiolothotrophe et photolithotrophe permet aux micro-organismes d'obtenir des électrons à partir d'éléments minéraux et d'ions (exemple S, S<sup>2-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Fe<sup>2+</sup>).

Les minéraux insolubles tels que les oxydes de fer et de manganèse font partie des accepteurs d'électrons terminaux les plus abondants dans les sols (**Figure 16 A**). La libération d'énergie par réduction des métaux est couplée à l'oxydation de substrats organiques, comme l'acétate, ou inorganique tel que l'hydrogène. La respiration minérale est l'un des processus respiratoire les plus répandus lorsqu'il n'y a pas d'oxygène et possède une forte influence sur l'équilibre de plusieurs cycles biogéochimiques, tels que les cycles du carbone, de l'azote et du soufre. Cette respiration microbienne permet d'augmenter la dégradation des minéraux et leurs solubilités (Ng *et al.*, 2016).

Les minéraux peuvent également servir de donneurs d'électrons. En effet, les bactéries lithotrophes peuvent oxyder certains substrats inorganiques lors de la génération d'ATP durant la respiration (**Figure 16 B**). Deux grands types de respiration sont notamment mis en avant. Tout d'abord la respiration de bactéries chimiolithotrophes, qui sont capables d'oxyder du sulfure et du fer accélérant la dissolution de minéraux sulfurés. Les bactéries chimiolithotrophes tirent leur énergie de l'oxydation de certains composés inorganiques. Le second type de respiration met en jeu des bactéries photolithotrophes, qui sont capables notamment d'oxyder le soufre ainsi que les composés soufrés réduits en tirant leur énergie de la lumière du soleil (Ng *et al.*, 2016).

## 2. Libération d'acides organiques

L'altération des minéraux par les acides organiques, produits par les micro-organismes, est bien connue. En effet, l'acidification est un mécanisme important impliqué dans l'érosion des minéraux (Uroz *et al.*, 2009; Lazo *et al.*, 2017). La bio-corrosion des matériaux inorganiques est dû à la libération microbienne d'acides organiques et inorganiques, qui dissolvent et attaquent la matrice minérale. Certaines bactéries peuvent par exemple former de l'acide nitrique ou sulfurique qui réagissent avec le carbonate de calcium et d'autres minéraux, entraînant leur solubilisation (Warscheid and Braams, 2000). Cependant, l'activité bio-corrosive des micro-organismes est principalement caractérisée par la libération d'acides organiques comme par exemple l'acide oxalique, citrique et acétique (Figure 17) (Warscheid and Braams, 2000; Lazo *et al.*, 2017). L'utilisation d'acides organiques par les micro-organismes est considérée comme l'un des principaux mécanismes de dégradation des minéraux (Warscheid and Braams, 2000). En effet, II a été démontré que les acides organiques étaient plus efficaces dans la dissolution de la roche comparée aux acides inorganiques (Warscheid and Braams, 2000; Gadd, 2017).



<u>Figure 17</u>: Structure chimique des principaux acides organiques produits lors de la dissolution de minéraux (Lazo *et al.*, 2017).

Les acides organiques sont également capables de chélater des cations, tels que les ions Ca, Fe, Mn, Mg, Si et Al présent dans les minéraux et de former des complexes stables (Warscheid and Braams, 2000). Ces acides organiques possèdent une triple action sur les minéraux :

- Adhésion sur le minéral et extraction des nutriments par transfert d'électrons (Uroz *et al.*, 2009).
- Rupture des liaisons oxygène (Uroz et al., 2009).
- Chélation des ions présents via leurs groupes carboxyles et hydroxyles (Uroz *et al.*, 2009; Lazo *et al.*, 2017).

Bien que de nombreux micro-organismes soient capables de produire ces acides, les champignons semblent être les organismes les plus importants dans l'altération des minéraux via ces mécanismes (Warscheid and Braams, 2000).

## 3. Production de sidérophores

D'autres molécules peuvent également être impliquées dans l'érosion des minéraux notamment via la dissolution du fer. En effet, les micro-organismes qui colonisent les surfaces minérales sont capables de chélater les éléments présent dans les sols en sécrétant et absorbant des composés protéiques spécifiques appelés sidérophores (Warscheid and Braams, 2000; Uroz *et al.*, 2009; Aznar and Dellagi, 2015). Les sidérophores sont de petites molécules de faibles poids moléculaires (moins de 1 kDa) ayant une forte affinité pour le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) (Dong and Lu, 2012; Ahmed and Holmström, 2014; Aznar and Dellagi, 2015). Ces molécules peuvent être classées en trois catégories selon les groupements chimiques impliqués dans la liaison du Fe<sup>3+</sup> (**Figure 18**) (Ahmed and Holmström, 2014; Aznar and Dellagi, 2015) :

- Les cathécolates incluant les phénolates.

- Les hydroxamates.
- Les carboxylates.

Certains sidérophores peuvent contenir différents groupements pouvant se lier au fer et sont donc appelés sidérophores de type mixte (Ahmed and Holmström, 2014; Aznar and Dellagi, 2015).



Figure 18 : Différentes structures de sidérophores et les groupes fonctionnels impliqués dans la chélation du fer (Aznar and Dellagi, 2015). Chaque sidérophore est synthétisé par un ou plusieurs micro-organismes bactériens ou fongiques. Les groupes chélateurs de fer sont représentés en couleur.

Pratiquement tous les micro-organismes, procaryotes et eucaryotes, produisent des sidérophores. Ceux ne pouvant pas en produire peuvent cependant utiliser les sidérophores produits par les autres organismes, appelés xéno-sidérophores, via des récepteurs spécifiques présent à la surface des cellules. Les micro-organismes sont capables de produire un ou plusieurs sidérophores selon les espèces et la carence du milieu (Aznar and Dellagi, 2015). En

effet, les sidérophores sont produits lorsque le milieu est déficient en fer biodisponible (Uroz *et al.*, 2009).

Les sidérophores produits par les micro-organismes sont connus pour favoriser la dissolution des minéraux (Uroz et al., 2009; Ahmed and Holmström, 2014). Le mécanisme d'action généralement proposé est que le complexe Fe (III) - Sidérophore se forme à la surface du minéral, puis est transféré en solution dans le sol, afin de devenir disponible pour l'absorption par les micro-organismes ou les plantes (Ahmed and Holmström, 2014). L'impact des sidérophores sur l'altération des minéraux dans le sol peut être plus important que les acides organiques, lié au fait que les sidérophores forment des complexes plus stables avec le fer. En effet, la chélation du fer peut se faire avec une stoechiométrie sidérophore:fer de 1:1 et des constantes d'affinité comprises entre K=10<sup>30</sup> et K=10<sup>52</sup>, alors que par exemple les constantes d'affinité des acides oxalique et citrique avec le fer (III) sont respectivement de K=10<sup>8</sup> et 10<sup>12</sup> (Ahmed and Holmström, 2014). Cependant, les sidérophores et les acides organiques peuvent fonctionner en synergie entraînant une vitesse de dissolution de minéraux plus élevée que lorsque les sidérophores sont seuls (Ahmed and Holmström, 2014). Du fait de l'importance des sidérophores dans l'érosion des roches, de nombreuses études ont été effectuées. La dissolution de la goethite a par exemple été montrée par le champignon Suillus granulatus (Watteau and Berthelin, 1994) tandis que les ferrichromes, sidérophores fongiques, ont été mis en avant dans la dissolution de la biotite (Sokolova et al., 2010). Les phytosidérophores produits par les plantes ont aussi été mis en avant dans la dissolution des minéraux, tel que les oxydes de fer solubilisés par l'acide muginéique (Hiradate and Inoue, 1998). Le rôle des sidérophores d'origines bactériens dans la dissolution des minéraux a également fait l'objet de nombreuses études. Les sidérophores produits par Pseudomonas aeruginosa ont par exemple été capables de solubiliser le fer structural de la smectite (Ferret et al., 2014). De même, le fer présent dans la goethite, l'hématite et la ferrihydrite a pu être extrait via la sécrétion de sidérophores par Pseudomonas mendocina (Hersman et al., 2001).

## **Chapitre 3**

# Acquisition du fer et du magnésium chez Pseudomonas

## I. Importance des métaux chez les bactéries

Le tableau périodique des éléments présente trois grands groupes qui diffèrent selon leurs propriétés physico-chimiques : i) les métaux ii) les métalloïdes iii) les non métaux (**Figure 19**). Le groupe des métaux est constitué de différentes catégories, les métaux alcalins, alcalino-terreux, les métaux de transition, les métaux pauvres ainsi que les lanthanides et les actinides. De part leur capacité à pouvoir perdre des électrons et ainsi former des cations, les métaux jouent un rôle essentiel dans le règne du vivant et notamment dans les interactions entre les biomolécules et les ions métalliques. En effet, il a été estimé que près de 25% des protéines nécessitent des métaux pour leur fonctionnement (Waldron and Robinson, 2009).

Groupe Période	→ <sup>  A</sup> 1	∥ A 2																0 18
↓ 1	Hydrogène 1 H 1,007975												III B 13	IV B 14	V B 15	VI B 16	VII B 17	Hélium 2 He 4,002602
2	Lithium 3 Li 6,9395	Béryllium 4 Be 9,0121831	nom de l'élément (gaz, liquide ou solide à 0°C et 101.3 kPa)     numéro atomique     symbole chimique     masse atomique relative (ou celle de l'isotope le plus stable)											Carbone 6 C 12,0106	Azote 7 N 14,006855	Oxygène 8 0 15,99940	Fluor 9 F 18,99840316	Néon 10 Ne 20,1797 (6)
3	Sodium 11 Na 22,98976928	Magnésium 12 Mg 24,3055	III A 3	IV A 4	V A 5	VI A 6	VII A 7	/8	VIII 9	10	l B 11	∥ B 12	Aluminium 13 Al 26,9815385	Silicium 14 <b>Si</b> 28,085 (1)	Phosphore 15 P 30,97376200	Soufre 16 S 32,0675	Chlore 17 Cl 35,4515	Argon 18 Ar 39,948 (1)
4	Potassium 19 K 39,0983 (1)	Calcium 20 Ca 40,078 (4)	Scandium 21 SC 44,955908 (5)	Titane 22 <b>Ti</b> 47,867 (1)	Vanadium 23 V 50,9415 (1)	Chrome 24 Cr 51,9961 (6)	Manganèse 25 Mn 54,938044	Fer 26 Fe 55,845 (2)	Cobalt 27 CO 58,933194	Nickel 28 Ni 58,6934 (4)	Cuivre 29 Cu 63,546 (3)	Zinc 30 Zn 65,38 (2)	Gallium 31 Ga 69,723(1)	Germanium 32 Ge 72,630 (8)	Arsenic 33 As 74,921595	Sélénium 34 Se 78,971 (8)	Brome 35 Br 79,904	Krypton 36 Kr 83,798 (2)
5	Rubidium 37 <b>Rb</b> 85,4678 (3)	Strontium 38 Sr 87,62 (1)	Yttrium 39 Y 88,90584	Zirconium 40 <b>Zr</b> 91,224 (2)	Niobium 41 Nb 92,90637	Molybdène 42 Mo 95,95 (1)	Technétium 43 TC [98]	Ruthénium 44 Ru 101,07 (2)	Rhodium 45 Rh 102,90550	Palladium 46 Pd 106,42 (1)	Argent 47 Ag 107,8682 (2)	Cadmium 48 Cd 112,414 (4)	Indium 49 In 114,818 (1)	Étain 50 Sn 118,710 (7)	Antimoine 51 5b 121,760 (1)	Tellure 52 Te 127,60 (3)	Iode 53 I 126,90447	Xénon 54 Xe 131,293 (6)
6	Césium 55 CS 132,905452	Baryum 56 Ba 137,327 (7)	Lanthanides	Hafnium 72 Hf 178,49 (2)	Tantale 73 <b>Ta</b> 180,94788	Tungstène 74 W 183,84 (1)	Rhénium 75 <b>Re</b> 186,207 (1)	Osmium 76 <b>OS</b> 190,23 (3)	Iridium 77 Ir 192,217 (3)	Platine 78 Pt 195,084 (9)	Or 79 Au 196,966569	Mercure 80 Hg 200,592 (3)	Thallium 81 TI 204,3835	Plomb 82 Pb 207,2 (1)	Bismuth 83 Bi 208,98040	Polonium 84 Po [209]	Astate 85 At [210]	Radon 86 Rn [222]
7	Francium 87 Fr [223]	Radium 88 Ra [226]	Actinides 89–103	Rutherfordium 104 Rf [267]	Dubnium 105 Db [268]	Seaborgium 106 Sg [269]	Bohrium 107 Bh [270]	Hassium 108 HS [277]	Meitnérium 109 Mt [278]	Darmstadtium 110 DS [281]	Roentgenium 111 <b>Rg</b> [282]	Copernicium 112 Cn [285]	Nihonium 113 Nh [286]	Flérovium 114 Fl [289]	Moscovium 115 Mc [289]	Livermorium 116 LV [293]	Tennesse 117 <b>TS</b> [294]	Oganesson 118 Og [294]
				Lanthane 57 La 138,90547	Cérium 58 Ce 140,116 (1)	Praséodyme 59 <b>Pr</b> 140,90766	Néodyme 60 Nd 144,242 (3)	Prométhium 61 Pm [145]	Samarium 62 Sm 150,36 (2)	Europium 63 Eu 151,964 (1)	Gadolinium 64 <b>Gd</b> 157,25 (3)	Terbium 65 <b>Tb</b> 158,92535	Dysprosium 66 Dy 162,500 (1)	Holmium 67 HO 164,93033	Erbium 68 <b>Er</b> 167,259 (3)	Thulium 69 <b>Tm</b> 168,93422	Ytterbium 70 <b>Yb</b> 173,045	Lutécium 71 Lu 174,9668
				Actinium 89 AC [227]	Thorium 90 <b>Th</b> 232,0377	Protactinium 91 Pa 231.03588	Uranium 92 U 238.02891	Neptunium 93 Np [237]	Plutonium 94 Pu [244]	Américium 95 Am [243]	Curium 96 Cm [247]	Berkélium 97 Bk [247]	Californium 98 Cf [251]	Einsteinium 99 ES [252]	Fermium 100 Fm [257]	Mendélévium 101 Md [258]	Nobělium 102 No [259]	Lawrencium 103 Lr [266]
	Métaux									Non métaux								
	Alcalino terreux Lanthanides Actinides Métaux de transition Métaux de transition Métaux						Métalloïdes	Autres non-métaux	Autres non-métaux Halogènes Gaz nobles Non classés primordial désinter élém						ntégration d'autres léments	synthétique		

Figure 19 : Tableau périodique des éléments chimiques.

Les métaux ne sont pas tous essentiels et ne réagissent pas tous avec les biomolécules, cela dépend de leurs rôles biologiques, de la toxicité et de la concentration. De ce fait, nous pouvons classer ces éléments en quatre groupes :

Les éléments majeurs : regroupant le sodium (Na), magnésium (Mg), potassium (K) et calcium (Ca). Ces métaux sont présents en forte concentration dans les bactéries, de l'ordre du mM (Nies, 2007). Ces éléments sont essentiels dans la croissance et interviennent dans de nombreux processus. Le sodium et le potassium sont notamment

utilisés pour former un gradient chimio-osmotique et pour maintenir une pression osmotique correcte du cytoplasme (Altendorf and Epstein, 1996; Padan *et al.*, 2001). Le magnésium est généralement associé à des fonctions de stabilisation des macromolécules et de la membrane, ainsi que comme cofacteur dans diverses réactions enzymatiques (Groisman *et al.*, 2013).

- Les éléments traces : tels que le zinc (Zn), fer (Fe), cuivre (Cu), molybdène (Mo), nickel (Ni) et manganèse (Mn). Même si ces métaux ne sont pas présents en grandes quantités dans les bactéries, de l'ordre du μM, ils jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques (Nies, 2007). Le zinc joue notamment un rôle catalytique et structural important dans de nombreuses protéines (Porcheron *et al.*, 2013). Le fer est le métal de transition le plus utilisé. En effet, cet élément existe sous deux formes d'oxydation (Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>) qui est utile dans le transfert d'électrons, le métabolisme de l'oxygène et les clusters fer-soufre (Andrews *et al.*, 2003).
- <u>Les éléments principalement toxiques</u>: avec le chrome (Cr), vanadium (V) et cadmium (Cd). Ces métaux sont très peu utilisés dans les fonctions biologiques du fait de leur toxicité (Nies, 2007). Chez certains organismes, le cadmium et le vanadium peuvent remplacer respectivement le zinc et le molybdène nécessaires à l'activité de certaines enzymes (Waldron and Robinson, 2009).
- <u>Les éléments uniquement toxiques</u>: comme l'arsenic (As), l'argent (Ag), le mercure (Hg), le plomb (Pb). Ces métaux sont très rarement retrouvés dans les organismes car ces éléments sont très toxiques (Nies, 2007). Cependant, certaines rares protéines ont été rapportées comme pouvant utiliser ces métaux comme cofacteur, comme par exemple le plomb (Cvetkovic *et al.*, 2010).

L'assemblage entre un ion métallique et un ligand est assez complexe mais peut être expliqué par différentes propriétés, notamment par le concept acide-base de Pearson. En effet, cette théorie se base sur les interactions acide-base de Lewis. Ainsi, les métaux de transition peuvent agir comme un acide de Lewis ou accepteur d'électron et le ligand biologique peut agir comme une base de Lewis ou donneur d'électron (Pearson, 1966). Au sein des acides-bases de Lewis, nous pouvons distinguer deux catégories :

 les acides et les bases durs généralement peu volumineux et très chargés positivement (acide) ou négativement (base), comme par exemple le Fe<sup>3+</sup> qui est un acide dur et les groupements hydroxyles qui sont des bases dures (Pearson, 1966).  les acides mous et les bases molles qui sont au contraire volumineux et peu chargés positivement ou négativement, tel que le Cu<sup>+</sup> qui est un acide mou et les amines tertiaires qui sont des bases molles (Pearson, 1966).

Le concept acide-base de Pearson permet d'expliquer pourquoi certains ions réagissent préférentiellement avec certains groupements ou certaines molécules. Cette théorie se base donc sur le fait que les acides mous forment des liaisons plus fortes et réagissent plus vite avec les bases molles, tandis que les acides durs forment des liaisons plus fortes et réagissent plus vite avec les bases dures. Une classification de la capacité des métaux à former des complexes stables avec des biomolécules, appelée la série d'Irving-Williams, a été réalisée (Waldron and Robinson, 2009):

$$Ca^{2+} < Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$$

## II. <u>Sources de fer et de magnésium</u>

### 1. Le fer dans l'environnement

Le fer est le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre et constitue un élément essentiel pour de nombreux organismes (Weber *et al.*, 2006). Cependant, le fer sous forme de minéraux, comme par exemple les silicates, les carbonates, les sulfates, les oxy-hydroxydes de fer, est plus ou moins accessible aux micro-organismes (Weber *et al.*, 2006). A pH neutre et en condition aérobie, le fer est principalement sous forme insoluble (Cornell and Schwertmann, 2003; Weber *et al.*, 2006). En effet, le fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) est oxydé en fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) qui s'hydrolyse pour former des hydroxydes ferriques non bio-disponibles pour les micro-organismes (Cornell and Schwertmann, 2003). Le fer ferrique libre et soluble est une source rare, la concentration retrouvée dans les océans varie entre 0,2 et 2 nM et provient principalement de la dissolution des minéraux et des poussières (Conway and John, 2014). Le fer ferreux, plus soluble que le fer ferrique, est plus facilement assimilable par les micro-organismes. Cependant, il n'existe que dans certaines conditions, en milieu réducteur et anaérobie (Weber *et al.*, 2006). D'une façon générale, le fer est un élément essentiel mais très peu bio-disponible pour les micro-organismes. Des mécanismes d'acquisition du fer ont donc été mis en place et seront détaillés ci-dessous.

## 2. Accessibilité du magnésium

Le magnésium fait partie des éléments métalliques majeurs retrouvés dans l'écorce terrestre. En terme d'abondance le magnésium est présent à une teneur d'environ 2% sur la croute terrestre, le positionnant comme le 8<sup>ème</sup> élément le plus abondant (Schvartz *et al.*, 2005; Mikkelsen, 2010). Le magnésium est également un élément commun retrouvé dans les océans (1300 ppm) (Mikkelsen, 2010). Il est retrouvé sous différentes formes minérales comme les silicates, argiles, oxydes, carbonates, sulfates mais il est également retrouvé sous forme d'ion Mg<sup>2+</sup>. Le magnésium étant très soluble, cet élément retourne rapidement dans le milieu liquide et permet la formation de nouveaux minéraux (Schvartz *et al.*, 2005). Dans le sol, le magnésium est retrouvé sous différents états :

- Structural : le magnésium est dans la fraction minérale. C'est l'état le plus important en masse avec une importance relative de 1 000. Les minéraux primaires et secondaires inaltérable ou lentement altérable se retrouvent dans cette catégories. Très peu de magnésium passe à l'état échangeable (Schvartz *et al.*, 2005).
- Echangeable : le magnésium se situe à la surface des argiles. Il est adsorbé mais il peut être échangé par d'autres éléments. L'importance relative en masse de cet état est de 20 (Schvartz *et al.*, 2005; Mikkelsen, 2010).
- Dissous dans la phase liquide : le magnésium se retrouve en solution suite aux échanges de cations. L'importance relative de ce pool est de 1 (Schvartz *et al.*, 2005).

## III. <u>Mécanismes d'acquisition du fer chez les bactéries du genre</u> <u>Pseudomonas</u>

Comme nous avons pu le voir précédemment, le fer est un élément essentiel pour une grande majorité des organismes vivants. Cependant, le fer ferrique prédomine en condition aérobie à pH neutre. Cette forme peu soluble précipite et devient ainsi très peu bio-disponible avec une concentration de fer libre, à pH 7, d'environ 10<sup>-18</sup> M (Raymond and Carrano, 1979). En sachant que la croissance optimale des micro-organismes nécessite une concentration en fer de l'ordre du 10<sup>-6</sup> M (Braun and Killmann, 1999), ces derniers ont dû développer des mécanismes d'acquisition du fer efficace afin de subvenir à leurs besoins en fer.

Durant cette thèse nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux bactéries du genre *Pseudomonas*, pour lesquels nous allons expliciter les mécanismes mis en place pour l'acquisition du fer.

## 1. Acquisition par les sidérophores

La stratégie d'acquisition du fer la plus répandue consiste à produire et sécréter de petits chélateurs organiques (< 2 500 Da) possédant une forte affinité pour le fer, appelés les sidérophores (Kraemer, 2004; Meyer *et al.*, 2008; Cornelis, 2010). Ces molécules, produites en condition aérobie et en carence en fer, possèdent en effet une forte affinité pour le fer ferrique pouvant varier selon les sidérophores, allant de 10<sup>23</sup> à 10<sup>52</sup> M<sup>-1</sup> (Kraemer, 2004; Hider and Kong, 2010). Cette affinité est nettement supérieure à celle de l'EDTA qui est de 10<sup>20</sup> M<sup>-1</sup> (Kraemer, 2004). Les sidérophores ne chélatent pas uniquement le fer. Il a été démontré qu'ils étaient capables de chélater d'autres métaux. En effet, la pyoverdine et la pyochéline par exemple peuvent chélater des métaux tels que Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Eu, Ga, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, Tb, Ti et Zn (Braud, Hannauer, *et al.*, 2009; Braud, Hoegy, *et al.*, 2009; Schalk *et al.*, 2011).

A ce jour, plus de 500 sidérophores de structures différentes ont été décrits (Hider and Kong, 2010). Comme nous avons pu le voir dans le chapitre 2, les sidérophores peuvent être classés en trois grandes familles selon les groupements fonctionnels utilisés pour complexer le fer i) les catécholates incluant les phénolates ii) les hydroxamates iii) les carboxylates. En plus de ces familles se rajoutent les sidérophores mixtes possédant plusieurs groupements.

Chaque sidérophore est spécifiquement produit par une ou plusieurs bactéries. La plupart des bactéries sont capables de produire différents sidérophores et beaucoup sont capables d'utiliser des sidérophores produits par d'autres bactéries (Valdebenito *et al.*, 2006).

#### a. La pyoverdine : principal sidérophore chez les Pseudomonas fluorescents

La principale caractéristique phénotypique chez les *Pseudomonas* fluorescents est la production, dans des conditions limitées en fer, d'un pigment fluorescent vert-jaune, la pyoverdine (PVD) (Meyer, 2000). Cette molécule est le sidérophore principal produit par *Pseudomonas*, possédant une forte affinité pour le fer avec comme groupement chélateur un catéchol et deux hydroxamates (**Figure 20**). Les pyoverdines sont toutes composées de trois parties (Meyer, 2000) :

- Un chromophore : dérivé de la quinolone (2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline).
- Une chaîne peptidique : composée de 6 à 12 acides aminés qui varie en fonction de la souche productrice et qui est liée à la position C1 du chromophore.
- Une chaîne latérale en position C3 du chromophore, qui peut être un acide dicarboxylique ou son amide correspondant.



Figure 20 : Structure de la pyoverdine I produite par *Pseudomonas aeruginosa*. Le groupement catéchol est représenté en rouge et les groupements hydroxamates sont représentés en bleu.

Différentes pyoverdines peuvent être produites par les bactéries du genre Pseudomonas, différant par leur chaine peptidique mais conservant généralement leur chromophore (Meyer, 2000; Visca et al., 2007). Les pyoverdines peuvent également être utilisées comme marqueurs taxonomiques pour identifier et caractériser les souches bactériennes (Fuchs et al., 2001; Meyer, 2007; Meyer et al., 2008). Ce procédé s'appelle le sidérotypage et se base sur les différences de structure chimique et de caractéristiques des pyoverdines produites. En effet, la chaine latérale acylée de la pyoverdine est constituée d'un résidu d'acide dicarboxylique, qui peut être du succinate ou son amide, du malate ou son amide, de l'a-cétoglutarate ou du glutamate, selon les souches productrices et les conditions de culture. Ainsi, plusieurs formes de pyoverdines (isoformes) peuvent être retrouvées dans le milieu culture, qui ne diffère que par la nature de la chaîne latérale. Ces isoformes peuvent être séparées par focalisation isoélectrique qui se base sur les différences de point isoélectrique entre les isoformes de pyoverdines (Fuchs et al., 2001; Meyer, 2007). Le sidérotypage a permis d'identifier plus de 100 pyoverdines différentes chez les Pseudomonas fluorescents (Meyer, 2010) (Tableau 3). En revanche, la production d'une pyoverdine par espèce n'est pas toujours vraie, les souches de Pseudomonas aeruginosa peuvent par exemple produire trois pyoverdines différentes (Meyer, 2007).
<u>Tableau 3</u>: Différentes pyoverdines variant par leurs chaînes peptidiques et leurs points isoélectriques. Les parenthèses indiquent les structures cycliques. Les acides aminés D sont soulignés. Une ligne coupée signifie que les deux énantiomères ont été détectés parmi les résidus soulignés.  $\epsilon$ Lys: Lys liée par son  $\epsilon$ -NH2; OHAsp: acide thréo- $\beta$ -hydroxy-aspartique; aThr: allo-Thr; cOHOrn: cyclo-hydroxy-ornithine; FOHOrn:  $\delta$ N-formyl- $\delta$ N-hydroxy-ornithine; AOHOrn:  $\delta$ N-acetyl- $\delta$ N-hydroxy-ornithine.

Sidérovars	Espèces	MM	Nombre d'isoformes et valeurs de pHi		Chaine peptidique des pyoverdines	Références
B10/PL9/ 7SR1/A225	P. lini	989	3	7,5/5,2/4,6	ɛLys–OH <u>Asp</u> –Ala–a <u>Thr</u> –Ala–cOH <u>Orn</u>	(Teintze <i>et al.</i> , 1981)
12633	P. putida	1 336	3	4,6/4,2/4,0	Asp–ɛLys–OH <u>Asp</u> –Ser–Thr– <u>Ala</u> – <u>Glu</u> –Ser cOHOrn	(Persmark <i>et al.</i> , 1990)
Syr	P. syringae	1 123	2	5,0/4,0	εLys–OH <u>Asp</u> –Thr–(Thr–Ser–OH <u>Asp</u> –Ser)	(Jülich <i>et al</i> ., 2014)
Lille 1	P. monteilii	1 291	2	7,3/4,6	Asp–Lys–AcOHOrn–Ala–Ser–Ser–Gly–Ser– cOHOrn	(Meyer <i>et al.</i> , 2008)
90-51	P. putida	1 234	3	7,3/7,0/5,3	Asp-ELys-OH <u>Asp</u> -Ser-Gly-a <u>Thr</u> -Lys-cOHOrn	(Sultana <i>et al</i> ., 2000)
PAO1	P. aeruginosa	1 333	2	8,8/7,0	<u>Ser</u> -Arg- <u>Ser</u> -FOHOrn-(Lys-FOHOrn-Thr-Thr)	(Briskot <i>et al.</i> , 1989)
13525	P. fluorescens	1 160	3	8,7/7,3/7,1	<u>Ser</u> -Lys-Gly-FOHOrn-(Lys-FOH <u>Orn</u> -Ser)	(Hohlneicher et al., 2014)
SB8.3	P. mandelii	1 046	3	9,0/8,8/7,6	<u>Ala</u> –Lys–Thr– <u>Ser</u> –AOHOrn–cOHOrn	(Budzikiewicz et al., 2014)
Lille 17	P. mosselii	-	3	9,0/7,4/5,2	-	(Dabboussi <i>et al</i> ., 2002)
CHA0	P. fluorescens	1 287	3	8,5/7,5/5,1	Asp–FOH <u>Orn</u> –Lys–(Thr– <u>Ala–Ala</u> –FOH <u>Orn</u> –Lys)	(Wong-Lun-Sang et al., 1996)

#### • La biosynthèse des pyoverdines :

La biosynthèse des pyoverdines se déroule en différentes étapes et débute dans le cytoplasme où des NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetase) assemblent un précurseur peptidique de la pyoverdine. Ces NRPS peuvent varier selon les souches, *P. fluorescens* A506 requiert par exemple trois NRPSs PvdL, PvdI et PvdD (Ringel and Brüser, 2018) tandis que *P. aeruginosa* en requiert quatre PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD (Gasser *et al.*, 2015). Les NRPS sont des enzymes modulaires qui permettent l'ajout d'acides aminés spécifiques, un par module, à un peptide en cours de synthèse (Visca *et al.*, 2007). Ces modules sont composés de plusieurs domaines permettant l'élongation du peptide par l'ajout d'un acide aminé. Chaque module adényle un acide aminé spécifique à un domaine d'adénylation, puis le

transfert et le lie par covalence à un thiol libre présent sur un cofacteur phosphopantéthéine attaché à un domaine de thiolation. Les domaines de condensation des modules permettent la formation des liaisons peptidiques et le transfert du peptide en formation sur l'acide aminé lié à la phosphopantéthéine du module suivant. Pour finir, une thioestérase doit cliver la liaison thioester entre le peptide et le cofacteur phosphopantéthéine du dernier module afin de libérer le peptide. La première NRPS PvdL qui initie la biosynthèse des pyoverdines est la seule qui est commune à tous les Pseudomonas (Ravel and Cornelis, 2003; Gross and Loper, 2009). PvdL comporte quatre modules, le premier incorpore une chaîne myristique ou myristoléique au lieu d'un acide aminé (Hannauer, Schäfer, et al., 2012). Le précurseur de la pyoverdine possède donc une chaîne grasse qui sera perdue au cours de la biosynthèse. Les trois modules suivants de PvdL incorporent ensuite trois acides aminés, l'acide L-glutamique (L-Glu), la Ltyrosine (L-Tyr) et la L-2,4-diaminobutyrate (L-Dab) (Mossialos et al., 2002). L-Tyr et L-Dab vont former le chromophore qui n'est pas encore cyclisé à ce stade. Les acides aminés non naturels sont synthétisés par des enzymes de biosynthèse spécifiques de la pyoverdine. PvdH synthétise le L-Dab à partir de L-aspartate β-semi-aldéhyde (L-ASA) (Vandenende et al., 2004) tandis que la L-\deltaN-formyl-δN-hydroxy-ornithine (L-fOHOrn), utilisé par les NRPS suivants, est synthétisée par PvdA et PvdF à partir de la L-ornithine (McMorran et al., 2001; Meneely et al., 2009). Suite à PvdL, la formation du précurseur de la pyoverdine se poursuit avec les NRPS suivants qui sont cette fois-ci spécifique à chaque souche. Chez P. aeruginosa (Figure 21), la synthèse se poursuit avec PvdI, possédant quatre modules et qui intègre les acides aminés L-Sérine, L-Arginine, L-Sérine et L-fOHOrn. La synthèse se poursuit avec PvdJ, possédant deux modules, qui intègre une L-Lysine et une L-fOHOrn. Pour finir PvdD, qui possède deux modules, intègre deux L-thréonine et libère le précurseur via une thioestérase. Il a été proposé que tous ces NRPS, ainsi que les enzymes synthétisant les acides aminés non naturels, forment un complexe associé sur la membrane appelé sidérosome (Imperi and Visca, 2013; Gasser et al., 2015). Le but de ce complexe serait de limiter la diffusion des précurseurs de la pyoverdine dans le cytoplasme, augmentant sa productivité, mais limitant également la chélation du fer présent dans le cytoplasme qui peut être toxique pour les bactéries (Schalk and Guillon, 2013). D'autres enzymes, dont la fonction n'est pas encore bien connue, semblent également jouer un rôle important dans la biosynthèse de la pyoverdine. L'enzyme MbtH associée aux NRPS pourrait intervenir dans l'adénylation des acides aminés (Drake et al., 2007; Felnagle et al., 2010). Un autre exemple est l'enzyme PvdG qui pourrait être impliquée en tant que thioestérase dans la biosynthèse de la pyoverdine (Lamont and Martin, 2003).



**Figure 21** : A : Etape d'assemblage du précurseur cytoplasmique de la pyoverdine (PVDI) de *Pseudomonas aeruginosa* effectuées dans le sidérosome, en faisant intervenir quatre NRPS (PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD) ainsi que trois enzymes cytoplasmiques (PvdH, PvdF et PvdA). B : Voie de biosynthèse de PVDI, durant laquelle le précurseur de la pyoverdine, formé par le sidérosome dans le cytoplasme, est transporté dans le périplasme par le transporteur PvdE, pour être maturé par les enzymes PvdQ, PvdN, PvdO et PvdP puis excrété par la pompe PvdRT-OpmQ. Adapté depuis (Gasser *et al.*, 2015).

Après libération du précurseur de la pyoverdine par la NRPS PvdD, celui-ci est transporté dans le périplasme par le transporteur ABC PvdE (McMorran *et al.*, 1996; Yeterian *et al.*, 2010). Une fois dans le périplasme, différentes enzymes vont intervenir dans la maturation du précurseur de la pyoverdine. La chaîne myristique ou myristoléique est tout d'abord coupée par l'enzyme PvdQ, appartenant à la famille des Ntn hydrolase (Visca *et al.*, 2007; Clevenger *et al.*, 2017). PvdP, une tyrosinase, catalyse les premières étapes d'hydroxylation et d'oxydation (Nadal-Jimenez *et al.*, 2014), ce qui favorise la cyclisation du chromophore et la formation de dihydropyoverdine. PvdO semblerait intervenir dans la dernière étape d'oxydation permettant la formation du chromophore (Ringel *et al.*, 2018). Comme nous avons pu le voir précédemment, la première étape de formation du précurseur de la pyoverdine et l'incorporation de L-Glu, L-Tyr et L-Dab. La formation du chromophore requiert les résidus L-Tyr et L-Dab. Le L-Glu est quant à lui converti en succinamide, succinate ou  $\alpha$ -cétoglutarate selon les souches. On trouve parfois du malamide et de l'acide malique, voire des traces d'acide succinique cyclisé intramoléculaire. Chez *P. aeruginosa*, par exemple, le glutamate est convertit en succinamide, succinate ou  $\alpha$ -cétoglutarate est convertit en succinamide, succinate ou  $\alpha$ -cétoglutarate selon les souches.

l'implication de l'enzyme PvdN dans la transformation du glutamate en succinamide et succinate a été montrée (Ringel *et al.*, 2016). Récemment, le rôle d'une autre enzyme, PtaA, dans la formation d' $\alpha$ -cétoglutarate à partir du résidu glutamate a également été montrée (Ringel *et al.*, 2017). Certains *Pseudomonas* fluorescents possèdent les deux enzymes PvdN et PtaA, tandis que d'autres possèdent seulement PvdN ou seulement PtaA. Ainsi, certaines souches produisent des pyoverdines issus des deux enzymes, alors que d'autres produisent des pyoverdines (Ringel *et al.*, 2016, 2017).

#### • <u>Sécrétion, import et recyclage de la pyoverdine</u> :

La sécrétion des pyoverdines peut être effectuée via un système de pompe à efflux composé de PvdR, PvdT et OpmQ (Hannauer, Yeterian, *et al.*, 2010) (**Figure 22**). Cependant, ce système ne peut pas être la seule voie de sécrétion. En effet, lorsque la pompe PvdRT-OpmQ est mutée, la bactérie est encore capable de sécréter de la pyoverdine (Hannauer, Yeterian, *et al.*, 2010). L'inactivation de ce système réduit la sécrétion de pyoverdine d'environ 50-60 % (Imperi *et al.*, 2009). Ainsi, d'autres systèmes de sécrétion non connues doivent également être impliqués.

Une fois dans le milieu extracellulaire, les pyoverdines vont chélater avec une forte affinité le fer ferrique. Le complexe pyoverdine-fer va pouvoir ensuite être reconnu par le transporteur TonB dépendant FpvA, qui a été identifié sur la membrane externe (Meyer et al., 1990; Poole *et al.*, 1991) (Figure 22). Ce transporteur est constitué d'un large tonneau  $\beta$  (22) brins  $\beta$  antiparallèles reliés entre eux), un bouchon (domaine globulaire formé par 4 feuillets β), la boîte TonB (qui intéragit avec ExbB et ExbD) et un domaine de signalisation interagissant avec le régulateur sigma FpvR localisé dans la membrane interne (Cobessi, Celia, Folschweiller, et al., 2005; Brillet et al., 2007). Il a été montré que les premiers acides aminés du squelette peptidique de la pyoverdine déterminaient l'affinité de liaison entre le complexe pyoverdine-fer et son transporteur (Greenwald et al., 2009). La liaison du complexe pyoverdine-fer sur son transporteur et l'interaction de FpvA avec la machinerie TonB-ExbBD, permet le transport du complexe grâce à un transfert d'énergie à la membrane externe, permettant d'induire un changement de conformation du transporteur (Greenwald et al., 2009; Schalk et al., 2012). Différents complexes pyoverdine-métal peuvent se lier au transporteur FpvA et dans le cas d'une liaison avec les ions Cu2+, Ga3+, Mn2+ et Ni2+, un import peut être observé. De plus, certains métaux tel que Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> et Ni<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> sont même capables d'induire la production de pyoverdine en se liant à FpvA (Braud, Hoegy, et al., 2009).

Une fois dans le périplasme, le complexe pyoverdine-fer est pris en charge par les protéines FpvC et FpvF, qui sont associées au transporteur ABC FpvDE (Brillet *et al.*, 2012) (**Figure 22**). La réduction du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> se produit dans le périplasme et implique le complexe membranaire FpvGHJK, où FpvG agirait comme réducteur (Ganne *et al.*, 2017). Après réduction, le fer ferreux est probablement pris en charge par la protéine FpvC qui apporte le fer réduit au transporteur ABC FpvDE pour le transport du fer libre dans le cytoplasme (Brillet *et al.*, 2012). L'apo-pyoverdine, correspondant à la pyoverdine non complexée au fer, est probablement prise en charge par FpvF et amenée à la pompe PvdRT-OpmQ (Brillet *et al.*, 2012). Ainsi l'apo-pyoverdine est recyclée dans le milieu extracellulaire afin d'effectuer un nouveau cycle de transport de fer (Greenwald *et al.*, 2009; Imperi *et al.*, 2009). Lorsqu'un complexe entre une pyoverdine et un autre métal que le fer est transporté dans le périplasme par FpvA, le complexe n'est pas dissocié et est ré-excrété par la pompe PvdRT-OpmQ (Hannauer, Braud, *et al.*, 2012).



Figure 22 : Schéma de la biosynthèse, de la sécrétion, de l'import et du recyclage de la pyoverdine chez *Pseudomonas fluorescens* A506. Adapté depuis (Ringel and Brüser, 2018).

#### • <u>Régulation de la voie pyoverdine</u> :

L'expression des gènes impliqués dans la voie pyoverdine est régulée positivement suite à une cascade de signalisation mettant en jeu le transporteur TonB dépendant FpvA, le facteur FpvR<sub>20</sub> et deux facteurs sigma PvdS et FpvI (Lamont and Martin, 2003; Edgar *et al.*, 2017) (**Figure 23**). Le facteur FpvR<sub>20</sub> est un facteur anti-sigma qui inactive PvdS et FpvI, en absence de complexe pyoverdine-fer. Ce facteur est une protéine de 20 kDa, qui résulte d'une auto-protéolyse d'un précurseur FpvR de 38 kDa (Lamont *et al.*, 2002; Draper *et al.*, 2011).

Lorsque le complexe pyoverdine-fer se lie au transporteur FpvA, un signal est transmis à TonB qui permet l'importation de complexe. Cela aboutit au déplacement du domaine de signalisation de FpvA (Brillet *et al.*, 2007) qui interagit avec FpvR et entraîne la protéolyse de ce facteur, via un processus impliquant la protéase RseP (Draper *et al.*, 2011; Bastiaansen *et al.*, 2015). Les facteurs sigma PvdS et FpvI sont donc libérés et peuvent recruter l'ARN polymérase afin d'activer l'expression des gènes impliqués dans la voie pyoverdine (Draper *et al.*, 2011; Llamas *et al.*, 2014). PvdS est nécessaire à l'expression des gènes de biosynthèse de la pyoverdine et des gènes de virulence (Cunliffe *et al.*, 1995; Visca, 2004; Llamas *et al.*, 2014), FpvI est nécessaire à l'expression des gènes codant pour le transporteur FpvA (Rédly and Poole, 2003; Llamas *et al.*, 2014).

L'ensemble de cette voie est régulé négativement par la protéine Fur et sera décrit plus bas (**III. 4. Régulation**).



**Figure 23** : Les principales voies de régulation de la production de pyoverdine (Ringel and Brüser, 2018).

#### b. Production de sidérophores secondaires

La pyoverdine est le sidérophore primaire produit par les *Pseudomonas* fluorescents, cependant presque tous sont capables de produire un autre sidérophore, possédant une affinité plus faible pour le fer (Matthijs *et al.*, 2007, 2009). L'origine des sidérophores secondaires est

assez variable. En effet, certains de ces sidérophores sont dérivés de peptides synthétisés par des NRPS, tels que la pyochéline et l'énantiopyochéline, la pseudomonine, la yersiniabactine, la corrugatine et l'ornicorrugatine (Mercado-Blanco *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2007; Youard *et al.*, 2007; Matthijs *et al.*, 2008; Braud, Hannauer, *et al.*, 2009), tandis que d'autres sont synthétisés par différentes voies, tels que l'achromobactine, la quinolobactine et la thioquinolobactine (Franza *et al.*, 2005; Matthijs *et al.*, 2007) (**Tableau 4**). Cette diversité peut même se rencontrer entre différentes souches d'une même espèce, comme par exemple dans les souches de *P. syringae* (Franza *et al.*, 2005; Youard *et al.*, 2007).

Sidérophores	Organismes	Activité	Références
Pyochéline	P. aeruginosa Burkholderia cepacia	Pro-oxydant Inflammatoire Décomposition d'organoétain Défense des plantes	(Britigan <i>et al.</i> , 1997; Audenaert <i>et al.</i> , 2002; Sun <i>et al.</i> , 2006)
Enantiopyochéline	P. fluorescens	inconnu	(Youard et al., 2007; Hoegy et al., 2009)
Pseudomonine	P. fluorescens P. entomophila	inconnu	(Mercado-Blanco <i>et al.</i> , 2001; Matthijs <i>et al.</i> , 2009)
Yersiniabactine	P. syringae Yersinia pestis Salmonella enterica	inconnu	(Jones <i>et al.</i> , 2007; Petermann <i>et al.</i> , 2008)
Achromobactine	P. syringae Erwinia chrysantemi	inconnu	(Franza <i>et al.</i> , 2005; Berti and Thomas, 2009)
PDTC	P. stutzeri P. putida	Utilisation d'autres métaux Déchloruration	(Lewis <i>et al.</i> , 2004; Leach <i>et al.</i> , 2007; Zawadzka <i>et al.</i> , 2007)
(Thio)quinolobactine	P. fluorescens ATCC17400	Activité anti-fongique et oomycète	(Matthijs et al., 2007)
Corrugatine Ornicorrugatine	P. corrugata P. fluorescens SBW25	inconnu	(Matthijs et al., 2008)

<u>Tableau 4</u> : Sidérophores secondaires produits par des pseudomonades et leurs activités biologiques ou chimiques (Cornelis, 2010).

Différentes fonctions ont été associées à la production de sidérophores secondaires. La première explication est liée à la chélation de fer plus facilement disponible. En effet, la production de pyoverdine implique plus de gènes que ceux impliqués dans la production du sidérophores secondaires et demande donc plus d'énergie à être produite. Ainsi, l'utilisation de ces sidérophores permettrait d'économiser de l'énergie. Une autre explication est liée aux diverses activités intéressantes des sidérophores secondaires telles que l'antibiose, l'induction de mécanismes de défense chez les plantes ou une inflammation, la biodégradation de certains

composés chimiques ou biologiques et l'induction de métabolites secondaires capables par exemple de chélater le fer.

Lors de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la pyochéline (PCH), le second sidérophore produit par *P. aeruginosa*. Cette petite molécule résulte de la condensation d'une molécule de salicylate et de deux cystéines (Cox *et al.*, 1981). Lors de sa synthèse par *P. aeruginosa* deux isoformes sont produites, la PCH1 et la PCH2, mais seule la PCH1 complexe le fer (Schlegel *et al.*, 2004, 2014; Mislin *et al.*, 2006). Ainsi, la pyochéline est capable de chélater le Fe<sup>3+</sup> grâce à quatre groupements fonctionnels le phénolate, l'imine, l'amine tertiaire et le carboxyle avec une stoechiométrie pyochéline-fer de 2:1 (Tseng *et al.*, 2006) et une affinité de 10<sup>28</sup> M<sup>-2</sup> (Brandel *et al.*, 2012). En plus du fer, d'autres métaux peuvent être liés à la pyochéline mais avec une affinité plus faible, tels que Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Eu, Ga, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, Tb, Tl et Zn (Braud, Hannauer, *et al.*, 2009; Youard *et al.*, 2011).



**Figure 24** : Structure de la pyochéline I produite par *P. aeruginosa*. En couleur sont représentés les groupements qui interviennent dans la chélation du fer. Vert : phénolate ; Bleu : imine/amine tertiaire ; Rouge : carboxyle.

#### • Voie de biosynthèse de la pyochéline :

La biosynthèse de la pyochéline est effectuée dans le cytoplasme et fait intervenir sept enzymes de biosynthèse organisées en deux opérons, *pchDCBA* et *pchEFGHI* (Serino *et al.*, 1997; Reimmann *et al.*, 1998) (Figure 25).

La première étape de la biosynthèse consiste à former de l'isochorismate à partir de chorismate via l'action de l'isochorismate synthase PchA (Gaille *et al.*, 2003; Meneely *et al.*, 2013). Suite à cela, PchB l'isochorismate pyruvate-lyase forme du salicylate via l'isochorismate (Gaille *et al.*, 2002). La molécule de salicylate est ensuite activée par adénylation via PchD (Serino *et al.*, 1997) et chargée sur la NRPS PchE afin qu'une première L-cystéine soit liée (Reimmann *et al.*, 1998; Quadri *et al.*, 1999), sous le contrôle de la thioestérase PchC (Reimmann *et al.*, 2004). Pour finir, le dihydroaeruginoate, formé par la

liaison de la première cystéine au salicylate, est transféré à une deuxième NRPS PchF qui lie la deuxième L-cystéine (Reimmann *et al.*, 2004). La pyochéline formée est libérée par la reductase PchG (Reimmann *et al.*, 2001).



<u>Figure 25</u> : Voie de biosynthèse de la pyochéline chez *Pseudomonas aeruginosa* (Gasser *et al.*, 2015).

#### • <u>Sécrétion et import de la pyochéline</u> :

Le mécanisme de sécrétion de la pyochéline n'est pas encore connus (Feinbaum *et al.*, 2012). Les gènes *PchI* et *PchH* ont été identifiés comme pouvant être impliqués dans la sécrétion. Cependant, notre équipe a montré que la délétion de ces gènes n'avait pas d'effet sur la sécrétion de la pyochéline (résultats non publiés).

Après formation du complexe pyochéline-fer, celui-ci est reconnu et importé dans le périplasme par le transporteur de membrane externe TonB dépendant FptA (**Figure 26**). Ce transporteur est constitué d'un tonneau  $\beta$  de 22 brins  $\beta$  antiparallèles reliés entre eux, d'un domaine globulaire formé par 4 feuillets  $\beta$  et de la boîte TonB qui intéragit avec ExbB et ExbD. Ce transporteur ne possède pas de domaine de signalisation sigma/anti-sigma (Cobessi, Celia, and Pattus, 2005). La pyochéline est capable de chélater d'autres métaux que le fer mais seuls le Fe, le Co, le Ga et le Ni peuvent être importés et peuvent s'accumuler dans les bactéries (Braud, Hannauer, *et al.*, 2009). Le site de reconnaissance de FptA est, comme pour tous les transporteurs TonB dépendant, fortement sidérophore-spécifique et même énantio-spécifique. En effet, seul la pyochéline est reconnu et non l'énantiopyochéline (Hoegy *et al.*, 2009). Une fois dans le périplasme, le complexe pyochéline-fer est transporté dans le cytoplasme via la perméase FptX (Youard *et al.*, 2011; Cunrath *et al.*, 2015) (**Figure 26**).

Contrairement à FptA, FptX n'est pas enantio-spécifique et peut donc transporter l'énantiopyochéline complexée au fer (Reimmann, 2012). Ce transport nécessite de l'énergie qui est fournie par la force proton motrice de la membrane interne. Le mécanisme impliqué dans la dissociation du fer de la pyochéline n'est pas encore connu.



**Figure 26 : Voie d'import de la pyochéline chez** *Pseudomonas aeruginosa.* Le fer ferrique est représenté par un cercle jaune et la pyochéline par un arc de cercle bleu. Adapté depuis (Paulen *et al.*, 2017).

#### • <u>Régulation de la voie pyochéline</u>

Une régulation positive et négative de la voie pyochéline est nécessaire. Un des régulateurs connus de la pyochéline est PchR, un régulateur cytoplasmique faisant parti de la famille des régulateurs de type AraC (Heinrichs and Poole, 1993; Michel *et al.*, 2007). Après que le complexe pyochéline-fer ait traversé la paroi bactérienne, celui-ci se lie à PchR. Ainsi le complexe pyochéline-fer-PchR va pouvoir se fixer à une séquence spécifique et conservée, la PchR-box (séquence de 32 paires de bases), qui se trouve en amont des opérons de la voie pyochéline (Michel *et al.*, 2005). Ceci va induire l'expression des gènes des deux opérons de la biosynthèse *pchDCBA* et *pchEFGHI* ainsi que l'opéron de l'import *fptABCX* (Michel *et al.*, 2005, 2007; Youard *et al.*, 2011), mais va également réprimer l'expression de PchR (Michel *et al.*, 2005).

Comme pour la pyoverdine, cette voie est régulée négativement par la protéine Fur que nous décrirons dans le paragraphe **III. 4. Régulation**.

#### c. Utilisation de sidérophores exogènes

Les *Pseudomonas* fluorescents sont des organismes ubiquitaires, pouvant coloniser des niches écologiques très variées comme par exemple l'eau, les sols, les nuages mais également les plantes ou les animaux. Une compétition vis à vis de l'acquisition du fer existe donc entre les micro-organismes. En effet, les systèmes d'import des sidérophores sont généralement spécifiques au sidérophore produit par l'organisme, dû au fait que les pyoverdines possèdent un fragment peptidique très variable et souvent spécifique à une souche. Cependant, il existe des transporteurs permettant l'import de pyoverdines exogènes et d'autres sidérophores, appelés xénosidérophores, produit par d'autres souches mais également d'autres bactéries et champignons (Cornelis and Bodilis, 2009). *P. aeruginosa* est capable d'utiliser le fer chélaté par des différents xénosidérophores comme par exemple des pyoverdines produites par d'autres pseudomonades (Greenwald *et al.*, 2009), l'entérobactine (Poole *et al.*, 1990; Perraud *et al.*, 2018), la desferrioxamine, le ferrichrome (Llamas *et al.*, 2006; Hannauer, Barda, *et al.*, 2010), la cépabactine (Mislin *et al.*, 2006), la mycobactine (Elias *et al.*, 2011).

#### 2. <u>Utilisation de l'hème par les pseudomonades</u>

*P. aeruginosa* possède deux principaux systèmes d'acquisition de l'hème (**Figure 27**). Le premier est le système Phu où les hémoprotéines, protéine contenant un groupe hème comme cofacteur, se lient directement à un transporteur TonB dépendant PhuR (Ochsner *et al.*, 2000). Le système Has quant à lui, implique une protéine de liaison de l'hème, l'hémophore HasA, qui est sécrétée via un système de sécrétion de type I et permet de fixer l'hème présent dans les hémoprotéines afin de l'amener au transporteur TonB dépendant HasR (Létoffé *et al.*, 1999; Ochsner *et al.*, 2000). Une fois dans le périplasme, l'hème est pris en charge par une protéine de liaison périplasmique. Une seule de ces protéines a été décrite chez *P. aeruginosa*, PhuT (Ho *et al.*, 2007). Dans le cytoplasme, la protéine chaperonne PhuS va prendre en charge l'hème, toxique sous forme libre, qui va le transmettre à l'hème oxygénase HemO. Cette dernière protéine va dégrader l'hème sous forme de biliverdine, monoxyde de carbone et Fe<sup>2+</sup> (Bhakta and Wilks, 2006; Lansky *et al.*, 2006; Barker *et al.*, 2012).



Figure 27 : Les systèmes d'acquisition de l'hème Phu et Has chez *Pseudomonas aeruginosa* (Cornelis and Dingemans, 2013).

Parmi tous les génomes de *Pseudomonas* fluorescents, le gène codant pour le récepteur PhuR est le plus conservé, ainsi le système Phu serait le plus commun aux pseudomonades (Cornelis and Bodilis, 2009). Le système Has serait quant à lui important chez les pathogènes (Cornelis, 2010). Un troisième système, le récepteur Hxu, a été identifié chez *P. aeruginosa* (Cornelis and Bodilis, 2009). Cependant, le rôle de ce système dans l'acquisition de l'hème a seulement été étudié chez la bactérie *Haemophilus influenzae* (Fournier *et al.*, 2011).

#### 3. Autres systèmes d'acquisition du fer

#### a. Acquisition du fer ferreux via les phénazines

Le Fe<sup>3+</sup> est la forme majoritaire dans l'environnement, le Fe<sup>2+</sup> ne peut être présent et disponible que dans certaines conditions, c'est à dire en condition anaérobie ou dans des environnements micro-aérobies à pH faible (Andrews *et al.*, 2003). Les bactéries sont capables de produire des métabolites secondaires, les phénazines, pouvant réduire le fer pour le rendre bio-disponible. Chez *P. aeruginosa*, l'acide phenazine-1-carboxylique, précurseur de la pyocyanine produite par cette bactérie, est capable de réduire le Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> (Wang and Newman, 2008). Le fer ferreux peut ensuite diffuser dans le périplasme par des porines pour être ensuite pris en charge par le système FeoABC, permettant le transport du Fe<sup>2+</sup> dans le cytoplasme via le transporteur FeoB (Cartron *et al.*, 2006).

#### b. Système d'import du fer ferrique

Bien que le fer ferrique, forme la plus abondante et peu bio-disponible, soit principalement pris en charge par les sidérophores, un autre système pourrait être impliqué. En effet le système Hit a été identifié chez *P. aeruginosa*, impliquant une perméase de fer ferrique HitB et une protéine de liaison périplasmique HitA (Li *et al.*, 2013; Elhosary *et al.*, 2019).

#### 4. Régulation de l'acquisition du fer

Comme nous avons pu le voir précédemment, le fer est un élément essentiel pour la plupart des organismes. Cependant, à forte concentration celui-ci peut être toxique lié à la capacité du fer à former des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Une régulation de l'homéostasie du fer est donc nécessaire. La régulation positive des sidérophores a déjà été décrite précédemment. Ainsi, l'expression de la majorité des transporteurs TonB-dépendant est positivement régulée via des facteurs sigma/anti-sigma, comme nous avons pu le voir avec la pyoverdine, mais peut également être régulée positivement par des régulateurs AraC, comme pour la pyochéline. Concernant la régulation négative du fer, deux principaux mécanismes ont été mis en avant.

#### a. Régulation via la protéine Fur

La protéine Fur (Ferric Uptake Regulator) fait partie de la superfamille des protéines régulatrices Fur. Cette protéine, identifiée pour la première fois chez *Escherichia coli*, est un répresseur qui contrôle l'expression d'une grande majorité des gènes impliqués dans l'acquisition du fer (Escolar *et al.*, 1999; Hantke, 2001). La protéine Fur forme des dimères dont chaque monomère possède un domaine de liaison à l'ADN en N-terminal et un domaine de dimérisation en C-terminal. Dès que la concentration intracellulaire en fer est optimale, le fer libre Fe<sup>2+</sup> se lie à Fur. Ceci provoque un changement de conformation, permettant la liaison de Fur sur une séquence spécifique de l'ADN, appelé Fur-Box. Un dimère Fur se lie de chaque côté du double brin d'ADN, empêchant la liaison de l'ARN polymérase et réprimant ainsi l'expression des gènes (Fillat, 2014). D'autres protéines régulatrices appartenant à la superfamille Fur ont été identifiées en réponse à différents métaux biologiques : Zur (Zink uptake regulator), Nur (Nickel uptake regulator), Mur (Manganese uptake regulator), PerR (Peroxide stress regulator) et Irr (Heme availability regulator) (Fillat, 2014).

#### b. Les petits ARN régulateurs

D'autres systèmes que la protéine Fur ont également été décrits récemment. En effet, les petits ARN régulateurs semblent jouer un rôle important dans l'homéostasie du fer. Chez *P. aeruginosa*, deux petits ARN PrrF1 et PrrF2, possédant 95% d'homologie, ont été identifiés et seraient impliqués dans l'expression d'au moins une soixantaine de gènes (Vasil, 2007). PrrF1 et PrrF2 interagiraient avec des ARNm et empêcheraient la traduction (Wilderman *et al.*, 2004). Un autre petit ARN régulateur, PrrH, a également été identifié récemment chez *P. aeruginosa* et serait impliqué dans l'homéostasie de l'hème (Reinhart *et al.*, 2015).

#### IV. <u>Mécanismes d'acquisition du magnésium</u>

Le magnésium est le huitième élément le plus abondant dans la croute terrestre (Mikkelsen, 2010). Les ions  $Mg^{2+}$  sont suffisamment présents dans l'environnement pour que les organismes n'aient pas besoin de stocker cet élément. Ainsi, les bactéries ont probablement favorisé le développement de système de répression du  $Mg^{2+}$  contrairement à la mise en place de systèmes d'acquisition du magnésium (Nies, 2007). De ce fait, l'homéostasie et le transport du  $Mg^{2+}$  ont été très peu étudiés et sont donc peu compris, comparé à d'autres métaux tel que le fer.

#### 1. Acquisition du magnésium

Les porines OprQ et OprH ont dans un premier temps été identifiés chez *P. aeruginosa* comme pouvant permettre le transport du  $Mg^{2+}$  du milieu extérieur vers le périplasme. En effet, il a été montré que les gènes codant pour ces porines étaient surexprimés en condition de carence en magnésium (McPhee *et al.*, 2006; Arhin and Boucher, 2010). Une fois dans le périplasme, le  $Mg^{2+}$  peut être pris en charge par trois grandes familles de transporteurs transmembranaires afin de traverser la membrane interne, CorA, MgtA/MgtB et MgtE (Payandeh *et al.*, 2013; Coffey *et al.*, 2014). Ces transporteurs sont trouvés chez *P. aeruginosa* mais également chez d'autres pseudomonades (Coffey *et al.*, 2014).

CorA est probablement la voie d'acquisition du Mg<sup>2+</sup> majoritaire chez les bactéries, des homologues de CorA sont présents chez presque toutes les bactéries que ce soit à coloration Gram-positive ou négative (Payandeh *et al.*, 2013). Ce transporteur est un homopentamère dont chaque monomère est constitué d'un large domaine cytoplasmique en N-terminal suivi de deux hélices transmembranaires. CorA est utilisé lorsque de fortes concentrations en

magnésium sont présentes dans le milieu extracellulaire et il utilise le gradient électrochimique pour transporter le  $Mg^{2+}$  à travers la membrane cytoplasmique (Groisman *et al.*, 2013; Payandeh *et al.*, 2013).

Les transporteurs MgtA et MgtB appartiennent à la superfamille des ATPases de type P et utilise de l'ATP comme source d'énergie pour transporter le  $Mg^{2+}$ . Ces transporteurs sont des monomères constitués d'une partie cytoplasmique contenant un domaine de liaison nucléotidique, un domaine de phosphorylation et un domaine activateur (Groisman *et al.*, 2013). Contrairement à CorA, les gènes *MgtA* et *MgtB* sont exprimés uniquement lorsque la concentration extracellulaire en magnésium est faible (Groisman *et al.*, 2013; Payandeh *et al.*, 2013).

L'implication du transporteur MgtE a été suggérée récemment. La structure de ce transporteur a été décrite chez *Thermus thermophilus* mais d'après les analyses *in silico*, MgtE de *P. aeruginosa* aurait une structure similaire (Coffey *et al.*, 2014). MgtE est donc un homodimère dans lequel la portion cytoplasmique de chaque monomère est constituée d'un domaine N, un domaine cystathionine  $\beta$ -synthase et une hélice de connexion liée au domaine transmembranaire. Comme CorA, le transporteur MgtE utilise le gradient électrochimique pour transporter le Mg<sup>2+</sup> à travers la membrane cytoplasmique (Payandeh *et al.*, 2013; Coffey *et al.*, 2014). Le gène *mgtE* est exprimé lorsque la concentration en magnésium est faible, alors que ce transporteur ne semble pas essentiel pour *P. aeruginosa*. En effet, sa délétion n'affecte pas la croissance en présence d'une faible concentration de magnésium (Coffey *et al.*, 2014).



Figure 28 : Représentation schématique des trois grandes familles de transporteurs de magnésium (Groisman *et al.*, 2013). A : CorA ; B : MgtE ; C : MgtA.

#### 2. <u>Régulation</u>

La régulation de l'acquisition du magnésium est peu connue chez les bactéries du genre Pseudomonas. Un système de transduction de signal à deux composants, PhoP/PhoQ, a principalement été mis en avant dans la régulation des transporteurs MgtA et MgtB chez P. aeruginosa (McPhee et al., 2006; Groisman et al., 2013). Ce système a notamment été décrit chez la bactérie du genre Salmonella mais PhoP/PhoQ est également retrouvé chez P. aeruginosa (Macfarlane et al., 1999; McPhee et al., 2006). Chez Salmonella, lorsque la concentration extracellulaire en Mg<sup>2+</sup> est faible, le système PhoP/PhoQ est activé, ainsi PhoQ va phosphoryler PhoP induisant une inversion du potentiel électrochimique de la membrane, ce qui va limiter l'activité de CorA (Alteri et al., 2011). De plus, PhoP active l'expression des gènes mgtA qui seront transcrits si la concentration cytoplasmique en Mg<sup>2+</sup> est trop faible (Véscovi et al., 1996). En effet, l'élongation de la transcription de la région codante de mgtA est contrôlée par la région en amont des transcrits. Cette région est un système de type riborégulateur, appelé riboswitch, qui permet un changement de conformation de l'ARN lorsque du Mg<sup>2+</sup> se fixe sur cette région (Cromie et al., 2006; Park et al., 2010). Ainsi, lorsque le cytoplasme présente une concentration élevée en Mg<sup>2+</sup>, le changement de conformation de l'ARN permet une interaction avec le facteur de terminaison de la transcription Rho qui arrête la transcription (Hollands et al., 2012). Inversement, lorsque la concentration cytoplasmique en Mg<sup>2+</sup> est faible, l'ARN prend une autre conformation qui ne réagit pas avec le facteur de terminaison de la transcription Rho, permettant donc de continuer la transcription de la région codante et de produire la protéine MgtA (Cromie et al., 2006; Cromie and Groisman, 2010). Bien que la présence du système PhoP/PhoQ et son implication dans la régulation du Mg<sup>2+</sup> a été montrée chez P. aeruginosa (McPhee et al., 2006), nous ne savons pas si le mécanisme d'action est identique à Salmonella. Le transporteur MgtE n'est pas sous le contrôle de PhoP/PhoQ mais d'après les études effectuées chez Bacillus, il est régulé par un riboswitch sensible au Mg<sup>2+</sup> présent en amont de l'ARN. Comme pour mgtA, la région codante est transcrite lorsque la concentration cytoplasmique en Mg<sup>2+</sup> est faible. Cette transcription n'est pas contrôlée par le facteur de terminaison de la transcription Rho mais par un facteur de terminaison intrinsèque qui agit lors du changement de conformation de l'ARN après fixation du Mg<sup>2+</sup> sur le riboswitch (Dann et al., 2007). La régulation de MgtE chez les Pseudomonas n'est pas connue.



<u>Figure 29</u> : Systèmes de régulation des transporteurs MgtA chez *Salmonella* (a) et MgtE chez *Bacillus subtilis* (b) (Groisman *et al.*, 2013).

### **Chapitre 4**

# Altération biologique de l'amiante

Comme nous avons pu le voir précédemment, les amiantes sont des minéraux à texture fibreuse connus depuis des milliers d'années. En effet, nos ancêtres du néolithiques (5500 avant Jésus Christ) utilisaient déjà les fibres d'amiante, mélangées avec de l'argile et du limon, pour fabriquer des poteries (Dériot and Godefroy, 2005). Associé à cette utilisation, les dangers de l'amiante ont déjà été mentionnés par Pline l'Ancien, qui remarqua les dommages pulmonaires dont souffraient les esclaves romains chargés du tissage de vêtements d'amiante (Dériot and Godefroy, 2005). C'est seulement en 1960, que Wagner et al. démontrent un lien entre l'exposition à l'amiante et l'apparition de mésothéliomes (cancer des surfaces mésothéliales) (Wagner et al., 1960; Dériot and Godefroy, 2005). En 1977, toutes les variétés d'amiantes ont été classées cancérogènes par le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) (Dériot and Godefroy, 2005) et ont été finalement interdites en France le 1er janvier 1997 (Dériot and Godefroy, 2005; Ruffié and Margery, 2007). Du fait de ses propriétés exceptionnelles (résistance thermique, mécanique, chimique...) et de son faible coût, l'amiante a été utilisé abondamment depuis la révolution industrielle jusqu'à son interdiction en 1997 (Dériot and Godefroy, 2005; Ruffié and Margery, 2007). L'amiante-ciment, matériau à base de fibres d'amiante le plus répandu destiné à la construction, est encore présent dans de nombreux bâtiments et équipements (Dériot and Godefroy, 2005). Le risque d'exposition à l'amiante reste donc important. Ajouté à ce risque, le désamiantage et la gestion des déchets amiantés restent un problème et un challenge pour les années à venir. En effet, les seules méthodes utilisées sont le stockage ou la vitrification par technologie plasma (Dériot and Godefroy, 2005; Damien, 2016). Cependant aucune de ces méthodes n'est vraiment satisfaisante. La première méthode nécessite un espace de stockage important et la seconde génère d'une part un nouveau déchet et est d'autre part coûteuse en énergie (Damien, 2016). La recherche de nouveaux moyens de traitements semble donc urgent afin d'éviter tout risque d'exposition. Parmi les procédés en voie de développement, nous avons décrit précédemment (chapitre 1) les procédés physico-chimiques. Nous allons dans ce chapitre 4 nous intéresser à la bio-remédiation. Cette technique, qui consiste à utiliser des organismes vivants pour traiter les déchets ou dépolluer les sols, est naturelle et peu coûteuse (Vidali, 2001). Nous détaillerons les études d'altération impliquant les organismes (champignons, lichens, plantes et bactéries), les sidérophores et les acides organiques.

#### I. <u>Altération par différents organismes</u>

#### 1. Capacité des champignons à altérer l'amiante

Différents mécanismes fongiques sont impliqués dans le processus d'érosion des roches et des minéraux. L'activité biomécanique, liée à la pénétration en profondeur des hyphes fongiques, permet une détérioration de la roche (Daghino et al., 2010). Cependant, ce processus n'agirait pas seul et serait associé à une activité biochimique, impliquant la libération d'acides organiques ou de sidérophores, facilitant la pénétration des hyphes par solubilisation du substrat (Daghino et al., 2010). Comparé aux bactéries et aux plantes, la capacité des champignons à altérer les fibres d'amiante a bien été décrite dans la littérature. Mortierella hyalina, Oidiodendron griseum, Fusarium oxysporum et Oidiodendron maius sont parmi les premiers champignons à avoir été décrits pour leur capacité à dégrader l'amiante par dissolution du fer présent dans les fibres (Martino et al., 2003, 2004). Le mycélium fongique permet de limiter la dispersion des fibrilles via l'adhésion de ces dernières aux hyphes et contribuent également à l'altération, via la libération de sidérophores (Martino et al., 2004; Daghino et al., 2008). L'incubation de fibres de crocidolite et de chrysotile en présence de F. oxysporum, connu pour sa capacité à libérer des sidérophores, a notamment permis de réduire la libération de radicaux libres, diminuant ainsi la toxicité des fibres (Martino et al., 2003; Daghino et al., 2006). De façon intéressante, F. oxysporum a pu dégrader différents types d'amiantes. L'incubation de ce champignon avec des fibres de crocidolite, chrysolite et amosite a permis d'extraire respectivement 1,39%, 5,57% et 1,12% du fer présent dans les fibres (Daghino et al., 2005). En plus du fer, F. oxysporum a pu également extraire 11,8% de magnésium de fibres de chrysotile (Daghino et al., 2009). Une autre moisissure, Verticillium leptobactrum, isolée d'un site serpentinique dans l'ouest des alpes (Daghino et al., 2008), a montré une forte capacité d'altération des fibres d'amiante (Daghino et al., 2006, 2009). Cette dégradation serait également liée à la production de sidérophores par ce dernier (Daghino et al., 2008). V. leptobactrum a en effet été capable d'altérer des fibres de crocidolite avec 7,3% de fer extrait (Daghino et al., 2006) et des fibres de chrysotile avec des rendements d'extraction de 33,6% pour le fer (Daghino et al., 2006), 22,3% pour le magnésium et 11,7% pour la silice (Daghino et al., 2009). De façon similaire à F. oxysporum, V. leptobactrum a supprimé la capacité des fibres de crocidolite à libérer des radicaux libres. Cependant, de façon étonnante, cette libération a été augmentée pour les fibres de chrysotile (Daghino et al., 2006). D'autres champignons, Aspergillus tubingensis et *Coemansia reversa*, ont également été identifiés récemment et ont montré leurs capacités à dissoudre le fer présent dans des fibres d'amiantes. Tout comme *F. oxysporum* et *V. leptobactrum*, ces moisissures produisent des sidérophores qui pourraient être impliqués dans l'altération (Bhattacharya, John, *et al.*, 2016).

#### 2. Altération par les lichens

Les lichens, organismes composites résultant de la symbiose d'algues et/ou de cyanobactéries avec des champignons, ont montré leurs capacités à se développer en présence d'amiante et à modifier les propriétés physico-chimiques des fibres. Les lichens peuvent en effet coloniser de façon naturelle les sols amiantifères (Favero-Longo et al., 2006) ou les matériaux amiantés d'origine anthropique (Martin et al., 1992), conduisant à une bioatténuation de la libération des fibres, ainsi qu'à une dissolution de l'amiante. Le phénomène de bioatténuation par les lichens a notamment été décrit au niveau d'une ancienne mine d'amiante (Favero-Longo et al., 2006). En effet, depuis l'abandon de cette mine, différentes espèces de lichen, tel que Scoliciosporum umbrinum, Candelariella vitellina et Xanthoparmelia tinctina, ont commencé à coloniser cette région, réduisant la dispersion des fibres d'amiante. Ajouté à cela, une altération des fibres d'amiante a été observée, liés à la production de métabolites par les lichens, tels que l'acide oxalique, pulvinique et norstictique, qui ont permis de dissoudre le magnésium présent dans des fibres de chrysotile (Favero-Longo et al., 2005, 2007; Turci et al., 2007). Cette dissolution a permis la libération du fer le plus réactif, présent sur la surface, diminuant ainsi la toxicité des fibres (Favero-Longo et al., 2005; Turci et al., 2007). La colonisation de plaques de fibrociment par des lichens, appartenant au genre Candelariella, a également été observée (Christensen, 2004; Favero-Longo et al., 2009). Tout comme les amiantes d'origine naturelle, ces organismes ont été capables de modifier les propriétés physico-chimiques des fibres d'amiantes présentes dans des plaques de ciment amiantés. Une étude a notamment montré que le recouvrement par des lichens de plaques amiantés, composés de fibres de chrysotile et de crocidolite, forment une barrière physique sur ces matériaux, permettant de réduire d'environ 30% la dispersion des fibres. En plus de ce phénomène de bioatténuation, une réduction de la surface réactive par dissolution des éléments présents a été observée (Favero-Longo et al., 2009). Une autre étude a en effet montré que les lichens qui se développent sur des plaques de fibrociment libèrent de l'acide oxalique, rendant les fibres amorphes et non toxiques (Favero-Longo et al., 2005).

#### 3. Utilisation des plantes

Différentes plantes possèdent une capacité de dépollution naturelle des sols, pouvant notamment être utilisée dans le cas de sols amiantifères. Bien que la toxicité de l'amiante sur la croissance de certaines plantes ait été montrée (Trivedi and Ahmad, 2011), certaines espèces sont capables de se développer en présence d'amiante. Une étude a par exemple permis de mettre en évidence que la colonisation d'une ancienne mine d'amiante par des communautés de plantes, a permis d'aboutir à une bioatténuation de la libération de fibres d'amiante, diminuant ainsi le risque d'exposition (Favero-Longo et al., 2006). D'autre part, la phytoremédiation, notamment la phytoextraction, pourrait être envisagée pour dégrader l'amiante présent dans les sols. En effet, la phytoextraction est un procédé permettant l'extraction et l'accumulation dans les plantes de grandes quantités de métaux provenant de sols pollués (Lasat, 2002). Les sols serpentiniques sont connus pour être riches en métaux lourds tels que le chrome et le nickel (Ho et al., 2012; Chardot-Jacques et al., 2013). La croissance d'Oryza sativa et Zea mays sur des sols contaminés par de l'amiante provenant d'une mine en Inde, a par exemple permis l'extraction et l'accumulation d'une quantité significative de nickel, de chrome et de plomb présents en fortes concentrations (Kumar and Maiti, 2014). D'autres études ont également mis en avant la capacité de différentes plantes a extraire du nickel (Ho et al., 2012) mais également du zinc et du cuivre (Brankovic et al., 2015) présents dans des sols serpentiniques. Par ailleurs, les plantes ne permettent pas seulement l'extraction des métaux lourds présents dans les sols amiantifères. Une étude a montré qu'après 15 jours en présence d'une plante hyperaccumulatrice, Leptoplax emarginata, 2 fois plus de magnésium et 50 fois plus de nickel ont été extraits d'un sol serpentinique comparé au témoin sans la plante. L. emarginata a accumulé environ 88% du nickel total mobilisé et a ainsi montré sa capacité à dissoudre du chrysotile par extraction de nickel mais également de magnésium (Chardot-Jacques et al., 2013) (Figure 30).



**Figure 30** : Représentation schématique des processus de phytoextraction du nickel par la plante hyperaccumulatrice *Leptoplax emarginata* (Chardot-Jacques *et al.*, 2013).

Les bactéries présentes dans la rhizosphère pourraient être à l'origine de l'augmentation de l'érosion du chrysotile, permettant ainsi à la plante d'utiliser les métaux qui étaient non disponibles. Le rôle des bactéries associées aux plantes hyperaccumulatrices a également été décrit dans des sols serpentiniques en Inde (Pal *et al.*, 2007). Cette étude a en effet montré que les bactéries rhizosphériques d'hyperaccumulateurs de nickel étaient capables de tolérer de forte concentration en nickel et possédaient un potentiel d'absorption de ce métal.

La phytoextraction associée à l'action des bactéries est un procédé prometteur pour dépolluer les sols contaminés par des métaux (Braud, Jézéquel, *et al.*, 2009; Lebeau *et al.*, 2008). Les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) semblent jouer un rôle important dans ce processus de phytoremédiation. En effet, ces microorganismes ont une place importante dans le recyclage des éléments nutritifs de la plante, le maintien de la structure du sol, la détoxification des produits chimiques nocifs et le contrôle de la croissance des plantes (Rajkumar *et al.*, 2009). Les bactéries peuvent donc augmenter la capacité de remédiation des plantes et réduire la phytotoxicité des sols contaminés. Pour cela, différents mécanismes sont mis en jeu (**Figure 31**) :

La production de sidérophores, molécules organiques ayant une forte affinité pour les ions ferriques, peuvent également se complexer avec d'autres métaux. Ceux-ci pourront ensuite être assimilés par la plante, augmentant sa croissance (Rajkumar *et al.*, 2009).

- La solubilisation du phosphate. Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour le développement et la croissance des organismes vivants. Cependant, le P est très peu disponible dans les sols. Les bactéries vont donc permettre de solubiliser le P sous forme de phosphate, qui sera assimilable par la plante (Rajkumar *et al.*, 2009).
- La production de phytohormones et notamment d'auxine ou acide indole 3-acétique (AIA) impliquée dans la croissance racinaire (Rajkumar *et al.*, 2009).
- L'utilisation de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) par les bactéries.
  En effet, les PGPB possèdent l'enzyme ACC désaminase qui clive l'ACC produit par les plantes en ammoniac et alpha-cétobutyrate. Ce clivage est tout d'abord une source de carbone et d'azote pour les bactéries mais cela va également permettre une élongation des racines de la plante, car l'ACC est le précurseur d'une phytohormone, l'éthylène, qui joue un rôle dans l'inhibition de la croissance racinaire (Rajkumar *et al.*, 2009).



<u>Figure 31</u>: Représentation schématique des mécanismes favorisant la croissance végétale des bactéries rhizosphériques dans les sols serpentiniques (Rajkumar *et al.*, 2009).

En plus de favoriser la croissance de la plante et donc la capacité de phytoremédiation, les PGPB agissent sur l'assimilation et l'accumulation des métaux par les plantes. En effet, ces

bactéries peuvent favoriser la biodisponibilité des métaux non disponibles, par acidification ou production de sidérophores, permettant une plus grande accumulation de métaux dans la plantes (Rajkumar *et al.*, 2009).

#### 4. Potentiel de dégradation des bactéries

Les bactéries sont capables de dégrader les minéraux retrouvés dans les sols mais également ceux retrouvés dans les matériaux de construction (Gadd, 2017). Cependant, peu d'études ont été effectuées sur l'interaction entre les bactéries et l'amiante. La dissolution de serpentine par Bacillus mucilaginosus a été montrée après 30 jours d'incubation (Yao et al., 2013). Une forte concentration de magnésium a en effet été dissoute, favorisée par une diminution du pH ainsi qu'à la sécrétion d'acides organiques et de ligands, augmentant l'amorphisation des minéraux. Récemment, une équipe a travaillé sur l'altération de fibres d'amiantes natifs par des bactéries isolées d'une mine d'extraction d'amiante et ont été mises en contact avec des fibres d'amiante provenant de minerais utilisés dans la production d'amiante-ciment. Cela a conduit à l'identification de deux souches bactériennes à coloration Gram-positive, probablement des Staphylococcus et deux souches à coloration Gram-négative potentiellement capables d'extraire le fer des fibres d'amiantes (Bhattacharya et al., 2015). Cette dissolution du fer a été associée à la production de sidérophores par ces bactéries, dont la structure n'a pas été identifiée et semble ainsi être une stratégie prometteuse pour la dégradation de l'amiante (Bhattacharya, Ledwani, et al., 2016). Concernant les matériaux amiantés d'origine anthropique, quelques études se sont intéressées à l'altération des fibrociments par les bactéries. La présence de Nitrosomonas et de Nitrobacter, des bactéries nitrifiantes, sur des plaques de fibrociment, cause une dégradation chimique via la production d'acide nitreux et nitrique (Wasserbauer et al., 1988). Ceci aboutit à une augmentation de la porosité et une diminution de la solidité des plaques d'amiante-ciment. La dégradation par les bactéries de tuyaux de fibrociment, utilisés dans la distribution de l'eau, a également été étudiée. En effet, une croissance bactérienne à la surface interne des tuyaux provoquerait une corrosion associée à une diminution de l'épaisseur du tuyau (Wang and Cullimore, 2010; Wang et al., 2011). Les bactéries responsables de la formation d'un biofilm, productrices d'acides et hétérotrophes aérobies favoriseraient la dissolution de la matrice cimentaire. L'altération des fibres n'a cependant pas été montrée.

#### II. Dissolution des amiantes via les sidérophores

L'impact des fibres d'amiante sur la santé est bien connu. De nombreuses études ont montré le rôle important du fer dans ce processus. La présence de fer dans les fibres entraine la production de radicaux libres impliqués dans les cassures d'ADN et l'apparition de cancer (Valko et al., 2015; Toyokuni, 2016). Différentes études ont montré le potentiel de bioremédiation des êtres vivants et notamment la capacité de certains organismes à altérer les fibres d'amiante par extraction des métaux. Le mécanisme commun des plantes, des champignons et des bactéries est la production de sidérophores, molécules possédant une forte affinité pour le fer (Daghino et al., 2006; Rajkumar et al., 2009; Bhattacharya, Ledwani, et al., 2016). L'utilisation de sidérophores afin de traiter l'amiante est donc une stratégie prometteuse. L'impact des sidérophores d'origine végétale ou fongique sur la dégradation des fibres d'amiantes a été peu exploré. Une équipe s'est intéressée aux catéchines extraites du thé vert et a montré que ce composé avait un effet protecteur contre les dégâts cellulaires provoqués par les fibres de chrysotile et de crocidolite (Kostyuk et al., 2000). Les catéchines sont en effet capables de piéger les ions superoxydes et de chélater les ions fer. Concernant les sidérophores fongiques, l'action du ferrichrome sur des fibres de chrysotile a été examinée. Les résultats ont montré que ce sidérophore était capable d'extraire le fer présent dans les fibres d'amiante, accompagné par une diminution de la toxicité via une baisse de production de radicaux libres (Mohanty et al., 2018). En plus de ce sidérophore fongique, un sidérophore d'origine bactérienne a été testé, la desferrioxamine produit par Streptomyces pilosus. Ce sidérophore bactérien a également pu chélater le fer présent dans les fibres de chrysotile, atteignant une quantité extraite identique à celle obtenue avec le ferrichrome pour une même concentration. Une baisse de la toxicité des fibres a également été observée mais plus faible qu'avec le sidérophore fongique (Mohanty et al., 2018). La chélation du fer présent dans les fibres d'amiantes via l'utilisation de sidérophores, permettrait donc de réduire la toxicité de l'amiante et pourrait être utilisé comme procédé de bioremédiation (Figure 32).

# Is bioremediation of asbestos fibers feasible?

**Figure 32** : Schéma illustrant le mécanisme d'altération des exudats microbiens sur des fibres d'amiante via la chélation du fer (Mohanty *et al.*, 2018).

D'autres études ont montrées l'impact de la desferrioxamine sur la dégradation et la toxicité de l'amiante. Ce sidérophore a en effet été capable d'extraire le fer présent dans des fibres de crocidolite (Chao and Aust, 1994; Werner *et al.*, 1995) et d'amosite (Chao and Aust, 1994), de façon plus efficace que l'EDTA dont l'affinité est de  $10^{20}$  M<sup>-1</sup> et le citrate, deux autres chélateurs de fer. La conséquence de l'extraction du fer présent dans l'amiante est une baisse de la toxicité. En effet, lorsque des fibres sont prétraitées avec de la desferrioxamine une diminution des dommages génétiques est observée, quelque soit le type d'amiante chrysotile (Poser *et al.*, 2004), amosite (Gold J *et al.*, 1997) ou crocidolite (Hardy and Aust, 1995; Gold J *et al.*, 1997; Poser *et al.*, 2004).

#### III. Dégradation de l'amiante par les acides organiques

L'influence des acides sur la dégradation de l'amiante, notamment du chrysotile, est bien connue et divers procédés d'attaque acide ont été développés. Cependant, les principaux acides utilisés sont des acides forts, nécessitant des précautions d'emploi et une voie de traitement spécifique des effluents à la fin du processus de dégradation. L'utilisation d'acides organiques, dont l'efficacité a été montrée, permettrait donc de remédier à cela et serait également plus économique et écologique. Dans ce contexte, différents acides organiques ont été testés comme par exemple le citrate qui est également un chélateur de fer. Ce composé a montré sa capacité à extraire le fer présent dans des fibres de crocidolite (Chao and Aust, 1994; Werner *et al.*, 1995) mais également d'amosite (Chao and Aust, 1994). L'acide

oxalique a également permis la dissolution de la couche de brucite de fibres de chrysotile (Thomassin et al., 1977; Rozalen et al., 2014), diminuant la toxicité de celles-ci (Monchaux et al., 1981; Favero-Longo et al., 2005). En effet, la quantité de radicaux libres produits par les fibres de chrysotile diminue fortement après traitement par de l'acide oxalique, dû à la libération du fer présent sur les fibres via la dissolution de la couche de magnésium (brucite) du chrysotile (Favero-Longo et al., 2005). Un acide organique d'origine végétale, l'acide phytique, a aussi été capable de diminuer la toxicité des trois principaux types d'amiante le chrysotile (Kamp et al., 1995; Poser et al., 2004), l'amosite (Kamp et al., 1995) et la crocidolite (Poser et al., 2004). Outre son pouvoir acide, l'acide phytique possède également des propriétés de chélation notamment du fer, expliquant la réduction de la production de radicaux libres ainsi que des dégâts cellulaires et génétiques. La capacité des lichens à altérer les fibres d'amiante a été décrite précédemment et le rôle des acides organiques a été mis en avant (Favero-Longo et al., 2005). Une approche biomimétique d'altération de fibres de chrysotile par les métabolites produits par les lichens a donc été effectuée. Pour cela, différents acides organiques, norstictique, pulvinique et oxalique produits par les lichens, ont été mis en contact avec des fibres de chrysotile (Turci et al., 2007). Une dissolution et une amorphisation des fibres ont été observées, quelque soit l'acide utilisé. Cette approche a également permis de diminuer de la toxicité des fibres via réduction de la libération de radicaux libres (Turci et al., 2007).

D'autres procédés de traitement ont été développés, utilisant des effluents acides provenant de l'industrie agroalimentaire ou utilisant directement les processus de fermentation. Un procédé utilisant le petit lait issu de l'industrie laitière a par exemple été développé pour traiter des déchets de fibrociment (Balducci *et al.*, 2012). En effet, le petit lait est un déchet acide, composé notamment d'acide lactique, qui permet de libérer les fibres d'amiantes de ces déchets en dissolvant la matrice cimentaire. Les fibres sont ensuite traitées par une attaque hydrothermale permettant d'obtenir un déchet inerte (Balducci *et al.*, 2012). Une approche similaire a été développée, utilisant la fermentation obscure afin de prétraiter les déchets de fibrociment par dissolution de la phase cimentaire (Spasiano *et al.*, 2017, 2019). Enfin, un traitement hydrothermal et une digestion anaérobie sont effectués afin de traiter les déchets amiantés, ce procédé permet de produire du biogaz via la fermentation obscure et la digestion anaérobie (Spasiano *et al.*, 2019) (**Figure 33**).



**<u>Figure 33</u>** : Procédé de traitement de déchets de fibrociment, utilisant la fermentation obscure, un traitement hydrothermal et une digestion anaérobie (Spasiano *et al.*, 2019).

#### **Objectifs**

Bien que l'amiante soit interdit en France depuis 1997, le désamiantage ainsi que le traitement des déchets amiantés reste un problème et un challenge pour les années à venir. En effet, étant donné que les procédés actuels de traitement de l'amiante ne sont pas satisfaisants, la recherche de nouveaux moyens de traitements semble donc urgente afin d'éviter tout risque d'exposition. La plupart des études se sont focalisées sur le développement de traitement physico-chimique coûteux ou peu respectueux de l'environnement. L'objectif de ce projet de recherche est donc de développer un procédé biotechnologique permettant le traitement de déchets amiantés. Pour cela, nous avons travaillé sur deux principaux déchets utilisé dans la construction, les déchets de flocage composés de chrysotile associée à une matrice de gypse et les fibrociments composés d'une matrice cimentaire associée à du chrysotile majoritairement mais pouvant également contenir en plus des amphiboles. Ce projet s'est axé sur le développement et la faisabilité de trois voies biologiques d'altération.

- La première voie utilise les pyoverdines, sidérophores bactériens produit par les *Pseudomonas* fluorescents lors de carence martiale et ayant une forte affinité pour le fer. Le but de cette voie est d'utiliser le pouvoir chélateur des pyoverdines pour altérer l'amiante par dissolution du fer présent dans les fibres.

- Une deuxième voie implique l'action directe des *Pseudomonas* fluorescents. Le fer et le magnésium sont des éléments retrouvés dans la structure des fibres d'amiante, représentant des nutriments essentiels pour ces bactéries. L'intérêt de cette voie est donc d'utiliser la capacité des bactéries à puiser ces métaux dans ces minéraux par différents mécanismes (acides organiques, sidérophores, oxydo-réduction...) afin de dégrader les fibres d'amiante.

- La dernière voie consiste à utiliser des solutions d'acides organiques. En effet, le chrysotile mais également les matrices liant les amiantes telles que le ciment ou le gypse étant sensibles à l'acidité, j'ai donc proposé de tester l'altération des amiantes en utilisant différentes solutions d'acides organiques provenant de l'industrie agro-alimentaire, le jus de choucroute et le petit lait.

Parallèlement, nous avons également étudié les interactions bactéries-amiantes, afin de comprendre les mécanismes bactériens impliqués dans la dégradation de l'amiante. Cet aspect fondamental nous a permis d'optimiser les procédés testés, permettant d'envisager un traitement biotechnologique efficace des déchets amiantés.

## Résultats
## **Chapitre 5**

# Altération d'amiantes natifs

### I. Introduction

De nombreux exemples dans la littérature décrivent le rôle des bactéries et de certains sidérophores dans l'altération de minéraux. Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'action bactérienne sur la dégradation des amiantes. Les études sur la capacité des organismes vivants à altérer l'amiante se sont principalement focalisées sur les champignons (Martino *et al.*, 2004; Daghino *et al.*, 2010; Bhattacharya, John, *et al.*, 2016), mais peu ce sont intéressées à l'interaction entre les bactéries et les fibres d'amiante, alors que ces organismes semblent être capable d'altérer de façon efficace ces matériaux. *Bacillus mucilaginosus* a par exemple pu dissoudre de la serpentine et augmenter l'amorphisation de ce minéral (Yao *et al.*, 2013). Les sidérophores semblent être un mécanisme commun utilisé par de nombreux organismes et l'utilisation de ces composés dans le traitement des fibres d'amiante a montré des résultats prometteurs. Cependant, seul un sidérophore bactérien, la desferrioxamine produit par *Streptomyces pilosus*, a été étudié et a prouvé son efficacité dans l'extraction du fer présent dans les fibres de différents amiantes, serpentine et amphibole (Werner *et al.*, 1995; Mohanty *et al.*, 2018).

Les bactéries du genre Pseudomonas, connues pour leur capacité de bioremédiation, sont présentes dans les sols et produisent une large variété de sidérophores. La bactérie de référence dans notre travail est Pseudomonas aeruginosa car ces mécanismes d'acquisition du fer sont bien connus. Cette bactérie est capable de produire deux sidérophores, la pyoverdine et la pyochéline dont les voies de biosynthèse ont bien été décrites. Nous avons donc voulu étudier les interactions entre P. aeruginosa et les amiantes ainsi que l'importance de la pyoverdine et de la pyochéline dans la dégradation des fibres. Nous avons voulu dans un premier temps comparer l'efficacité de la pyoverdine et de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) sur le traitement de différents types d'amiante natif, le chrysotile, la crocidolite et l'amosite. L'EDTA est l'un des meilleurs complexants métalliques (Nowack et al., 2001). La dissolution du fer des fibres d'amiante par ces composés a permis d'évaluer leur efficacité. Etant donné la différence de structure et de comportement chimique entre les serpentines et les amphiboles, nous voulions également voir si la pyoverdine était capable d'extraire du fer quel que soit le type d'amiante. Nous avons ensuite analysé la capacité d'altération des fibres d'amiante par P. aeruginosa et étudié le rôle de la pyoverdine et de la pyochéline dans cette dégradation. Pour cela nous avons utilisé la souche sauvage de P. aeruginosa et deux mutants sidérophore, une souche ne produisant pas la pyochéline et une ne produisant pas la pyoverdine. La dissolution du fer des fibres d'amiante par ces bactéries ou leurs surnageant a été suivie après incubation. Suite aux expériences de dissolution par *P. aeruginosa*, nous avons observé et cartographié les éléments au sein des fibres d'amiante par microscopie électronique à transmission afin d'identifier d'une part la formation d'un biofilm et d'autre part une diminution de la quantité de fer dans les fibres après contact avec les bactéries.

### II. <u>Contribution des auteurs</u>

Sur l'article présenté ici, ma contribution a été la mise en forme de certains résultats, leur exploitation et ma contribution à la rédaction et soumission de l'article. V. Geoffroy a réalisé toutes les expériences d'altération des amiantes natifs par les sidérophores ou les bactéries. D. Ihiawakrim a effectué les analyses en microscopie électronique à transmission sur les échantillons traités et R. Regis de la société méditerranéenne des zéolithes, a fourni les échantillons d'amiante.

### III. <u>Résumé des résultats obtenus sur l'altération des amiantes</u> <u>natifs</u>

A travers cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle des Pseudomonas et de leurs sidérophores sur l'altération des amiantes natifs. Nos résultats ont montré dans un premier temps que les sidérophores produits par Pseudomonas étaient capables d'extraire le fer présent dans les amiantes appartenant aux deux grandes familles, serpentine (chrysotile) et amphiboles (amosite et crocidolite pour notre étude). Le rôle de la pyoverdine a notamment été mis en avant et a montré une efficacité supérieure comparée à l'EDTA, un chélateur chimique du fer. La pyoverdine pourrait donc être un bon candidat pour un traitement biologique de l'amiante. D'autre part, nous avons également mis en avant la capacité d'altération par les bactéries. Après croissance en présence d'amiante, une diminution de la quantité de fer a été observée sur les fibres de crocidolite. Les bactéries pourraient donc également être utilisées pour traiter les amiantes. Une diminution de la quantité de fer dans les amiantes permettrait en effet de réduire la toxicité des amiantes comme cela a été montré lors d'études précédentes (Poser et al., 2004; Mohanty et al., 2018). Les résultats obtenus nous ont permis d'avoir une preuve de concept pour le développement d'un procédé de traitement de l'amiante en utilisant les Pseudomonas et leurs métabolites, permettant de poursuivre nos recherches en utilisant cette fois-ci des déchets amiantés.

## **Chapitre 6**

# Altération de déchets de flocage

### I. Introduction

Dans le chapitre précédent (article 1), nous avons montré que les Pseudomonas ainsi que leurs sidérophores étaient capables d'altérer les fibres d'amiantes natifs par extraction du fer. Ces résultats étant prometteurs, nous avons donc voulu poursuivre nos recherches sur des déchets amiantés tels que les déchets de flocage ou fibrociment présentant des liants emprisonnant les fibres tels que du gypse ou du ciment. Nous nous sommes également intéressés à l'extraction du magnésium, élément retrouvé dans la composition des amiantes, notamment du chrysotile et qui constitue un élément essentiel pour la croissance bactérienne. Notre étude s'est focalisée dans un premier temps sur les déchets de flocage, qui sont généralement composés d'une forte proportion de fibres d'amiantes pouvant atteindre 50 à 90% du matériau et dont l'altération par des organismes vivants n'a jamais été étudiée. Les flocages sont également connus pour être très friables, favorisant ainsi la libération d'une grande quantité de fibres. Les déchets de flocage, utilisés dans cette étude, proviennent du chantier de désamiantage de l'Université de Paris-Jussieu (barre 33-34) et ont été caractérisés comme étant composés de chrysotile et de gypse (collaboration avec Institut Charles Gerhardt Montpellier). Certains déchets de flocage étaient composés d'amosite et de gypse. Une minéralisation des déchets de chrysotile gypse a permis de déterminer la composition chimique en fer et en magnésium.

Le premier objectif a été l'étude de la capacité de chélation des pyoverdines pour extraire le fer présent au sein des fibres d'amiantes. Plus d'une centaine de pyoverdines différentes ont été décrites chez les *Pseudomonas* fluorescents (Hider and Kong, 2010), mais l'affinité de ces composés pour le fer n'est pas connue à ce jour. Nous avons donc voulu dans un premier temps comparer l'efficacité de différentes pyoverdines, produites par différentes souches de *Pseudomonas* fluorescents, dans l'altération de déchets de flocage. Après incubation des déchets avec différentes solutions de pyoverdines, l'altération a été suivie par le dosage du fer dissous dans le surnageant. Après avoir sélectionné la pyoverdine la plus efficace, nous devions optimiser les paramètres d'extraction et déterminer le rendement d'extraction du fer mais également du magnésium. Pour cela, nous avons effectué une cinétique d'altération afin de déterminer la durée optimale d'extraction des éléments présents dans les fibres d'amiante puis nous avons effectué différents cycles d'extraction afin de déterminer la limite d'extraction des pyoverdines. Afin d'optimiser cette voie, l'impact de la concentration en pyoverdine sur l'altération des déchets de flocage a été étudié.

Les déchets amiantés peuvent constituer une source d'éléments nutritifs compte tenu qu'ils contiennent du fer et du magnésium, le second objectif était donc de sélectionner une souche d'intérêt pouvant altérer efficacement les déchets amiantés. Des tests de dépendance en magnésium de différentes souches de *Pseudomonas* ont donc dans un premier temps été effectués, afin de sélectionner la souche la plus dépendante vis à vis du magnésium. L'altération de déchets de flocage en présence des bactéries sélectionnées a ensuite été étudiée, en condition de carence en fer et en magnésium. La limite d'extraction de la voie bactérienne par des cycles de croissance en présence de déchets de flocage a ainsi été évaluée.

Le dernier objectif était d'étudier l'implication de la pyoverdine et de la pyochéline produits par *P. aeruginosa*, dans l'interaction avec les déchets amiantés. L'induction de ces deux voies sidérophores en présence de déchets de flocage a été suivie grâce à des souches de *P. aeruginosa* marquées par des étiquettes mCherry sur des protéines de biosynthèse des deux sidérophores. Afin de déterminer l'implication de chaque sidérophore dans les mécanismes d'altération, des expériences ont été menées en présence de mutants incapables de produire soit la pyoverdine, soit la pyochéline, soit les deux types de sidérophores et ceci en présence de déchets de flocage.

### II. <u>Contribution des auteurs</u>

Dans l'article 2 présentés ici, ma contribution a été la réalisation des expériences et l'interprétation des résultats. V. Geoffroy a réalisé les expériences de comparaison d'efficacité avec les pyoverdines produites par *P. lini* A225, *P. putida* 12633, *P. monteilii* Lille 1 et *P. syringae* ATCC 19310 pour les déchets de chrysotile gypse et les pyoverdines produites par *P. lini* A225, *P. putida* 12633, *P. monteilii* Lille 1, *P. syringae* ATCC 19310, *P. fluorescens* 13525 et *P. mosselii* Lille 17 pour les déchets d'amosite gypse. D. Ihiawakrim a effectué les analyses en microscopie électronique à transmission sur les échantillons traités.

Concernant l'article 3, J'ai effectué la cinétique d'altération des déchets de chrysotile gypse en présence de *P. aeruginosa* PAO1, le suivi de croissance de *P. aeruginosa* avec différentes concentrations de magnésium et l'étude de l'implication de chaque sidérophore dans les mécanismes d'altération via l'utilisation des mutants pyoverdine, pyochéline ou des deux sidérophores. V. Geoffroy a réalisé les cycles de renouvellement de *P. aeruginosa* PAO1 en présence de chrysotile gypse. S. Fritsch a étudié l'expression de la pyoverdine et de la pyochéline en présence d'amiante en utilisant des souches de *P. aeruginosa* marquées par des étiquettes mCherry sur des protéines de biosynthèse des deux sidérophores. A. Forster a construit la souche présentant une étiquette mCherry sur la protéine de biosynthèse de la pyoverdine. D. Ihiawakrim a effectué les analyses microscopiques en microscopie électronique à transmission sur les échantillons traités.

R. Regis de la société méditerranéenne des zéolithes a fourni les échantillons d'amiante utilisés dans les deux articles.

#### III. <u>Résultats complémentaires (non publiés)</u>

#### 1. <u>Composition des déchets de chrysotile gypse</u>

Afin de connaître la composition en fer et en magnésium du chrysotile gypse, ces déchets de flocage ont été minéralisés en utilisant de l'acide nitrique à 4 mol/L. Après 7 jours de contact à température ambiante, le dosage des éléments dissous a ensuite été effectué. Les échantillons contiennent 5 mg de fer et 74 mg de magnésium par gramme de déchet.

## 2. Etude de l'altération de déchets de chrysotile-gypse par les pyoverdines

#### a. Altération sur le long terme par les pyoverdines

Cette expérience a été décrite dans l'article 2, cependant seuls les résultats obtenus pour l'extraction du fer ont été soumis à publication. Afin d'étudier la capacité des pyoverdines à altérer les déchets de flocage sur le long terme, nous avons suivi l'extraction du fer et du magnésium des déchets de chrysotile-gypse après des cycles de 24 et 96 heures en présence de surnageants de culture de *Pseudomonas mandelii* SB8.3 ou *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, contenant 100 µM (T24-1 à 9 et T96-1 à 7) ou 200 µM (T24-C et T96-C) de pyoverdines.

Les résultats, présentés dans l'article 2, ont montré la capacité des pyoverdines à solubiliser du fer des déchets avec une efficacité équivalente entre les pyoverdines produites par *P. mandelii* et *P. aeruginosa* (Figure 3 de l'article 2). Concernant l'extraction de magnésium, les résultats obtenus montrent dans un premier temps que lors des cycles de 24 h avec une concentration en pyoverdine de 100  $\mu$ M, une importante quantité de magnésium est extrait par les surnageants de culture de *P. mandelii* SB8.3 et *P. aeruginosa* PAO1 mais également par le milieu d'incubation succinate (Figure 34). Cette extraction tend à diminuer au cours des cycles, avec une réaugmentation à T24-9 dû a une période de pause entre T24-8 et T24-9 plus longue (1 semaine) comparé aux autres cycles, dont la durée ne dépassait pas 72 h. Pour les cycles de 96 h avec une concentration en pyoverdine de 100  $\mu$ M, l'extraction augmente à T96-1 puis tend à diminuer et se stabiliser au cours des cycles. Durant les derniers cycles de 24 et 96 h, en présence d'une concentration de pyoverdine de 200  $\mu$ M, aucune extraction de magnésium est observée pour les surnageants de *P. mandelii SB8.3* et *P. aeruginosa PAO1*, tandis qu'une extraction de magnésium est constatée à T96-C pour le milieu succinate.



<u>Figure 34</u> : Extraction de magnésium de déchets de chrysotile-gypse après des cycles de 24 et 96 heures en présence de surnageants de culture de *Pseudomonas mandelii* SB8.3 ou *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, contenant 100  $\mu$ M (T24-1 à 9 et T96-1 à 7) ou 200  $\mu$ M (T24-C et T96-C) de pyoverdine. CHR-GY : chrysotile-gypse ; surn : surnageant. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 5 réplicats.

D'après les résultats obtenus, les pyoverdines ne sembleraient pas avoir d'effet sur l'extraction du magnésium présent dans les déchets de chrysotile-gypse. Etant donné que le pH de nos solutions se trouve entre 7 et 8, la dissolution du magnésium observée lors de cette expérience pourrait être dû au pH (**Annexe 1**). En effet, l'influence du pH sur la dissolution des fibres de chrysotile est bien connue. La couche de brucite, composé principalement de magnésium, se dissous rapidement à pH acide. A pH neutre, les fibres sont également capables de se dégrader mais avec une cinétique de dissolution plus lente. La libération du magnésium de fibres de chrysotile dans de l'eau à pH 7 a par exemple été décrite (Choi and Smith, 1972; Gronow, 1987).

### b. Effet de la concentration en pyoverdine sur l'altération du chrysotilegypse

Les résultats concernant l'effet de la concentration en pyoverdine produite par *P. mandelii* SB8.3 sur l'altération des déchets de chrysotile-gypse on été présentés dans l'article 2 (**Figure 5 de l'article 2**). Les résultats ont montré que l'extraction de fer des fibres de chrysotile était dépendante de la concentration en pyoverdine, tandis que l'extraction du magnésium était

identique quelque soit les concentrations testées. Etant donné que toutes nos solutions étaient ajustées à pH 7, la dissolution du magnésium pouvait être due au pH.

L'influence du pH et l'effet de la concentration en pyoverdine sur l'extraction du magnésium de déchets de chrysotile-gypse ont donc été suivis par des cycles d'altération de 24, 48, et 96 h, en présence de différentes concentrations de pyoverdine produite par P. mandelii SB8.3 (25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM et 200 µM) (Figure 35). Contrairement à l'expérience décrite dans l'article 2, le pH des solutions utilisées n'a pas été ajusté. Le suivi de la concentration en fer et magnésium a été effectué dans les solutions de pyoverdine (Figure 35 A). Les résultats obtenus ont confirmé l'impact de la concentration en pyoverdine sur l'extraction du fer. Puisqu'après 24 h d'incubation, une extraction croissante de fer est obtenu en présence de 25 µM de pyoverdine (0,4 mg/L) jusqu'à 100-150 µM (0,9 mg/L), tandis qu'une extraction plus faible est observée à 200 µM (0,6 mg/L). Après 48 h d'incubation, le gradient d'altération est bien plus marqué avec une extraction de fer croissante de 25 µM (0,4 mg/L) à 200 µM (1,2 mg/L). Un gradient d'altération dépendant de la concentration en pyoverdine est également observé après 96 h d'incubation, allant de 0,3 mg/L à 0,9 mg/L. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans l'article 2 et confirment ainsi que l'extraction de fer des fibres de chrysotile est dépendante de la concentration en pyoverdine, avec une limite atteinte entre 150 et 200 µM. Si nous nous intéressons maintenant au dosage du magnésium, nous remarquons qu'il y a également une altération mais qui décroit de 25 µM à 200 µM (Figure 35 B). En effet, plus la concentration en pyoverdine est élevée et moins l'extraction de magnésium est importante. Après 24 h d'incubation, nous avons une extraction allant de 17 mg/L pour le milieu succinate à 3-4 mg/L avec 150 et 200 µM de pyoverdine. À partir du cycle de 48 h, deux groupes se distinguent, avec d'un côté les concentrations en pyoverdine de 100, 150 et 200 µM qui ont extrait de 0 à 4 mg/L de magnésium. Et de l'autre côté, nous avons les concentrations de 25 et 50 µM et le milieu succinate, pour lesquels nous observons une extraction allant de 11 à 13 mg/L. Ces deux groupes sont également observés après le cycle de 96 h. Ces résultats confirment l'absence de dissolution du magnésium par les pyoverdines. Le pH des solutions présente un gradient croissant dépendant de la concentration en pyoverdine (Annexe 2). Le milieu succinate possède le pH le plus bas (pH 7) tandis que le pH des surnageants de culture augmente avec la concentration en pyoverdine (allant de pH 7,2 à 8,7). Si nous comparons le pH avec l'extraction de magnésium, nous remarquons que la dissolution du magnésium augmente avec la diminution du pH. Nous confirmons donc ici l'influence du pH sur la dissolution du magnésium des fibres de chrysotiles.



Figure 35 : Effet de différentes concentrations en pyoverdine produite par *Pseudomonas* mandelii SB8.3 sur la dissolution du fer (A) et du magnésium (B) de déchets de chrysotile-gypse après 24, 48 et 96 heures de contact. Le pH n'a pas été ajusté. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 5 réplicats.

3. <u>Altération des déchets de chrysotile-gypse par les battéries du genre</u> <u>Pseudomonats</u> a. <u>Dépendance des Pseudomonas au magnésium</u>

Une quantité de magénsium de 200 me est généralement me ditionnée au milieu minimum succinate, permettant ainsi d'obtenir une culture carencée en fer. Cependant, aucune donnée relative à la quantité minimale requise afin d'obtenir une croissance n'est connue. Afin de pouvoir sélectionner une souche d'intérêt pouvant altérer efficacement l'amiante, nous avons tout d'abord étudié la dépendance de différentes espèces de *Pseudomonas* vis à vis du magnésium. Des cinétiques de croissance en milieu succinate additionné de différentes concentration en Mg (allant de 0 à 2 mg/L) ont été menées avec les souches suivantes : 1) *Pseudomonas mandelii* SB8.3 2) *Pseudomonas fluorescens* 13525 3) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 4) *Pseudomonas fluorescens* CHA0 5) *Pseudomonas mosselii* Lille 17 6) *Pseudomonas putida* 12633. Les courbes de croissance des différentes bactéries ont montré qu'une baisse de croissance est observée entre 0,2 et 0,5 mg/L de Mg (**Figue 36**). Cette baisse est plus ou moins marquée en fonction des espèces, notamment pour *P. mosselii* Lille 17 dont la croissance baisse légèrement à 0,2 mg/L comparé aux autres souches.



**Figure 36** : Cinétique de croissance de différentes espèces de *Pseudomonas* dans du milieu succinate, contenant différentes concentrations en Mg allant de 0 à 2 mg/L. A : *Pseudomonas mosselii* Lille 17 ; B : *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ; C : *Pseudomonas putida* 12633 ; D : *Pseudomonas fluorescens* CHA0 ; E : *Pseudomonas fluorescens* 13525 ; F : *Pseudomonas mandelii* SB8.3.



Afin de comparer les souches, le calcul du pourcentage de perte de croissance entre 2 et 0,2 mg/L de Mg a été calculé après 35,5 h (**Tableau 5**). Nous constatons que la souche la moins impactée par la concentration en magnésium est *P. mosselii* Lille 17 (13%), tandis que la souche avec le plus grand pourcentage de perte de croissance est *P. mandelii* SB8.3 (66%). Ces résultats montrent qu'en plus de produire une pyoverdine d'intérêt pour l'altération de l'amiante (**article 2**), *P. mandelii* SB8.3 pourrait être un bon candidat pour extraire efficacement le magnésium du chrysotile-gypse.

	Perte de croissance (%)
P. mosselii Lille 17	13,30
P. aeruginosa PAO1	25,65
P. putida 12633	36,88
P. fluorescens CHA0	46,36
P. fluorescens 13525	53,62
P. mandelii SB8.3	66,21

<u>Tableau 5</u> : Pourcentage de perte de croissance entre 2 et 0,2 mg/L de Mg dans du milieu succinate de différentes espèces de *Pseudomonas* après 35,5 h de culture.

### b. <u>Cinétique d'altération du chrysotile-gypse en présence de *Pseudomonas* <u>mandelii SB8.3</u></u>

Après avoir mis en avant la dépendance au magnésium de *P. mandelii* SB8.3, nous avons étudié la capacité de cette bactérie à altérer le chrysotile-gypse. L'intérêt de cette étude était également de comparer l'efficacité d'altération de *P. aeruginosa* PAO1 (**article 3**) avec *P. mandelii* SB8.3. Pour cela, nous avons mis en contact *P. mandelii* SB8.3 avec du chrysotile-gypse et nous avons suivi différents paramètres i) la croissance bactérienne ii) la production de pyoverdine iii) l'extraction de fer et de magnésium. Dans le but de mettre en avant la capacité de *P. mandelii* SB8.3 à puiser dans le chrysotile-gypse les éléments nécessaires à sa croissance, nous avons cultivé cette bactérie dans un milieu pauvre en fer, le milieu succinate (Succ), dépourvu de magnésium (Succ-Mg). Etant donné la capacité du milieu succinate à altérer le chrysotile-gypse, les échantillons de flocage utilisés pour cette expérience ont été prétraités via huit cycles d'altération de 24 h avec du milieu succinate stérile sans magnésium (**Annexe 3**).

Les résultats de la croissance après 24 h de culture montrent que *P. mandelii* SB8.3 se développe peu dans un milieu carencé en fer et en magnésium (Succ-Mg) sans ajout de chrysotile-gypse (passant de 4,2.10<sup>4</sup> à 2,2.10<sup>5</sup> UFC/mL), tandis qu'en présence de magnésium (Succ) ou d'amiante la croissance est fortement stimulée (passant de 4,2.10<sup>4</sup> à 6,4-6,6.10<sup>8</sup> UFC/mL) (**Figue 37**). Ces résultats montrent la capacité de *P. mandelii* SB8.3 à puiser le magnésium présent dans les déchets de chrysotile-gypse pour son développement. Néanmoins, la cinétique de croissance de *P. mandelii* SB8.3 en présence d'amiante, présente une légère diminution de la croissance de 0 à 8 h, passant de 4,2.10<sup>4</sup> à 1.10<sup>4</sup> UFC/mL, puis une augmentation jusqu'à 24 h. Cette diminution de croissance, également obtenue avec *P. aeruginosa* PAO1 (**Figure 1 article 3**), pourrait être dû à une adsorption des bactéries sur le mâtériau. La capacité des bactéries à coloniser certains matériaux comme, par exemple les mâchefers, a déjà été mise en évidence (Aouad *et al.*, 2008).



Figure 37 : Suivi de la croissance de *Pseudomonas mandelii* SB8.3 durant 24 heures dans un milieu succinate avec (Succ) ou sans magnésium (Succ-Mg) en présence ou non de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY). Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 à 5 réplicats.

Parallélement, la production de la pyoverdine a également été mesurée après 24 h de culture (**Figue 38**). Les résultats montrent qu'en milieu Succ-Mg dépourvu de chrysotilegypse, la production de pyoverdine est très faible (1  $\mu$ M) tandis qu'en présence d'amiante la production est plus élevé (22  $\mu$ M). Cette production n'est pas significativement plus faible qu'en conditions optimales de production de pyoverdine, dans le milieu Succ (31  $\mu$ M). La présence de déchets de flocage tend cependant à réprimer la production de pyoverdine, probablement liée à l'extraction de fer présent dans le chrysotile-gypse par *P. mandelii* SB8.3. Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenu avec *P. aeruginosa* PAO1 (**Figure 1 article 3**), une répression de la production de pyoverdine en présence de chrysotile-gypse est également observée mais celle-ci est beaucoup plus marquée qu'avec *P. mandelii* SB8.3. Ceci est lié au fait que *P. aeruginosa* PAO1 a produit plus de pyoverdine en condition de carence en fer et en présence de magnésium. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'altération de smectite par *P. aeruginosa* PAO1. En effet, en présence d'une forte quantité de smectite la production de pyoverdine a été inhibée, ce qui pourrait être lié au fer solubilisé (Ferret *et al.*, 2014).



<u>Figure 38</u> : Suivi de la concentration en pyoverdine après 24 heures de croissance de *Pseudomonas mandelii* SB8.3 dans un milieu succinate avec (Succ) ou sans magnésium (Succ-Mg) en présence ou non de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY). Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 à 5 réplicats. Les barres avec une lettre différente sont significativement différentes à p = 0,05 (test de Kruskal-Wallis).

La cinétique d'extraction du fer des déchets de chrysotile-gypse durant 24 h de culture avec *P. mandelii* SB8.3 montre que le milieu succinate sans magnésium dissout une faible quantité de fer en 24 h (0,03 à 0,06 mg/L). En présence de *P. mandelii* SB8.3, nous observons une augmentation de 0 à 2 h (0,06 à 0,08 mg/L) puis une diminution de 2 à 24 h (0,08 à 0,02 mg/L) de la concentration en fer dans le surnageant (**Figure 39 A**). Cette diminution pourrait être liée à une précipitation du fer dans le milieu de culture ou à une accumulation de cet

élément dans les bactéries. Afin de mesurer le fer total extrait, nous avons également dosé le fer présent dans le culot bactérien. Les résultats montrent qu'une plus grande quantité de fer est retrouvée dans les bactéries (0,115 mg/L) comparée au surnageant (0,025 mg/L) (Figure **39** B). P. aeruginosa PAO1 et P. mandelii SB8.3 ont extrait respectivement 0,27 et 0,14 mg/L de fer, quantité nettement supérieure à celle mesurée en présence du milieu succinate sans magnésium (0,06 mg/L) (Figure 1 Article 3). Ces concentrations restent cependant très faibles comparé aux concentrations mesurées en présence du surnageant de culture contenant la pyoverdine de P. mandelii SB8.3 (environ 1 mg/L). Concernant la cinétique d'extraction du magnésium en présence ou non de P. mandelii SB8.3, les résultats montrent une augmentation de la dissolution du magnésium de 0 à 24 h, allant de 0,3 à 1,5 mg/L sans bactéries et de 1 à 1,7 mg/L en présence de bactéries (Figure 39 C). La présence de magnésium dans les culots bactériens est inférieure à la limite de détection. La présence de P. mandelii SB8.3 n'a donc pas eu d'influence sur la dissolution du magnésium. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec P. aeruginosa PAO1 (article 3). Etant donné que les besoins en magnésium de P. mandelii SB8.3 (entre 0,2 et 0,5 mg/L de magnésium) sont faibles (Figure 36), la libération du magnésium des déchets de flocage par le milieu succinate a donc pu être suffisante pour permettre la croissance optimale de cette bactérie.



Figure 39 : Extraction de fer (A et B) et de magnésium (C) de déchets de chrysotilegypse durant 24 heures dans un milieu succinate sans magnésium en absence (Succ-Mg) ou en présence de *Pseudomonas mandelii* SB8.3 (SB8.3). Cinétique d'extraction du fer (A) et du magnésium (C) dans le surnageant de culture. Concentration en fer retrouvée dans les bactéries (culot) et dans le surnageant (B). CHR-GY : chrysotile-gypse. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 5 réplicats Les barres avec une lettre différente sont significativement différentes à p = 0,05 (test de Student).

#### c. <u>Comparaison de l'altération du milieu succinate et casaminoacides sur des</u> déchets de flocage

Lors des expériences précédentes, une altération du chrysotile-gypse par dissolution du magnésium a été observée en présence de milieu succinate. Nous avons donc comparé la capacité d'altération de deux milieux fréquemment utilisés pour carencer les bactéries en fer, succinate et casaminoacides (CAA), sans magnésium. Cette expérience permettra de sélectionner quel milieu pourra être utilisé par la suite, afin d'étudier l'impact réel des

bactéries et notamment de *P. mandelii* SB8.3 sur l'altération des déchets de flocage. Quatre cycles d'altération, avec renouvellement du milieu de culture, ont donc été effectués. La concentration en fer et en magnésium libérée au cours des cycles a été suivie.

Les résultats ont dans un premier temps montrés que quelque soit le milieu de culture utilisé, une très faible quantité de fer est libérée (**Annexe 4**). Ces milieux de culture n'ont donc que très peu d'influence sur la dissolution du fer des déchets de chrysotile-gypse. Concernant le magnésium, une forte altération de l'amiante est observée en présence de milieu succinate, effet diminuant au cours des cycles, passant de 11,5 mg/L pour T24-1 à 2,4 pour T24-4 (**Figure 40**). Le milieu CAA présente quant à lui une altération beaucoup plus faible et plus stable au cours des cycles, passant de 1,2 mg/L pour T24-1 à 2 mg/L pour T24-4. Ces résultats peuvent être expliquées par la différence de pH des deux milieux, le milieu succinate est en effet plus acide (pH 7,1) que le milieu CAA (pH 7,4) (**Annexe 5**).



Figure 40 : Dissolution de magnésium de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY) après quatre cycles d'incubation de 24 heures en présence de milieu casaminoacides et succinate dépourvu de magnésium. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

### d. <u>Altération sur le long terme de déchets de chrysotile-gypse par</u> <u>Pseudomonas mandelii SB8.3</u>

La recherche d'une souche d'intérêt en vue d'un procédé de bioremédiation permettant de traiter les déchets de chrysotile-gypse a montré que *P. mandelii* SB8.3 était capable d'altérer

les déchets de flocage avec une efficacité proche de *P. aeruginosa* PAO1. Etant donné que *P. aeruginosa* PAO1 est un pathogène opportuniste de l'homme, l'utilisation d'une souche environnementale, tel que *P. mandelii* SB8.3, sera plus approprié en vue d'un transfert vers une échelle industrielle. Ainsi, l'altération des déchets de chrysotile-gypse par *P. mandelii* SB8.3 sur le long terme a été effectuée par dix cycles de renouvellement de 24 h. Différents paramètres ont été suivis : i) la croissance bactérienne ii) la production de pyoverdine iii) l'extraction de fer et de magnésium. Les résultats précédents nous ont montrés que le milieu CAA altérait peu le chrysotile-gypse, ce milieu a donc été utilisé pour l'expérience d'altération par *P. mandelii* SB8.3. Afin d'étudier la capacité de *P. mandelii* SB8.3 à puiser dans le chrysotile-gypse les éléments nécessaires à sa croissance lors des différents cycles, cette bactérie a été cultivée dans du milieu CAA dépourvu de magnésium.

Après les différents cycles de 24 h, les résultats montrent une différence de croissance de *P. mandelii* SB8.3 selon les conditions de culture (**Figue 41**). En effet, la croissance la plus élevée est observée dans le milieu CAA sans magnésium (CAA-Mg) dans lequel du chrysotile-gypse a été ajouté (allant de  $5,5.10^7$  à  $4,5.10^8$  UFC/mL selon les cycles), suivi par le milieu CAA sans amiante mais contenant du magnésium (CAA) (allant de  $4,4.10^6$  à  $4.10^7$  UFC/mL selon les cycles). La croissance la plus faible est obtenue dans le milieu CAA-Mg (allant de  $1,3.10^6$  à  $6,9.10^6$  UFC/mL selon les cycles). La présence de chrysotile-gypse a donc stimulé la croissance de *P. mandelii* SB8.3, montrant la capacité de cette bactérie à utiliser le magnésium mais également le fer de ce déchet pour son développement, car la croissance en présence de chrysotile-gypse était supérieure comparé celle obtenue dans un milieu CAA sans amiante. De façon intéressante, après 10 cycles de culture en présence de déchet de flocage, la croissance est toujours importante. *P. mandelii* SB8.3 n'a donc pas atteint de limite d'altération du chrysotile-gypse et peut donc continuer à puiser le fer et le magnésium présent dans celui-ci.



Figure 41 : Suivi de la croissance de *Pseudomonas mandelii* SB8.3 après 10 cycles de 24 heures dans un milieu casaminoacides avec (CAA) ou sans magnésium (CAA-Mg) en présence ou non de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY). Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

La Figure 42 représente la production de pyoverdine mesurée à la fin de chaque cycle de renouvellement de 24 h. Après le premier cycle, la production de pyoverdine est importante dans le milieu CAA (73  $\mu$ M) tandis qu'en absence de magnésium (CAA-Mg) une plus faible quantité de pyoverdine a été produite (44  $\mu$ M). L'addition de chrysotile-gypse, dans le milieu CAA-Mg, a réprimé la production de pyoverdine atteignant 26  $\mu$ M. Lors des cycles suivants, cette différence de production de pyoverdine en milieu CAA s'est accentuée, augmentant jusqu'à 160  $\mu$ M au cycle 10. Tandis que la production a diminué dans le milieu CAA-Mg sans (22  $\mu$ M) ou avec amiante (5  $\mu$ M). La répression de la production de pyoverdine en présence de chrysotile-gypse a déjà été observée précédemment (Figure 38) et pourrait également être liée à l'extraction de fer de l'amiante par *P. mandelii* SB8.3. Après 10 cycles de croissance, la production de pyoverdine continue à être réprimée en présence d'amiante, lié probablement à une solubilisation de fer qui reste importante. Ces résultats confirment à nouveau que la limite d'altération du chrysotile-gypse par *P. mandelii* SB8.3 n'est pas encore atteinte.



**Figure 42** : Suivi de la concentration en pyoverdine après 10 cycles de 24 heures de croissance de *Pseudomonas mandelii* SB8.3 dans un milieu casaminoacides avec (CAA) ou sans magnésium (CAA-Mg) en présence ou non de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY). Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

Les quantités de fer et de magnésium extraites ont été mesurées lors des différents cycles d'altération du chrysotile-gypse en présence ou non de *P. mandelii* SB8.3 (Figure 43). Afin de mesurer la dissolution totale des éléments, nous avons dosé le fer et le magnésium présents dans les culots bactériens et les surnageants. Les résultats d'extraction du fer montrent qu'en absence de P. mandelii SB8.3, le milieu CAA-Mg libère une faible quantité de fer variant de 0,02 à 0,08 mg/L. En présence de P. mandelii SB8.3, l'extraction de fer varie selon les cycles avec des phases d'augmentation et de diminution allant de 0,12 mg/L à 0,4 mg/L entre le cycle 1 et 6. Durant les derniers cycles, une stabilisation est atteinte (0,17 à 0,2 mg/L). Concernant le magnésium, une absence d'extraction est observée pour la plupart des cycles en milieu CAA-Mg, excepté pour le cycle 1 (0,88 mg/L) et 4 (0,36 mg/L). En présence de P. mandelii SB8.3, l'extraction varie selon les cycles avec également des phases d'augmentation et de diminution allant de 0,29 à 4,50 mg/L entre les cycles 1 à 10. Une étude a montré que le temps nécessaire pour atteindre un équilibre de dissolution du fer des fibres de chrysotile, augmentait avec la concentration en desferrioxamine, un sidérophore bactérien produit par Streptomyces pilosus et que ce phénomène pouvait être lié à la façon dont le fer est lié à la fibre (Mohanty et al., 2018). Ainsi le fer présent sur la surface des fibres serait plus rapide à extraire comparé au fer présent dans la couche de brucite et de silice. Concernant nos

résultats, la variation de dissolution observée selon les cycles pour le fer et le magnésium, pourrait être ainsi liée aux sites d'extraction de ces éléments (surface du déchet, couche de brucite et couche de silice) présent dans le chrysotile-gypse.



<u>Figure 43</u> : Suivi de l'extraction de fer (A) et de magnésium (B) de déchets de chrysotilegypse après 10 cycles de 24 heures dans un milieu casaminoacides sans magnésium en absence (CAA-Mg) ou en présence de *Pseudomonas mandelii* SB8.3 (SB8.3). La concentration des éléments a été mesurée dans les bactéries (culot) et dans le surnageant. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

### IV. <u>Bilan d'altération des déchets de flocage par les *Pseudomonas* et les pyoverdines</u>

L'étude de l'altération des déchets de flocage, composés notamment de chrysotile et de gypse, nous a permis de mettre en avant la capacité de dégradation des pyoverdines et des *Pseudomonas*. Nous avons également pu comprendre de façon plus approfondie les mécanismes impliqués dans l'altération des amiantes et ainsi optimiser certains paramètres afin d'améliorer l'efficacité de ces voies.

Après avoir testé différentes pyoverdines produites par diverses souches sur l'altération du chrysotile-gypse, nous avons mis en avant une différence d'efficacité de ces pyoverdines pour extraire le fer des déchets de flocage. En effet, la pyoverdine produite par *P. mandelii* SB8.3 a extrait une quantité plus importante de fer du chrysotile-gypse, comparé aux autres pyoverdines testées. La capacité de cette pyoverdine d'intérêt à altérer l'amiante a donc ensuite été testée à long terme sur des déchets de chrysotile-gypse, afin de déterminer la limite d'extraction ainsi que le rendement d'altération. Pour obtenir le pourcentage d'extraction de la pyoverdine produite par *P. mandelii* SB8.3, les déchets de chrysotile-gypse ont été minéralisés afin de déterminer les quantités de fer et de magnésium présentes. Après différents cycles d'altération de 24 et 96 h en présence de pyoverdines, nous avons obtenu au total 12 % de fer et 9 % de magnésium extrait du chrysotile-gypse (**Figure 44**). Il est important de noter que le magnésium extrait était principalement dû à l'action du milieu de culture et qu'à la fin des cycles d'altération, la limite d'extraction du fer a été atteinte.



<u>Figure 44</u> : Pourcentage de fer (A) et de magnésium (B) extrait dans des déchets de chrysotile-gypse, après des cycles de 24 et 96 heures en présence de surnageants de culture de *Pseudomonas mandelii* SB8.3.

L'étude des différents paramètres régissant la dégradation par les pyoverdines nous a permis d'optimiser cette voie d'altération des déchets de chrysotile-gypse. Ainsi, nous avons pu mettre en avant que la durée optimale d'extraction du fer par les pyoverdines était de 24 h lors des premiers cycles d'altération. Cette durée tend à changer au cours des cycles, liée probablement à un changement de site d'extraction du fer (brucite et silice) qui demande un temps de contact plus long. Nous avons également pu mettre en avant l'impact de la concentration en pyoverdine sur l'extraction du fer des déchets de chrysotile-gypse, avec une dissolution qui augmentait avec la quantité de pyoverdine pour atteindre une limite entre 150 et 200  $\mu$ M. En sachant que *P. mandelii* SB8.3 produit 180  $\mu$ M de pyoverdine lors d'une culture carencée en fer, aucune addition de pyoverdine purifiée n'est nécessaire pour altérer de façon optimale le chrysotile-gypse en utilisant les pyoverdines. Le pH a également été mis en avant dans l'altération du chrysotile-gypse et notamment dans la dissolution du magnésium. En effet, l'impact d'un pH acide sur la dissolution de la couche de brucite du chrysotile est bien connu. La dissolution du magnésium, observé lors des différentes expériences, était donc liée en grande partie à l'acidité du milieu.

Afin de sélectionner une bactérie d'intérêt capable d'altérer le chrysotile-gypse, en puisant dans ce matériau les éléments nécessaires à son développement, nous avons dans un premier temps étudié la dépendance en magnésium de différentes souches de *Pseudomonas*. Une différence de dépendance entre les souches a été observée et nous avons pu montré que *P. mandelii* SB8.3 était la plus dépendante en magnésium. *P. mandelii* SB8.3 a été capable de se développer en présence de chrysotile-gypse, en puisant le fer et le magnésium de ce déchet. Comme précédemment, nous avons déterminé le pourcentage d'extraction de fer et de magnésium après altération du chrysotile-gypse par *P. mandelii* SB8.3. Nous avons obtenu après 10 cycles de 24 h, une extraction totale de 5 % de fer et 2 % de magnésium (**Figure 45**). Les quantités extraites sont faibles, cependant la limite d'extraction n'a pas été atteinte. Ce faible rendement d'altération est probablement dû aux besoins faibles des bactéries en fer (10<sup>-6</sup> M = 56 µg/L) (Braun and Killmann, 1999) et en magnésium (entre 0,2 et 0,5 mg/L de magnésium) (**Figure 36**).



<u>Figure 45</u>: Pourcentage de fer (A) et de magnésium (B) extrait dans des déchets de chrysotile-gypse, après 10 cycles de 24 heures en présence de *Pseudomonas mandelii* SB8.3.

L'étude des mécanismes impliqués dans l'altération du chrysotile-gypse en utilisant *P. aeruginosa*, a permis de mettre en avant l'importance des sidérophores dans la dissolution du fer mais pas du magnésium des déchets de chrysotile-gypse. Nous avons montré que les voies de biosynthèse des sidérophores produits par *P. aeruginosa*, la pyoverdine et la pyochéline, étaient induites en présence d'amiante et que l'absence de production de ces sidérophores avait un impact sur la dissolution du fer. Cependant, d'autres mécanismes sont probablement impliqués dans l'altération des amiantes, tels que la formation de biofilm, la production d'acides organiques ou l'action de réductases membranaires. En effet, l'absence de production des deux sidérophores n'empêche pas la stimulation de croissance liée à la présence du chrysotile-gypse dans un milieu carencé en fer et en magnésium (**Annexe 6**). Cette stimulation peut être due également à une altération des amiantes par le milieu CAA qui peut libérer de faibles quantités de magnésium.

Les variations d'extraction en fer et en magnésium du chrysotile gypse selon les cycles, le temps de contact, en présence de pyoverdine ou de *Pseudomonas* pourrait être lié aux sites d'extraction de ces éléments (site de surface, couche de brucite ou couche de silice), comme cela a été supposé dans une étude précédente (Mohanty *et al.*, 2018).

## **Chapitre 7**

## Altération de déchets de fibrociment

### I. Introduction

La dégradation biologique de déchets de fibrociment a été étudiée dans ce chapitre. L'amiante-ciment, en tant que matériau le plus répandu et très largement utilisé dans le bâtiment, constitu ainsi le principal déchet retrouvé lors de chantiers de désamiantage. Les fibrociments se composent d'environ 10 % de fibres d'amiantes, principalement composé de chrysotile, cependant des amphiboles peuvent également y être retrouvées. Ces matériaux sont généralement peu friables et ne libèrent donc que de très faibles quantités de fibres, excepté en cas de travaux ou de manipulation des déchets. Des déchets de tuile de toit en fibrociment ont été utilisés dans cette étude et nous ont été fournis par la société CEFASC Environnement (Mulhouse). La caractérisation de ces déchets nous a montré qu'ils étaient composés de chrysotile et d'une matrice cimentaire (carbonate de calcium et ettringite). Contrairement aux déchets de flocage, les échantillons de tuile de toit en fibrociment ont été broyés afin d'avoir une granulométrie homogène.

Le premier objectif a été de déterminer la capacité de chélation des pyoverdines à extraire le fer présent dans les fibres d'amiantes. L'efficacité d'altération du fibrociment par des pyoverdines produites par différentes souches de *Pseudomonas* fluorescents, a été dans un premier temps comparée. Pour cela, les déchets ont été incubés avec les solutions de pyoverdine et un suivi de l'altération par dosage du fer dans les surnageants a été effectué. Une cinétique d'extraction a donc été mesurée afin de déterminer la durée optimale d'extraction des pyoverdines et un dosage de fer en fin d'incubation a été effectué afin de comparer la quantité totale extraite par chaque pyoverdine et ainsi sélectionner les plus efficaces. Après sélection des pyoverdines d'intérêt, des cycles d'altération ont été réalisés afin de déterminer la limite d'extraction des pyoverdines les plus efficaces.

Le dernier objectif a été d'étudier les mécanismes d'altération biologique des déchets de fibrociment et l'implication des sidérophores dans ce processus. L'induction de la pyoverdine et de la pyochéline, produits par *P. aeruginosa*, en présence de déchets de fibrociment a donc été suivie grâce à des souches marquées par des étiquettes mCherry sur des protéines de biosynthèse des deux sidérophores. L'importance de chaque sidérophore dans les mécanismes d'altération des fibrociments a également été étudiée. Pour cela, des mutants de *P. aeruginosa* incapables de produire soit la pyoverdine, soit la pyochéline, soit les deux types de sidérophores ont ainsi été incubés en présence de déchets de fibrociment.

#### II. <u>Résultats</u>

#### 1. Composition des déchets de fibrociment

Afin de connaître la composition en fer et en magnésium des déchets de tuile de toit en fibrociment, des échantillons ont été minéralisés en utilisant de l'acide nitrique à 4 mol/L. Les échantillons contiennent 12 mg de fer et 36 mg de magnésium par gramme de déchet.

#### 2. Etude de l'altération de déchets de fibrociment par les pyoverdines

#### a. Efficacité des pyoverdines dans l'altération de tuile de toit en fibrociment

Dans le chapitre 6, nous avons montré que les pyoverdines de Pseudomonas étaient capables d'extraire le fer présent au sein de déchets de flocage avec des efficacités différentes selon les pyoverdines. Cependant, l'effet de ces composés sur des déchets de fibrociment n'était pas connu. Dix pyoverdines ont été sélectionnées selon leurs différents profils isoélectrophorétiques (pHi de la pyoverdine neutre, basique, acide, acide-neutre-basique), parmi une collection disponible au laboratoire (Tableau 3). Une cinétique de dissolution du fer en présence de chacune de ces pyoverdines (100 µM) a été mesurée durant 24 h (Figure 46). Les résultats obtenus montrent dans un premier temps que le milieu casaminoacides (CAA) n'a pas d'impact sur la solubilisation du fer des déchets de fibrociment, solubilisant 0,08 mg/L après 24 h d'incubation. De façon intéressante, les pyoverdines ne présentent pas le même potentiel d'extraction de fer des déchets de fibrociment. En effet, après 24 h d'incubation, les concentrations en fer extrait varient de 1,7 mg/L pour le surnageant de P. mandelii SB8.3 à 3 mg/L pour le surnageant de P. syringae ATCC 19310. La durée optimale d'extraction varie également selon les souches. On remarque qu'après 2 h de contact, les quantités de fer extraites varient de 0,9 mg/L pour la pyoverdine de P. mosselii Lille 17 à 2,6 mg/l pour la pyoverdine de P. syringae ATCC 19310. La quantité de fer dissous augmente ensuite progressivement pour tous les surnageants entre 2 et 12 h. A partir de 12 h, seul les surnageants de P. fluorescens CHA0, P. mosseli Lille 17, P. putida 90.51, P. aeruginosa PAO1 et P. syringae ATCC 19310 continuent à solubiliser du fer jusqu'à 24 h.



<u>Figure 46</u> : Cinétique d'extraction du fer de tuile de toit en fibrociment (Fibro) durant 24 h en présence de surnageants (surn) de culture de différentes souches de *Pseudomonas*, contenant 100  $\mu$ M de pyoverdine. CAA : casaminoacides. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 5 réplicats.

La limite d'extraction atteinte ici est probablement liée à l'accessibilité au fer, car seulement 50 % des sidérophores étaient sous forme de complexes pyoverdine-Fe, laissant une proportion d'apo-pyoverdine suffisante dans la solution pour complexer du fer. Etant donné que la concentration en pyoverdine n'est pas un facteur limitant, la durée optimale d'extraction des pyoverdines pour les déchets de fibrociment a été fixée à 24 h. D'autre part, il ne semble pas y avoir de corrélation entre l'efficacité de dissolution des pyoverdines et leur pHi. En effet, le surnageant de *P. aeruginosa* PAO1 a par exemple extrait une forte quantité de fer (2,6 mg/L) et *P. mandelii* SB8.3 une quantité plus faible (1,75 mg/L), alors que ces deux pyoverdines sont de type basique.

Après ce premier cycle de 24 h, l'altération des échantillons de tuile de toit en fibrociment a été poursuivie par un cycle de 48 h puis un cycle de 96 h en renouvellant la solution de pyoverdine à chaque cycle et un dosage du fer extrait a été effectué à la fin de chaque cycle (**Figure 47**). Les cycles de 48 et 96 h montrent tout d'abord que l'augmentation du temps de contact n'a pas permis d'extraire des quantités plus importantes de fer du fibrociment, excepté pour le surnageant de *P. aeruginosa* PAO1 dont la dissolution de fer a augmentée de 2,6 à 3,2 mg/L entre 24 h et 96 h. D'autre part, nous observons que l'extraction de fer s'est poursuivie lors des renouvellements et qu'après 3 cycles, la limite d'extraction n'a pas encore été
atteinte. Lors des renouvellements de 48 et 96 h, nous constatons également que l'extraction du fer pour les pyoverdines produites par *P. aeruginosa* PAO1 et *P. syringae* ATCC 19310 est resté élevée (entre 2,7 et 3,2 mg/L) tandis que les autres pyoverdines ont tendance à diminuer passant en moyenne de 2,2 mg/L après le premier cycle de 24 h à 1,5 mg/L après le dernier cycle de 96 h. Durant la cinétique et les renouvellements, les pyoverdines de *P. aeruginosa* PAO1 et *P. syringae* ATCC 19310 ont toujours été les plus efficaces.



**Figure 47** : Extraction du fer de tuile de toit en fibrociment (Fibro) en présence de surnageants (surn) de culture de différentes souches de *Pseudomonas*, contenant 100  $\mu$ M de pyoverdine, après 24, 48 et 96 h de contact. CAA : casaminoacides. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 5 réplicats.

Lors de l'altération des déchets de flocage par les mêmes pyoverdines utilisées pour l'altération des fibrociments, nous avions montré que les pyoverdines de *P. aeruginosa* PAO1 et *P. mandelii* SB8.3 étaient les plus efficaces dans la dissolution du fer, tandis que la pyoverdine de *P. syringae* ATCC 19310 présentait une dissolution très basse (**Figure 1 de l'article 2**). Ces différentes pyoverdines n'ont donc pas la même efficacité en fonction de la nature du déchet. La quantité de fer extraite est également différente. En effet, les concentrations obtenues pour les déchets de fibrociment étaient nettement supérieures (1,7 à 3 mg/L après 24 h d'incubation) comparé aux déchets de flocage (0,24 à 1,22 mg/L après 24 h d'incubation). Ces résultats pourraient être expliqués par une différence d'accessibilité au fer lié à la matrice gypse ou cimentaire des déchets. Cependant, en se basant sur ce paramètre, le chrysotile-gypse devrait permettre une extraction plus important que le fibrociment, étant

donné que ce déchet présente une matrice moins compacte et favorisant la libération des fibres. Or la dissolution la plus importante a été obtenue pour les fibrociments. Ainsi, cette différence d'extraction est probablement liée au broyage effectué uniquement sur les déchets de fibrociment. En effet, il a été montré dans la littérature que le broyage des amiantes déstabilisait la structure des amiantes (Spasiano and Pirozzi, 2017; Paolini *et al.*, 2019). De plus, le broyage permet également d'augmenter la surface d'échange entre les pyoverdines et les déchets de fibrociment, favorisant ainsi l'accessibilité et l'extraction du fer. D'autre part, la forte extraction de fer obtenue pour les déchets de fibrociment pourrait également s'expliquer par la quantité supérieure de fer retouvée dans ce déchet (12 mg/g de déchets) comparé aux déchets de flocage (5 mg/g de déchets),

Concernant le magnésium, les dosages réalisés au cours de la cinétique indiquent des valeurs négatives, entre -2,7 mg/L et -24,6 mg/L après 12 h (après soustraction des témoins), signifiant que le magnésium présent initialement dans le milieu CAA a probablement précipité sur le déchet (**Annexe 7**). Au cours des 3 renouvellements, les concentrations augmentent mais tout en restant négatives pour la majorité des essais. Ces résultats montrent donc que les pyoverdines n'ont pas d'effet sur l'extraction du magnésium présent dans les déchets de fibrociment.

#### b. Altération sur le long terme par les pyoverdines

Après avoir montré l'efficacité des pyoverdines produites par *P. aeruginosa* PAO1 et *P. syringae* ATCC 19310 à dissoudre le fer des déchets de fibrociment, nous voulions étudier la capacité de ces pyoverdines à extraire le fer sur le long terme et y avons inclu la pyoverdine produite par *P. mandelii* SB8.3, qui présentait la plus grande efficacité d'extraction du fer pour les déchets de flocage, afin de déterminer la limite d'extraction de ces pyoverdines. Vingt cycles de renouvellement (T24-1 à T24-20) avec les surnageants de culture de ces trois souches contenant 100 μM de pyoverdines ont donc été réalisés en présence de déchets de tuile de toit en fibrociment et un dosage du fer extrait a été effectué (**Figure 48**). Les résultats montrent tout d'abord que le milieu CAA dissout une faible quantité de fer (0 à 0,5 mg/L) comparé aux pyoverdines (0,8 à 3,37 mg/L). Au cours des cycles, une diminution de la quantité de fer dissous est observée quels que soient les surnageants, *P. aeruginosa* PAO1 (3,37 à 1,03 mg/L). *P. syringae* ATCC 19310 (3 à 1,02 mg/L) et *P. mandelii* SB8.3 (2,23 à 0,80 mg/L). Entre le cycle T24-1 et le cycle T24-6, la dissolution du fer était plus élevée pour le surnageant de *P. aeruginosa* PAO1 comparé aux autres surnageants. A partir du cycle T24-7, ce sont les surnageants de *P. syringae* ATCC 19310 et *P. aeruginosa* PAO1 qui

présentaient une extraction supérieur aux autres conditions. Finalement à partir du cycle T24-13, la dissolution était similaire pour tous les surnageants.



<u>Figure 48</u> : Extraction de fer de tuile de toit en fibrociment (Fibro) après des cycles de 24 h (T24-1 à T24-20) en présence de surnageants (surn) de culture de *Pseudomonas mandelii* SB8.3, *Pseudomonas syringae* ATCC 19310 et *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, contenant 100  $\mu$ M de pyoverdine. CAA : casaminoacides. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 5 réplicats.

Après 20 cycles d'extraction de fer de déchets de fibrociments en présence de surnageants de culture contenant de la pyoverdine, la limite d'extraction n'a pas pu être atteinte puisque du fer continu à être solubilisé durant le dernier cycle. Lors de l'expérience sur le long terme effectuée avec les pyoverdines sur des déchets de flocage, la limite d'extraction avait été atteinte en effectuant 9 cycles de 24 h et 7 cycles de 96 h (**Figure 3 Article 2**). En présence de fibrociment, cette limite n'est pas atteinte après 20 cycles de contact et une plus grande quantité de fer est extraite comparé aux déchets de flocage. Ceci peut également s'expliquer, comme précédemment, par le broyage des échantillons de fibrociment qui pourrait favoriser l'accessibilité et l'extraction du fer. Une autre explication serait la quantité de fer qui est deux fois plus importante dans les déchets de fibrociment.

Concernant l'effet des pyoverdines sur le magnésium, les résultats sont moins homogènes (Annexe 8). Les concentrations pour une même souche alternent entre des valeurs positives et négatives jusqu'au dernier cycle. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus précédemment et seraient probablement lié à la précipitation du magnésium présent dans le milieu CAA.

Ainsi ces résultats confirment que les pyoverdines n'ont pas d'effet sur l'extraction du magnésium présent dans les déchets de fibrociment.

## 3. <u>Altération des déchets de chrysotile-gypse par les bactéries du genre</u> <u>*Pseudomonas*</u>

#### a. Suivi de l'expression des voies sidérophores en présence de fibrociment

Afin d'étudier l'induction des voies sidérophores, pyoverdine et pyochéline, en présence de fibrociment, nous avons suivi l'expression de ces sidérophores en utilisant deux souches de P. aeruginosa marquées par des étiquettes mCherry sur des protéines de biosynthèse de la pyoverdine (PvdJ) et de la pyochéline (PchA). L'induction de ces voies a été testée dans différentes conditions: en milieu CAA permettant d'atteindre une expression optimale lié à la carence en fer, en milieu CAA sans magnésium (CAA-Mg) permettant d'atteindre une expression minimale lié à la carence en fer et en magnésium, ainsi qu'en milieu CAA sans magnésium additionné de déchets de tuile de toit en fibrociment (Figure 49). Les résultats montrent que la fluorescence des étiquettes mCherry est quasiment nulle pour les bactéries cultivées en milieu CAA-Mg compte tenu de la faible croissance, contrairement au témoin positif (CAA) où la croissance est satisfaisante et où l'on observe un niveau d'expression élevée. Concernant le milieu contenant du fibrociment, la fluorescence mCherry est beaucoup plus faible (20 pour PchA et 42 pour PvdJ) qu'en milieu CAA, mais plus élevée que le milieu CAA-Mg sans amiante (0 pour PchA et 1,25 pour PvdJ) malgrés la forte croissance de ces souches en présence de fibrociment (Annexe 9). Cette faible expression des voies sidérophore est probablement dû à une répression de la biosynthèse lié à l'acquisition du fer par P. aeruginosa PAO1. L'induction de ces voies était nettement supérieure en présence des déchets de flocage (Figure 4 Article 3), probablement dû à une accessibilité plus restreinte au fer. En effet, comme nous avons pu le voir précédemment l'extraction du fer est plus important en présence de fibrociment lié à un broyage des échantillons. Une répression plus importante des voies sidérophores en présence de déchets de fibrociment est donc en accord avec les résultats obtenus précédemment.



**Figure 49**: Expression de la protéine de biosynthèse de la pyochéline (PchA) et de la pyoverdine (PvdJ) par mesure de fluorescence d'étiquettes mCherry, après 40 h de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* dans un milieu casaminoacides avec (CAA) ou sans magnésium (CAA-Mg) en présence ou non de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY). Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats. Les barres avec une lettre différente sont significativement différentes à p = 0,05 (test de Kruskal-Wallis).

### b. <u>Implication de la pyoverdine et de la pyochéline dans l'altération du</u> <u>fibrociment</u>

Afin d'étudier l'influence de la pyoverdine et de la pyochéline sur l'altération des déchets de fibrociment, la souche sauvage de *P. aeruginosa* et des souches mutantes incapables de produire soit la pyoverdine, soit la pyochéline, soit les deux types de sidérophores ont été mises en contact avec des déchets de tuile de toit en fibrociment. L'altération des différentes souches a été étudiée via un suivi de la croissance, ainsi que d'un dosage des quantités de fer et de magnésium extraits. Les différentes souches ont ainsi été cultivées dans un milieu CAA sans magnésium (CAA-Mg) avec des déchets de fibrociment (**Figure 50 A et B**). Afin de mesurer la dissolution totale des éléments, nous avons en plus du surnageant, dosé le fer et le magnésium présents dans le culot bactérien. Concernant le fer, l'extraction la plus élevée est observée en présence de la souche sauvage (0,54 mg/L) (**Figure 50 A**). L'absence de pyoverdine ou de pyochéline provoque une diminution de l'extraction de fer (0,33 mg/L et 0,17 mg/L respectivement). La baisse de la dissolution est d'autant plus marquée en absence

de pyochéline. Le double mutant présente une quantité de fer (0,08 mg/L) proche de celle présente dans le témoin (0,13 mg/L). Concernant le magnésium, une extraction plus importante, mais non signifiactive, est observée en présence de la souche sauvage (3,6 mg/L) comparé au témoin et aux mutants (allant de 0,73 à 1,86 mg/L) (**Figure 50 B**).



Figure 50: Suivi de l'extraction de fer (A) et de magnésium (B) de déchets de fibrociment après 40 h d'incubation en présence de milieu casaminoacides sans magnésium (CAA-Mg) seul ou en présence de la souche sauvage de *Pseudomonas aeruginosa* (WT) ou de mutant incapable de produire la pyoverdine ( $\Delta$ PVD), la pyochéline ( $\Delta$ PCH) ou les deux sidérophores (2 $\Delta$ ). La concentration des éléments a été mesurée dans les bactéries (culot) et dans les surnageants. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats. Les barres avec une lettre différente sont significativement différentes à p = 0,05 (test de Kruskal-Wallis).

Les résultats montrent que ces deux sidérophores sont impliqués dans l'extraction du fer. La pyochéline semble cependant jouer un rôle plus important que la pyoverdine dans l'acquisition du fer à partir des déchets de fibrociment. L'implication des sidérophores dans l'extraction du magnésium n'a cependant pas pu être montrée. L'importance des sidérophores dans l'extraction du fer des déchets de flocage avait également été montrée (**Figure 5 Article 3**). Cependant contrairement au fibrociment, en présence de flocage l'absence d'un sidérophore était compensée afin d'atteindre une dissolution du fer identique à la souche produisant les deux sidérophores. Lorsque nous regardons la croissance des mutants, nous remarquons que la croissance du double mutant est stimulée par la présence de fibrociment, atteignant 2,9.10<sup>8</sup> UFC/mL (**Annexe 10**). Cette croissance est nettement supérieure à celle obtenue dans un milieu CAA avec (3,6.10<sup>7</sup> UFC/mL) ou sans (2,3.10<sup>7</sup> UFC/mL) magnésium. Cela signifie que les bactéries utilisent probablement d'autres mécanismes d'acquisition du fer et du magnésium que les sidérophores. Cependant, cette stimulation peut être également dû à une altération des amiantes par le milieu CAA qui peut libérer de faibles quantités de magnésium mais également de fer.

## III. <u>Bilan d'altération des déchets de fibrociment par les</u> pyoverdines et les *Pseudomonas*

Nous venons de mettre en évidence l'impact des pyoverdines et des *Pseudomonas* sur l'altération de déchets de fibrociment, composé de chrysotile et d'une matrice cimentaire. L'étude des mécanismes impliqués dans l'altération de ce déchet a également permis de mettre en avant l'implication des sidérophores dans ce processus.

Suite aux tests des différentes pyoverdines produites par diverses souches sur l'altération du fibrociment, nous avons mis en avant une différence d'efficacité de ces pyoverdines pour extraire le fer de ce déchet. Les pyoverdines produites par P. aeruginosa PAO1 et P. syringae ATCC 19310 ont en effet montré une efficacité supérieure dans l'extraction du fer du fibrociment comparé aux autres pyoverdines. La pyoverdine produite par P. mandelii SB8.3 a extrait le moins de fer en présence de fibrociment, alors que cette pyoverdine était la plus efficace en présence de chrysotile-gypse. Ainsi l'efficacité d'altération des pyoverdines est différente selon les déchets d'amiantes. La capacité d'altération du fibrociment par les pyoverdines produites par P. aeruginosa PAO1, P. syringae ATCC 19310 et P. mandelii SB8.3 a donc ensuite été testée à long terme, afin de déterminer la limite d'extraction ainsi que le rendement d'altération de ces pyoverdines. Afin de déterminer le pourcentage d'extraction par les pyoverdines, une minéralisation des déchets de fibrociment a été effectuée permettant ainsi de quantifier la quantité de fer présent dans ces déchets. Après 20 cycles d'altération de 24 h, nous avons obtenu respectivement 34 %, 27 % et 21 % de fer extrait du fibrociment pour les pyoverdines produites par P. aeruginosa PAO1, P. syringae ATCC 19310 et P. mandelii SB8.3 (Figure 51). Il est important de noter qu'aucun effet n'a été montré sur l'extraction du magnésium, lié à une précipitation du magnésium présent dans le milieu de culture.



**<u>Figure 51</u>** : Pourcentage de fer extrait dans des déchets de fibrociment après 20 cycles de 24 h en présence de surnageants de culture de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas syringae* ATCC 19310 et *Pseudomonas mandelii* SB8.3.

Les rendements d'altération des pyoverdines obtenus sur les déchets de fibrociment sont nettement supérieurs à ceux obtenus sur les déchets de flocage. De plus, contrairement au chrysotile-gypse, la limite d'extraction des pyoverdines n'a pas encore été atteinte sur les déchets de fibrociment. Ainsi, des rendements encore plus importants pourront être obtenus en continuant les cycles d'altération. Les différences de rendement entre ces déchets pourraient être associés au broyage qui a été effectué sur les échantillons de fibrociment. En effet, l'impact du broyage sur les amiantes a déjà été montré (Spasiano and Pirozzi, 2017; Paolini *et al.*, 2019) et ce procédé permettrait dans notre cas d'augmenter l'accessibilité du fer pour les pyoverdines.

L'étude des mécanismes impliqués dans l'altération du fibrociment en utilisant *P*. *aeruginosa*, a permis de mettre en avant l'importance des sidérophores dans la dissolution du fer mais pas du magnésium des déchets de fibrociment. Nous avons montré que les voies de biosynthèse des sidérophores produits par *P. aeruginosa*, la pyoverdine et la pyochéline,

étaient réprimées en présence de fibrociment, liée à l'extraction du fer de l'amiante par les bactéries. Cette répression étant plus importante qu'en présence de chrysotile-gypse, ceci prouve l'accessibilité plus importante du fer dans les déchets de fibrociment. L'absence de production de ces sidérophores a cependant un impact important sur la dissolution du fer de ce déchet. Les sidérophores jouent donc un rôle essentiel dans l'altération des déchets de fibrociment. Toutefois, d'autres mécanismes pourraient être impliqués dans l'altération des amiantes. En effet, l'absence de production des deux sidérophores n'empêche pas la stimulation de croissance en présence de fibrociment dans un milieu carencé en fer et en magnésium (**Annexe 10**). Cette stimulation peut cependant être liée en partie à une altération de l'amiante par le milieu de culture.

## **Chapitre 8**

## Altération de déchets amiantés par des acides organiques

#### I. Introduction

Les amiantes possèdent une sensibilité différente aux attaques acido-basiques. Les serpentines sont sensibles aux attaques acides tandis que les amphiboles sont sensibles aux attaques basiques. Nous avons également mis en avant l'impact d'un pH acide sur l'altération du chrysotile composant les déchets amiantés utilisés dans ce travail. Un procédé biochimique innovant a été proposé, utilisant l'acide lactique présent dans le petit lait afin de dissoudre la phase cimentaire des déchets de fibrociments contenant de l'amiante. A la suite de ce traitement, l'altération est achevée par un traitement hydrothermal (Balducci et al., 2012). Les acides organiques ont été décrits dans la littérature comme molécules pouvant altérer les minéraux ou agir en synergie avec les sidérophores (Ahmed and Holmström, 2014). Dans cette optique, nous avons voulu comparer l'action de différentes solutions d'acides organiques, issus de l'industrie agroalimentaire, sur l'altération des déchets de flocage et de fibrociment. Pour cela, nous avons travaillé avec du petit lait provenant de la société Alsace Lait et du jus de choucroute provenant de la station de traitement des eaux usées du bassin de l'Ehn, qui utilise un procédé de méthanisation pour traiter ce déchet. Le jus de choucroute et le petit lait sont des déchets liquides connus pour être acides, avec un pH égale à environ 3,70 pour le jus de choucroute et à 4,30 pour le petit lait.

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur des déchets de flocage afin de comparer l'effet du petit lait et du jus de choucroute sur l'altération de ce déchet. Pour cela, des échantillons de chrysotile-gypse ont été incubés avec ces différentes solutions d'acides organiques et un suivi de l'altération a été effectué par dosage du fer et du magnésium extrait. La cinétique d'extraction de ces éléments a tout d'abord été mesurée afin de déterminer la durée optimale d'extraction du petit lait et du jus de choucroute. Puis des cycles d'altération ont été réalisés afin de déterminer la limite de dissolution et le rendement d'altération de ces solutions d'acides organiques. D'autre part, afin d'éviter un traitement hydrothermal, utilisé dans le brevet de Balducci *et al.* (2012), une méthode alternative a été testée en utilisant du petit lait inoculé avec une bactérie lactique, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. Cette stratégie a pour objectif de maintenir un environnement acide par ces bactéries productrices d'acides organiques afin de contrer l'alcalinisation engendrée par la dissolution des déchets amiantés. Une cinétique de dissolution du fer et du magnésium de déchets de chrysotile gypse, en utilisant cette méthode, a donc été effectuée afin de déterminer la durée optimale

d'extraction. Enfin des cycles d'altération ont été réalisés afin de déterminer la limite d'extraction et le rendement d'altération de cette voie.

Suite à ces expériences sur des déchets de flocage, nous avons ensuite testé ces différentes voies sur des déchets de fibrociment. Ainsi, nous avons commencé à travailler avec des déchets de fibrociment provenant d'un tuyau destiné au transport de l'eau potable et fournis par la société Eternit. Ces déchets étaient composés principalement de chrysotile mais qui contenaient également des traces notables de crocidolite. Etant donné le peu d'échantillons en notre possession, nous n'avons effectué qu'une cinétique d'extraction de fer et de magnésium en présence de petit lait ou de jus de choucroute. La stratégie impliquant l'utilisation de petit lait inoculé par des *L. plantarum* a ensuite été testée sur les échantillons de tuile de toit en fibrociment provenant de la société CEFASC Environnement utilisé dans le chapitre 7. Une cinétique d'altération a été réalisée afin de déterminer la limite et le rendement d'extraction de cette voie.

#### II. <u>Résultats</u>

#### 1. Altération du chrysotile-gypse par des solutions d'acides organiques

#### a. Comparaison d'altération entre le jus de choucroute et le petit lait

Afin de comparer l'altération d'échantillons de chrysotile-gypse par du jus de choucroute et du petit lait stérile (voir Matériels et Méthodes), nous avons tout d'abord effectué une cinétique d'extraction de fer et de magnésium durant 96 h dans chacun de ces milieux (Figure 52). Concernant le fer, les résultats montrent une différence d'efficacité entre le jus de choucroute et le petit lait (Figure 52 A). En effet, au cours des 96 h d'incubation après soustraction du fer présent au départ dans la solution, des résultats négatifs sont obtenus pour le jus de choucroute passant de -3,4 mg/L après 24 h à -6,4 mg/L après 96 h. Ces résultats surprenants nous ont laissé supposer que le fer présent dans le jus de choucroute s'est fixé sur les fibres d'amiante. Ceci a été confirmé par observation en microscopie électronique à balayage (collaboration avec Institut Charles Gerhardt Montpellier). Comparé au jus de choucroute, le petit lait a extrait une quantité relativement importante de fer allant de 1,9 mg/L après 24 h à 2,69 mg/L après 96 h. En ce qui concerne l'extraction de magnésium, une différence est également observée selon la solution d'acides organiques utilisée (Figure 52 B). Le jus de choucroute présente une efficacité d'extraction du magnésium (passant de 70 à 76 mg/L entre 24 et 96 h) plus importante que le petit lait (passant de 37 à 55 mg/L entre 24 et 96 h). Cette différence d'extraction pourrait être liée à une différence de pH car le jus de choucroute est plus acide (pH=3,7) que le petit lait (pH=4,3). Quelle que soit la solution d'acides organiques utilisée, une forte extraction de fer et de magnésium pour le petit lait et seulement de magnésium pour le jus de choucroute est constatée dès 24 h d'incubation.



**Figure 52** : Cinétique d'extraction de fer (A) et de magnésium (B) de déchets de chrysotile-gypse durant 96 h en présence de petit lait ou de jus de choucroute. CHR-GY: Chrysotile-gypse. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 5 réplicats.

s **H**e**H**lu**f**le**n** d**r**r**f**lt**f**lt **f j**ti<del>tl</del>ait en effectuant huit Nous avons alté cycles de renouvellet nent de 24 h (T24-1 à T24-8) et un cycle de 96 h (T96). Le suivi du fer et du magnésium dissol s a été mesuré après chaque cycle afin de suivre l'altération (Figure 53). Nous remarquons d'uns un premier temps que le jus de choucroute a extrait une quantité relativement importante de fer lors du premier cycle de 24 h (2,99 mg/L) (Figure 53 A), alors qu'une fixation sur les fibres d'amiante du fer présent dans le jus de choucroute avait été observé lors de la cinétique. Durant les cycles T24-1 à T24-8, une diminution de l'extraction du fer par le petit lait (allant de 1,91 à 0,33 mg/L) et le jus de choucroute (allant de 2,99 à 0,62 mg/L) est observée. Cette diminution se fait progressivement au cours des cycles pour le petit lait tandis que les valeurs fluctuent pour le jus de choucroute. Cette variation pourrait être due à une fixation du fer présent dans le jus de choucroute, comme nous avons déjà pu le remarquer lors de la cinétique. Cela peut également être due à un changement de site d'extraction du fer (surface du déchet, couche de brucite et couche de silice), déjà observé précédemment lors de l'altération des déchets de flocage par les pyoverdines et les Pseudomonas (chapitre 6). Concernant le magnésium, une diminution de l'extraction est également observée entre T24-1 et T24-8 pour le petit lait (allant de 26 à 13 mg/L) et le jus de choucroute (allant de 27 à 6 mg/L) (Figure 53 B). Cette extraction varie selon les cycles quelque soit la solution d'acides organiques utilisée. Ceci peut être expliqué par un changement de site d'extraction du magnésium, présent dans le gypse et dans les fibres composées de fibrilles avec 12 à 20 couches de brucite (Mg(OH)<sub>2</sub>). Lors du dernier cycle de 96 h, l'extraction des deux éléments a augmenté en présence de petit lait (0,59 mg/L pour le fer et 23 mg/L pour le magnésium) et de jus de choucroute (1,12 mg/L pour le fer et 12 mg/L pour le magnésium), lié à un temps de contact plus long qui permet probablement de dissoudre le magnésium présent plus en profondeur dans les couches de brucite.



Figure 53 : Extraction de fer (A) et de magnésium (B) de déchets de chrysotile-gypse après huit cycles de 24 heures (T24-1 à T24-8) et un cycle de 96 heures (T96) en présence de petit lait ou de jus de choucroute. CHR-GY : chrysotile-gypse. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 5 réplicats.

#### b. <u>Altération du chrysotile-gypse par du petit lait inoculé avec Lactobacillus</u> plantarum

Une forte extraction de fer et de magnésium a été observée en présence de petit lait et de jus de choucroute, lié au pH acide de ces solutions. Une augmentation du pH est cependant mesuré après chaque cycle de renouvellement (**Annexe 11**) associé à la dissolution du magnésium, limitant ainsi l'altération du chrysotile-gypse. Nous avons donc eu l'idée d'inoculer une bactérie lactique, *L. plantarum*, dans ces solutions d'acides organiques afin de maintenir un pH acide par fermentation lactique lors de l'altération du chrysotile-gypse. Cette bactérie est bien connue notamment dans la fermentation lactique de produits alimentaires telle que les olives, la choucroute ou les cornichons. Le petit lait a été utilisé pour ce procédé car aucune croissance de *L. plantarum* n'a été observée dans le jus de choucroute. De plus étant donné que le fer présent dans le jus de choucroute a tendance à se fixer sur les fibres d'amiante, l'utilisation du petit lait est plus judicieuse.

Une cinétique d'extraction comparant l'efficacité d'altération du chrysotile-gypse en présence de petit lait avec ou sans *L. plantarum* a donc été réalisée (Figure 54). Les résultats montrent une forte augmentation de l'extraction de fer et de magnésium entre 24 et 96 h en présence de *L. plantarum* (3,48 à 8,93 mg/L pour le fer et 68 à 132 mg/L pour le magnésium) comparé à l'essai sans bactéries (1,78 à 2,64 mg/L pour le fer et 32 à 52 mg/L pour le magnésium). Après 96 h d'incubation en présence de *L. plantarum*, l'extraction de fer et de magnésium est environ 3 fois plus importante qu'avec le petit lait sans bactérie et environ 2 fois plus de magnésium a été extrait comparé au jus de choucroute. Cette forte extraction mesurée durant la cinétique est liée à une forte diminution du pH en présence de *L. plantarum* (pH=3,85) alors qu'en présence de petit lait sans bactérie le pH augmente (pH=5,28). La durée optimale d'extraction du petit lait en présence de *L. plantarum* est de 96 h. En effet lorsque qu'on effectue une cinétique plus longue (Annexe 12), l'extraction du fer et du magnésium n'augmente pas.



<u>Figure 54</u>: Cinétique d'extraction de fer (A) et de magnésium (B) de déchets de chrysotile-gypse durant 96 h en présence de petit lait avec ou sans ajout de *Lactobacillus plantarum*. CHR-GY: Chrysotile-gypse. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

Suite à ces résultats prometteurs, nous voulions déterminer la limite d' $\bar{e}xtraction de cette$ I intervoie. Pour cela, nous avons effectué quatre cycles de 72 h avec renouvellement du petit lait,afin de permettre le développement de*L. plantarum*à chaque cycle. Les résultats montrentune forte extraction de fer (9,22<sup>T</sup> à 1,17 mg/L) et de magnésium (91 à 19 mg/L) qui diminue deT72-1 à T72-4. Contrairement aux résultats précédents obtenus avec le petit lait et le jus dechoucroute, aucune fluctuation de résultats n'est observée durant les cycles. La diminution dela dissolution est progressive au cours des cycles d'altération en présence de*L. plantarum*, liéprobablement au pH acide et stable durant l'expérience (**Annexe 13**), altérant de façonhomogène et progressive les fibres d'amiantes. Il est important de noter qu'après quatrecycles de 72 h, la limite d'extraction n'est pas encore atteinte avec des quantités encoreimportantes de magnésium dissous.



**Figure 55** : Extraction de fer (A) et de magnésium (B) de déchets de chrysotile-gypse après des cycles de 72 heures en présence de petit lait avec ou sans ajout de *Lactobacillus plantarum*. CHR-GY : chrysotile-gypse. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

## 2. <u>Altération de tuyau de fibrociment par du jus de choucroute ou du</u> <u>petit lait</u>

Suite aux résultats interessants obtenus sur les déchets de flocage, nous voulions tester l'efficacité des solutions d'acides organiques sur des déchets de fibrociment. Nous avons dans un premier temps comparé l'efficacité du jus de choucroute et du petit lait lors d'une cinétique d'extraction du fer et du magnésium de tuyau de fibrociment, composé notamment de chrysotile et d'une matrice cimentaire (Figure 56). Nous remarquons tout d'abord que l'extraction du fer par le jus de choucroute présente des résultats négatifs entre 24 et 96 h (-5,06 à -5,13 mg/L). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec les déchets de flocage et sont donc probablement dus à une fixation sur les fibres d'amiantes du fer présent dans le jus de choucroute. Concernant le petit lait, la quantité de fer extraite n'est pas très élevée et varie peu entre 24 et 96 h (allant de 0,23 à 0,49 mg/L). Les résultats obtenus pour le magnésium montrent également une faible variation de l'extraction entre 24 et 96 h et une dissolution plus importante de magnésium en présence de petit lait (33 à 35 mg/L) comparé au jus de choucroute (17 à 22 mg/L). Cette faible extraction observée par rapport aux déchets de flocage est dû à une forte augmentation du pH lors de la dissolution des déchets de fibrociment (Annexe 14), lié à la dissolution de la matrice cimentaire associé à la dissolution de la couche de brucite.



<u>Figure 56</u>: Cinétique d'extraction de fer (A) et de magnésium (B) de tuyau de fibrociment durant 96 h en présence de petit lait ou de jus de choucroute. Fibro: fibrociment. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

## 3. <u>Altération de tuile de toit en fibrociment par du petit lait en présence</u> de *Lactobacillus plantarum*

Les fibrociments ont été altérés par du petit lait en présence de *L. plantarum* afin de vérifier si la forte augmentation du pH pouvait être compensée par l'ajout de cette bactérie. Cette voie a donc été testée sur des échantillons de tuile de toit en fibrociment composé de fibres de chrysotile et d'une matrice cimentaire.

Nous avons comparé dans un premier temps l'extraction du petit lait avec ou sans *L. plantarum* (**Figure 57**). Après 96 h d'incubation, la présence de *L. plantarum* a permis d'extraire 200 fois plus de fer et 30 fois plus de magnésium qu'en absence de bactéries. Comme précédemment, cette forte extraction est liée à une forte diminution du pH en présence de *L. plantarum* (pH=3,7) alors qu'en présence de petit lait sans bactérie le pH augmente (pH=5,7). Entre 24 et 96 h d'incubation, la quantité de fer et de magnésium extraite augmente en présence de *L. plantarum* (22 à 59 mg/L pour le fer et 57 à 93 mg/L pour le magnésium) tandis qu'en présence de petit lait sans bactérie l'extraction a tendance à diminuer (1,37 à 0,26 mg/L pour le fer et 4 à 3 mg/L pour le magnésium) au cours du temps. Cette diminution pourrait être due à une précipitation des éléments lié à l'augmentation du pH

durant la cinétique. A partir de 72 h d'incubation un plateau est atteint, indiquant que la durée optimale d'extraction est de 72 h.



<u>Figure 57</u>: Cinétique d'extraction de fer (A) et de magnésium (B) de tuile de toit en fibrociment durant 96 h en présence de petit lait avec ou sans ajout de *Lactobacillus plantarum*. Fibro: fibrociment. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

Afin de déterminer la limite d'extraction de cette voie sur les déchets de tuile de toit en fibrociment, quatre cycles de renouvellement de 72 h ont été réalisés en présence de petit lait et de *L. plantarum* (Figure 58). Après le premier cycle de 72 h, une forte extraction de fer (68 mg/L) et de magnésium (299 mg/L) est observée. Cette extraction chute fortement au cours des cycles pour atteindre à T72<sub>7</sub>4 une concentration de 2,3 mg/L pour le fer et 14 mg/L pour le magnésium. L'extraction de fer et de magnésium chute brutalement après le cycle T72-1 comparé aux résultats obtenus avec les déchets de flocage. Ceci est probablement dû au fait que les déchets de fibrociment ont été broyés avant le traitement biologique. L'impact du broyage sur l'efficacité de dissolution du fer par les pyoverdines a également été montré dans le chapitre 7. Les résultats obtenus ici confirment l'importance du broyage dans l'efficacité d'altération des déchets d'amiantes.



**Figure 58** : Extraction de fer (A) et de magnésium (B) de tuile de toit en fibrociment après des cycles de 72 heures en présence de petit lait avec ou sans ajout de *Lactobacillus plantarum*. Fibro : fibrociment. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

### 4. <u>Production d'acides organiques par *Lactobacillus plantarum* en présence de déchets amiantés</u>

Les résultats présentés précédemment ont montré que le pH du petit lait diminuait et restait stable en présence de *L. plantarum* et de déchets amiantés. Les solutions après traitement ont été analysées par le centre de ressources technologiques AERIAL qui ont utilisé la technique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) afin de déterminer et quantifier les acides organiques produits.

Nous avons comparé la production d'acides organiques des différentes conditions suivantes : i) Le petit lait avant traitement ii) le petit lait en présence de *L. plantarum* après 72 h d'incubation iii) le petit lait en présence de *L. plantarum* avec du chrysotile-gypse ou du fibrociment (tuile de toit) après 72 h d'incubation. Les résultats présentés dans le **Tableau 6** montrent qu'une concentration plus importante de lactate (130 mM) et d'acétate (11,4 mM) est retrouvée dans le petit lait en présence de *L. plantarum*, sans amiante, comparé aux concentrations retrouvées dans le petit lait avant traitement (85,5 mM de lactate et 4,9 mM d'acétate). En présence de *L. plantarum* et d'amiante, le lactate, l'acétate mais également le succinate sont retrouvés en plus grande quantité comparée au petit lait seul. En présence ou en absence d'amiante, les solutions possèdent les mêmes quantités d'acétate (10,9 à 11,4 mM).

La concentration en lactate et en succinate est cependant plus importante en présence d'amiante avec des différences selon le type de déchet. En présence de chrysotile, 199,8 mM de lactate et 1,11 mM de succinate sont mesurés tandis qu'en présence de fibrociment les concentrations sont respectivement de 261,9 et 2,20 mM de lactacte et de succinate. La présence d'amiante stimule donc la production d'acides organiques par L. plantarum mais de manière différente selon le type de déchet. Ceci peut être expliqué par la libération du magnésium présent dans ces déchets. En effet, des études ont montré que la supplémentation d'un milieu par du magnésium permet de stimuler la production d'acides organiques et la croissance des bactéries lactiques (Amouzou et al., 1985; Givry and Duchiro, 2008; Lew et al., 2013). Etant donné qu'une quantité plus importante de magnésium est libérée en présence de fibrociment, la production d'acides organiques est donc stimulée de façon plus importante qu'en présence de chrysotile-gypse. Un autre résultat étonnant est la disparition du citrate en présence d'amiante. Il a été montré que le citrate pouvait s'adsorber sur de l'hématite, un minérale riche en fer et que cette adsorption était maximale entre 2,5 et 5,5 de pH (Noerpel and Lenhart, 2015). Etant donné que le pH de nos solutions est de 3,8, le citrate présent dans le petit lait a pu s'adsorber sur les fibres d'amiante.

<u>Tableau 6</u> : Concentrations en acides organiques (acide et base conjuguée) identifiés dans le petit lait non traité et dans le petit lait avec ajout de *Lactobacillus plantarum* incubé avec ou sans chrysotile-gypse ou fibrociment durant 72 h.

	Concentration (mM)			
	lactate	acetate	succinate	citrate
Petit lait	85.5	4.9	0.72	10.7
Petit lait + L. plantarum	130	11.4	0.71	6.8
Petit lait + <i>L. plantarum</i> + CHR-GY	199.8	11.4	1.11	n.d.
Petit lait + <i>L. plantarum</i> + Fibro	261.9	10.9	2.20	n.d.

n.d. : non déterminé ; CHR-GY : chrysotile-gypse ; Fibro : tuile de toit en fibrociment.

## III. <u>Bilan d'altération des déchets amiantés par des solutions</u> <u>d'acides organiques</u>

L'efficacité d'altération des déchets amiantés composé de chrysotile par des acides forts, tels que l'acide sulfurique ou nitrique, est bien connue. En plus de ces acides, l'influence des acides organiques sur la dégradation des fibres de chrysotile a également été montrée. Cependant afin d'aboutir à une altération totale de l'amiante, l'utilisation de ces acides a été combiné à d'autres procédés de traitement tels que les attaques hydrothermales. Notre objectif était donc dans un premier temps de comparer l'efficacité d'altération de déchets amiantés en utilisant du petit lait, déjà utilisé dans des procédés de traitement de l'amiante et du jus de choucroute, connu pour être un déchet acide et corrosif. Dans un second temps, nous voulions optimiser cette voie en utilisant le pouvoir de fermentation de la bactérie lactique *L. plantarum* afin de maintenir un pH acide tout au long du traitement.

Après incubation de déchets de chrysotile-gypse avec du petit lait et du jus de choucroute, nous avons montré que le petit lait était capable de dissoudre efficacement le fer et le magnésium de ces déchets de flocage. Le jus de choucroute a également montré sa capacité à extraire des quantités importantes de magnésium, cependant le fer présent dans cette solution se fixe sur les fibres d'amiantes. Nous avons poursuivi l'altération des déchets de flocage avec ces solutions d'acides organiques et nous avons montré que sur le long terme le petit lait extrait plus efficacement le fer et le magnésium du chrysotile-gypse. Le rendement d'altération obtenu à la fin de ces cycles d'altération (Figure 59), confirme cela avec une extraction totale de 26 % de fer et 39 % de magnésium pour le petit lait alors que le jus de choucroute a extrait respectivement 10 et 27 % de fer et de magnésium. Lors de ces expériences, nous avons remarqué une augmentation relativement importante du pH pouvant limiter la dissolution de l'amiante. Nous avons donc utilisé le pouvoir de fermentation de L. plantarum afin de diminuer le pH et augmenter l'altération du chrysotile-gypse. Nous avons en effet montré que cette bactérie était capable de se développer dans du petit lait et d'abaisser le pH de cette solution. Ainsi en présence de L. plantarum, une forte extraction de fer et de magnésium a été obtenue comparé au petit lait seul. Des cycles de renouvellement du petit lait en présence de L. plantarum ont permis une forte altération du chrysotile gypse, aboutissant à des rendements de 41 % de fer extrait et 25 % de magnésium extrait (Figure 59). Ainsi l'ajout de L. plantarum permet la plus grande extraction de fer tandis que la plus forte dissolution de magnésium est obtenue avec le petit lait seul. Néanmoins la limite d'extraction pour ces deux voies n'était pas atteinte et le nombre de cycles effectués en présence de *L. plantarum* était plus bas (4 cycles de 72 h) qu'en présence de petit lait sans bactéries (2 cycles de 96 h et 8 cycles de 24 h).



<u>Figure 59</u>: Pourcentage de fer et de magnésium extrait dans des déchets de chrysotilegypse après 8 cycles de 24 h et 2 cycles de 96 h en présence de jus de choucroute et de petit lait et après 4 cycles de 72 h en présence de petit lait incubé avec *Lactobacillus plantarum*.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des déchets de fibrociment. En effet, le petit lait a permis une extraction du fer et du magnésium contenu dans ces déchets tandis que le jus de choucroute a réussi à extraire que le magnésium étant donné que le fer présent dans cette solution s'est fixé sur les fibres d'amiante. La dissolution des éléments des fibrociments était cependant moins importante comparée au chrysotile-gypse, lié à une augmentation de pH plus importante. L'ajout de *L. plantarum* au petit lait a permis d'obtenir des résultats prometteurs. En effet, une forte extraction de fer et de magnésium a été obtenue et cela dès le premier cycle d'altération. Suite à 4 cycles de 72 h, nous avons obtenu des rendements d'extraction de 80 % pour le fer et 100 % pour le magnésium (**Figure 60**). La cartographie des éléments présents dans les fibres après traitement, via l'utilisation d'un microscope électronique à transmission, a cependant montré que du magnésium était encore présent. Néanmoins, le ratio

magnésium/silice était très bas, entre 0,2 et 0,3, alors que ce ratio se situe généralement autour de 1 dans des fibres de chrysotile non traitées.



Figure 60 : Pourcentage de fer (A) et de magnésium (B) extrait dans des déchets de tuile de toit en fibrociment après 4 cycles de 72 h en présence de petit lait incubé avec *Lactobacillus plantarum*.

Quels que soient les déchets utilisés, l'utilisation de petit lait associé à *L. plantarum* semble être la voie la plus prometteuse comparé à l'utilisation de jus de choucroute ou de petit lait sans bactérie. De plus l'acidité des solutions organiques permet de dissoudre la matrice gypse et cimentaire des déchets amiantés, permettant ainsi de libérer les fibres d'amiante. Nous constatons cependant une différence de rendement selon le type de déchet utilisé. Cette différence entre les déchets de chrysotile-gypse et de fibrociment est probablement liée au broyage. En effet, comme nous avons déjà pu le remarquer dans le chapitre 7, le broyage des déchets de fibrociment permet une altération plus importante de ce déchet. Ainsi un broyage des déchets de flocage pourrait améliorer considérablement l'altération de ce déchet et ainsi augmenter le rendement d'extraction du fer et du magnésium.

# **Conclusions et Perspectives**

L'ensemble des résultats obtenus durant cette thèse a permis d'approfondir nos connaissances de l'altération des déchets amiantés par les bactéries et les sidérophores afin de développer un procédé de bioremédiation de l'amiante.

L'étude de l'altération de déchets de flocage et de fibrociment par les pyoverdines produites par différentes souches de Pseudomonas a permis de mettre en avant la capacité de ces composés à extraire le fer présent dans les fibres d'amiante. Les pyoverdines ont montré des efficacités de chélation différentes selon i) le type de déchet amianté ii) la nature des amiantes, chrysotile ou amphibole iii) la structure des pyoverdines iv) la concentration en sidérophore. Nous n'avons cependant pas observé d'impact des pyoverdines sur l'extraction du magnésium présent dans les fibres de chrysotile, lié à une dissolution du magnésium par le milieu de culture qui pourrait ainsi masquer l'influence des sidérophores. Des tests d'affinité pourraient donc être effectués afin de vérifier si les pyoverdines sont capables de chélater efficacement le magnésium. De plus, les pyoverdines ont également été capables d'extraire du fer présent dans des déchets de flocage composé d'amiante de type amphibole, l'amosite. Compte tenu de la présence d'amphibole dans certains fibrociments, il serait intéressant de tester l'efficacité des pyoverdines sur d'altération des déchets de fibrociment contenant du chrysotile et des amphiboles. L'étude de l'altération d'autres espèces d'amphiboles, tel que la crocidolite ou la trémolite, en utilisant la voie pyoverdine serait également intéressante afin d'évaluer si l'efficacité d'altération des pyoverdines est différente selon l'espèce d'amphibole. Il serait également intéressant de tester les pyoverdines sur d'autres types de déchets possédant une matrice différente des déchets de flocage et de fibrociment, tel que les dalles vinyles composé d'une matrice plastique.

Concernant les interactions entres les bactéries et les amiantes, nous avons montré la capacité des *Pseudomonas* à puiser, pour leur développement, le fer et le magnésium présents dans des déchets de flocage ou de fibrociment. L'implication des sidérophores, pyoverdine et pyochéline, ont notamment été mis en avant dans les mécanismes de dissolution du fer des amiantes. De nombreuses questions subsistent cependant concernant le rôle des *Pseudomonas* et l'implication des voies sidérophores dans la dissolution du magnésium. Nous avons en effet observé une différence de dépendance vis à vis du magnésium entre les espèces de *Pseudomonas* mais nous n'avons pas réussi à différencier clairement l'impact des bactéries ou du milieu de culture sur la dissolution du magnésium des déchets amiantés. Ainsi, il serait intéressant de trouver un milieu de culture permettant la croissance des *Pseudomonas* mais n'altérant pas les déchets amiantés, afin de pouvoir étudier la capacité des bactéries et les

mécanismes impliqués dans la dissolution du magnésium contenu dans l'amiante. Nous pourrions également envisager un prétraitement des déchets amiantés, permettant d'extraire le magnésium facilement solubilisable et ainsi limiter la libération de magnésium par le milieu de culture lors de la culture bactérienne. Que ce soit dans la littérature ou lors de cette thèse, les interactions bactéries-amiantes ont principalement été étudiées avec le chrysotile. Il serait donc important de travailler avec les amphiboles afin de vérifier si la différence de structure de cette famille d'amiante influence la capacité d'altération des *Pseudomonas*. De plus, comme suggéré précédemment avec les pyoverdines, nous pourrions tester l'altération bactérienne sur d'autres déchets comme les dalles vinyles.

L'utilisation de solutions d'acides organiques pour traiter les déchets amiantés a permis de mettre en évidence la capacité du jus de choucroute et du petit lait à dissoudre le chrysotile mais également la matrice de gypse et cimentaire des déchets amiantés. Une efficacité supérieure du petit lait a notamment été mis en avant dans la solubilisation du fer et du magnésium de ces déchets. Ainsi, l'optimisation de cette voie via l'ajout de *Lactobacillus plantarum* a permis d'augmenter le rendement d'altération des différents déchets mais également de réduire le temps de traitement. Ceci peut s'expliquer par une forte diminution de pH lors du développement de cette bactérie dans le petit lait, lié à la fermentation lactique. De plus, l'ajout de déchets amiantés permet de stimuler la croissance et la production d'acides organiques de *L. plantarum* via la libération du magnésium présent dans les déchets. Il serait maintenant intéressant de tester cette voie sur d'autres déchets tels que les dalles vinyles amiantées. D'autre part, nous pourrions également évaluer la capacité des acides organiques à altérer les amphiboles. En effet, bien que ce type d'amiante ne soit pas sensible à l'acidité, certains acides organiques possèdent des capacités de chélation intéressantes pouvant ainsi extraire les éléments présents dans les fibres d'amphibole.

Les différentes voies i) pyoverdines ii) bactériennes iii) acides organiques, ont révélé des rendements d'altération différents. Ainsi, quelque soit le déchets amianté, flocage ou fibrociment, l'utilisation de petit lait associé à *L. plantarum* fut le procédé le plus efficace pour altérer l'amiante, suivi par l'utilisation des pyoverdines et enfin par l'utilisation des bactéries. Une différence a cependant été observée entre le rendement d'altération des déchets de flocage et de fibrociment, lié à un broyage de l'amiante-ciment qui a permis d'améliorer l'efficacité d'altération de ce déchet. Il serait donc intéressant d'effectuer un broyage des déchets de chrysotile-gypse afin de vérifier si cela pouvait permettre une altération plus importante de ce déchet par les pyoverdines, les bactéries ou les acides organiques. Afin de

vérifier l'efficacité des différents procédés d'altération des déchets amiantés et voir si ces traitements permettent une baisse de la toxicité des fibres, il serait nécessaire de mettre en place un test toxicologique au laboratoire, tel que la quantification des ROS induits par les amiantes. D'autre part, la voie pyoverdine et bactérienne pourrait être fusionnée grâce à la construction d'une souche surproductrice de sidérophore, non réprimé par la présence de fer. En effet, une souche de *P. aeruginosa* surproduisant la pyoverdine a été construite au laboratoire par Sébastien Mathieu lors de son stage de Master 2 et a donné des résultats prometteurs sur l'altération des amiantes. Etant donné la pathogénicité de *P. aeruginosa*, il serait intéressant de construire une souche environnementale surproductrice de pyoverdine, telle que *Pseudomonas putida* KT2440, déjà utilisée dans des procédés biotechnologiques et qui pourra être utilisée dans notre procédé de bioremédiation. Ce projet sera poursuivi dans le cadre d'un stage master qui sera effectué en janvier.

Au vu des résultats obtenus, les différentes étapes de la mise en place d'un procédé de bioremédiation de déchets amiantés pourrait être le suivant (Figure 61) :

- Broyage en milieu liquide des déchets amiantés, idéalement dans du petit lait, afin d'éviter la dissémination des fibres. Traitement des effluents de petit lait dans une unité de méthanisation qui permettra la production d'électricité et de chaleur pouvant être utilisées dans le fonctionnement des bioréacteurs lors des étapes suivantes.
- 2) Transfert des déchets broyés vers un bioréacteur contenant du petit lait et *L. plantarum*. Cette étape pemettra tout d'abord de dissoudre la matrice gypse ou cimentaire et de libérer les fibres d'amiantes. Puis les acides organiques permettront la solubilisation du fer et du magnésium des fibres d'amiante, notamment du chrysotile.
- 3) Lorsque la limite d'extraction est atteinte, traitement des effluents de petit lait dans l'unité de méthanisation cité ci-dessus et passage des déchets solides vers un bioréacteur en vue du traitement en présence d'une souche de *Pseudomonas* surproductrice de sidérophore.
- Lorsque la limite d'extraction est atteinte, récupération des effluents liquides, extraction des métaux et traitement des effluents.
- 5) Contrôle des matériaux par caractérisation physique (Diffraction des rayons X, MOLP, META) après traitement. Si des fibres d'amiante sont encore présentes, passage vers un traitement chimique. Si au contraire les déchets sont totalement traités, l'altération pourra être finalisé des fibres de silice vers une filière de valorisation comme par exemple dans le BTP en tant que filler (jouant un rôle d'additif dans le béton) ou comme catalyseur dans l'industrie chimique.



Figure 61 : Schéma de principe d'un procédé de bioremédiation de déchets amiantés.
Le projet DRECMA (Destruction et recyclage des matériaux amiantés) faisant partie du Plan Recherche et Développement Amiante (PRDA) lancé par le Ministère du Logement, de l'Egalité des Territoires et de la Ruralité, va me permettre de pousuivre ce projet dans le cadre d'un CDD de 6 mois et ainsi poursuivre les expériences en bioréacteur. Cette phase impliquera une optimisation des paramètres (température, souche, milieu, pH) pour les voies les plus prometteuses. De plus d'autres perspectives de valorisation, faisant partie du projet DRECMA via les travaux menés par l'équipe d'Olivier Cambon (collaboration ICGM), permettent d'envisager l'utilisation des déchets amiantés traités dans la synthèse de zéolithes (nitrate cancrinite) utilisé dans la dépollution de l'eau par filtration, ou dans la synthèse de nanotubes de silice permettant la filtration de molécules biologiques.

Récemment, notre procédé pourrait trouver une application innovante dans la problématique des équipements des pompiers (Académie transfrontalière des risques, SDIS 67). En effet lors d'interventions en présence d'amiantes ces équipements peuvent être contaminés et compte tenu de leurs coûts élevés (600  $\in$ ), leur renouvellement représente une perte économique considérable. Les procédés de neutralisation efficaces actuels, tels que la vitrification ou les procédés chimiques, ne sont pas adaptés au maintien de l'intégrité de cet habillage, alors qu'un procédé biologique moins agressif permettrait une neutralisation de l'amiante sans détérioration de ces équipements.

Enfin, si le développement du procédé de bioremédiation de déchets amiantés présenté dans ce projet est réussi, cela impliquera de ne plus stocker 99-100 % des déchets et ainsi d'éliminer les déchets stockés depuis 20 ans. D'autre part, le petit lait étant considéré comme un déchet dans l'industrie agroalimentaire, ce procédé de traitement permettrait de revaloriser un déchet afin de traiter un autre déchet. De plus, étant donné l'importance de la filière laitière en France mais également dans les autres pays, l'accessibilité du petit lait ne sera pas un frein dans ce procédé.

# Matériels et Méthodes

Dans ce chapitre, les techniques non publiées sont présentées et le protocole expérimental est détaillé.

### Sécurité des manipulations

Toutes les expériences impliquant la manipulation d'amiante ont été menées sous un poste de sécurité microbiologique de type II en milieu liquide, afin d'éviter toute inhalation de fibres, Avec le port d'un masque FFP3, le port de gants et dans un local dédié. La gestion des déchets a été respectée selon les normes en vigueur pour les déchets amiantés.

### 1. Préparation des déchets amiantés

Objectif: Stérilisation les déchets amiantés.

Origine des déchets :

- Déchets de flocage : chantier de désamiantage de l'université Paris-Jussieu
- Déchets de tuyau en fibrociment : chantier de désamiantage de l'université Paris-Jussieu
- Déchets de tuile de toit en fibrociment : fourni par la société CEFASC Environnement

Mode opératoire :

- Broyage des échantillons de fibrociment 10 min à 500 rpm (broyeur planétaire), les déchets de flocage ne sont pas broyés
- Peser 0,2 g d'échantillons d'amiante
- Autoclavage (20 min à 121°C)
- Incubation 14 jours à 70°C

<u>Remarques</u>: Les échantillons de flocage et de tuyau en fibrociment ont été fournis par la SOMEZ. Les échantillons de fibrociment ont été broyés à l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier par Gaël TALBI (Doctorant).

## 2. Lavage des échantillons d'amiante

<u>Objectif</u>: Laver les échantillons d'amiante avant l'altération par les pyoverdines ou les bactéries afin d'enlever le fer et le magnésium facilement solubilisable.

Mode opératoire :

- Ajouter 20 mL de milieu de culture et vortexer

- Centrifugation 30 min à 9871 g
- Filtration du surnageant à l'aide d'un filtre Millex  $(0,22 \ \mu m)$
- Dosage du fer et du magnésium

### 3. Minéralisation des déchets amiantés

<u>Objectif</u>: Dissoudre la couche de brucite des fibres de chrysotile afin de calculer la quantité de fer et de magnésium présent dans les déchets amiantés.

#### Mode opératoire :

- Peser 5 échantillons d'amiante à 0,2 g avec une balance de précision
- Ajout 10 mL acide nitrique 4 N (Sigma)
- Après 8 jours d'incubation, centrifugation 30 min à 9871 g
- Filtration du surnageant à l'aide d'un filtre Millex (0,22 μm)
- Dosage du fer et du magnésium

### 4. Dosage du fer

Objectif: Dosage colorimétrique du fer.

#### Mode opératoire :

- 20 µL échantillon (3 réplicats par échantillon)
- Ajouter 40 µL d'acétate de Na (Sigma) saturé (5,5 Molaire)
- Ajouter à froid : 80 µL eau bi-distillée
- Ajouter à froid : 10 µL d'acide thioglycolique dilué 10 fois dans de l'eau distillée
- Agiter
- Ajouter à froid : 10 µL bathophénantroline à 0.5 % final dans de l'eau bi-distillée
- Agiter
- Laisser reposer la nuit à 4°C et à l'abri de la lumière
- Lecture microplaque 535 nm

## 5. Dosage du magnésium

Objectif: Dosage colorimétrique du magnésium.

#### Mode opératoire :

- 3 µL échantillon (3 réplicats par échantillon)

- 300 μL de mix : 1 volume de réactif 1 (1 mol/L 2-methyl-2-Amino-1-Propanol et 215 μmol/L EGTA) + 1 volume de réactif 2 (300 μmol/L calmagite)
- Laisser reposer 30 secondes
- Lecture microplaque à 500 nm

### 6. Préparation des milieux de culture

Objectif : Préparation des milieux de culture.

Mode opératoire :

Milieu Lysogeny Broth – LB

- Pour 1 litre ajouter 20 g Lysogeny Broth (Difco) si besoin ajouter 15 g d'agar
- Solubiliser dans de l'eau bi-distillée puis autoclaver

Milieu succinate - Succ

- Pour 1 litre ajouter
  - 7,42 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3H<sub>2</sub>O (Merck)
  - 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Carlo Erba)
  - 0,2 g MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (Merck) non ajouté en cas de succinate sans magnésium
  - 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck)
  - 4 g acide succinique (Sigma)
  - 3,1 g NaOH (Alfa Aesar)
- Solubilisation dans de l'eau bi-distillée (préchauffée) puis autoclaver

Milieu casaminoacides – CAA

- 5 g Casaminoacides (BD)
- 1,46 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Carlo Erba)
- 0,25 MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (Merck) non ajouté en cas de succinate sans magnésium
- Solubilisation dans de l'eau bi-distillée (préchauffée) puis autoclaver

## 7. Production et purification de pyoverdines

<u>Objectif</u>: Obtenir du surnageant de culture contenant de la pyoverdine et purification.

Mode opératoire :

#### **Production de pyoverdines**

- Décongélation de la souche de Pseudomonas fluorescent en milieu LB pendant environ 24 h à 30°C
- Repiquage en Falcon ; pré-culture :
  - Prélèvement de 1 mL de culture
  - Centrifugation 3 min à 9871 g
  - Eliminer le surnageant, incorporer 1 mL de milieu et vortexer
  - Centrifugation 3 min à 9871 g
  - Eliminer le surnageant, incorporer 1 mL de CAA ou Succ et vortexer
  - Ensemencer 1 mL de culture lavée dans 15 mL de CAA ou Succ 24 h à  $25^{\circ}C$
  - Mesurer la DO à 400 nm lorsqu'il y a une bonne pigmentation
- Repiquage en Erlen :
  - Prélèvement de 15 mL de pré-culture (généralement 1 pré-culture suffit pour ensemencer 2 cultures en Erlen)
  - Ensemencer dans 500 mL de CAA ou succinate en Erlen d'un litre ou 1 L en Erlen de 2 litres
  - Incuber 24 à 48 h (en fonction de la souche bactérienne) à 25°C
- Centrifugation 40 min 2664 g
- Filtration :
  - papier Whatman ; 3 filtres et 2 à 3 fois selon la viscosité
  - papier nitrocellulose ; 1 filtres et 2 à 3 fois selon la viscosité
- Mesurer la DO à 400 nm et ajustement de la concentration si besoin avec de la pyoverdine purifiée
- Filtration stérile 0,22 μm

#### **Purification de pyoverdines**

A partir des surnageants de culture filtrés obtenus précédemment :

- Acidification à pH 6 avec HCL 6 N : Vérification au pH mètre
- Mise sur colonne X-AD du surnageant acidifié (récupération ou non du filtrat). Mesurer la DO à 400nm
- Laver la colonne 3 fois à l'eau milliQ
- Elution de l'éthanol 50%. Puis mesurer la DO à 400nm
- Évaporation de l'éluât par rotation rotative.
- Reprendre le distillat dans 10 à 50 mL d'eau MQ : Pour une meilleure lyophilisation, les solutions ne doivent avoir une forte concentration en pyoverdine. Le volume d'eau MQ nécessaire pour reprendre le distillat est jaugé en fonction de la pigmentation de la solution :

- Jaune/Brun : trop concentré
- Jaune clair/ verdâtre : bien
- Vert : à évaporer
- Répartir 10 mL du distillat par Falcon pour une lyophilisation homogène
  - Boucher chaque Falcon avec du papier absorbant maintenu par un élastique.
  - Placer les tubes au congélateur à -80°C jusqu'à qu'ils soient entièrement congelés : 40 min minimum pour 10 mL
- Placer les tubes congelés au lyophilisateur pendant 24 à 48 h : jusqu'à obtention de paillettes.
- Pour une utilisation ultérieure des lyophilisat, congeler les Falcons à -20°C ou dans des tubes de conservation.

## 8. Cinétique d'extraction du fer de déchets amiantés par les pyoverdines

<u>Objectif</u>: Suivre l'extraction du fer lors de l'altération des déchets amiantés par les pyoverdines.

Mode opératoire :

- Ajouter 20 mL de surnageant de culture contenant 100 μM de pyoverdine à 0,2 g d'échantillons d'amiante lavé
- Incubation à 30°C à 220 rpm
- Prélèvement de 400 µL à 1, 2, 4, 6, 8, 24 h pour les déchets de flocage et à 0, 2, 4, 8, 12 et 24 h pour les déchets de fibrociment
- Filtration des prélèvements avec un filtre Millex (0,22 μm)
- Dosage du fer des prélèvements filtrés

## 9. Cycles d'altération des déchets amiantés en présence de pyovedines

<u>Objectif</u>: Effectuer des cycles d'altération en présence de pyoverdines afin d'extraire le fer et le magnésium de déchets amiantés.

Mode opératoire :

A chaque cycle de 24, 48 et 96 h :

- Ajouter 20 mL de surnageant de culture contenant 100 μM de pyoverdine à 0,2 g d'échantillons d'amiante lavés
- Incubation à 30°C à 220 rpm

- Après 24, 48 ou 96 h, centrifugation 30 min à 9871 g
- Filtration du surnageant avec un filtre Millex (0,22 µm)
- Dosage du fer, du magnésium, de la pyoverdine et mesure du pH

<u>Remarques</u>: Le même protocole est effectué pour étudier l'effet de la concentration en pyoverdine (25, 50, 100, 150 et 200  $\mu$ M) sur l'altération des déchets amiantés.

### 10. Dépendance des bactéries au magnésium

<u>Objectif</u>: Déterminer la dépendance des bactéries au magnésium en effectuant des courbes de croissance de différentes souches de *Pseudomonas* dans un milieu de culture contenant différentes concentrations de magnésium.

#### Mode opératoire :

- Décongélation de la souche de Pseudomonas fluorescent en milieu LB pendant environ 24 h à 30°C
- Lavage des cultures :
  - Prélèvement de 1 mL de culture
  - Centrifugation 3 min à 9871 g
  - Eliminer le surnageant, incorporer 1 mL de milieu succinate sans magnésium concentré 2X (Succ-Mg 2X) et vortexer
  - Centrifugation 3 min à 9871 g
  - Eliminer le surnageant, incorporer 1 mL de Succ-Mg 2X et vortexer
  - Centrifugation 3 min à 9871 g
  - Eliminer le surnageant, incorporer 1 mL de Succ-Mg 2X et vortexer
- Mesurer la DO à 600 nm en diluant au 1/10
- Ajuster la DO pour avoir 10 mL de culture à DO 0,1
- Distribution dans une plaque 96 puits des solutions suivantes :

Succinate-Mg 2X (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100
H20 (μL)	80	70	70	70	60	40	70	40
		Solution mère 0,1 mg/L	Solution mère 1 mg/L	Solution mère 10 mg/L			Solution mère 100 mg/L	
MgSO4, 7H2O (μL)	0	10	10	10	20	40	10	40
Bactérie (µL)	20	20	20	20	20	20	20	20
Volume total (µL)	200	200	200	200	200	200	200	200
Concentration finale en MgSO4, 7H2O mg/L	0	0,005	0,05	0,5	1	2	5	20

- Incubation de la plaque dans un lecteur de plaque Infinite M200 Tecan avec le programme suivant :
  - Température : 30°C
  - Amplitude : 4,5 mm Fréquence : 34,4 rpm
  - Durée incubation : 40 h
  - Suivi croissance : lecture DO à 600nm
  - Production pyoverdine : lecture DO à 400 nm
  - Fluorescence PVD : excitation 400 nm ; émission 450 nm ; gain 45

## 11. Cinétique d'altération des déchets amiantés en présence des *Pseudomonas*

<u>Objectif</u>: Suivre la croissance, la production de pyoverdine et l'extraction de fer et de magnésium lors de l'altération de déchets amiantés par les *Pseudomonas*.

Mode opératoire :

#### Cycle de lavage des échantillons d'amiante, à chaque cycle de 24 h :

- Ajouter 20 mL de milieu de culture et vortexer
- Centrifugation 30 min à 9871 g
- Filtration du surnageant à l'aide d'un filtre Millex (0,22 μm)
- Dosage du fer et du magnésium

#### Inoculation bactérie-amiante T0 :



#### Suivi de croissance durant la cinétique:

- Aux temps 0, 4, 8, 12 et 24 h, prélèvement de 100 µL
- Cascade de dilution et étalement sur boîte pour dénombrement

#### Suivi de la production de pyoverdine, de l'extraction de fer et de magnésium:

- Aux temps 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h, prélèvement de 400 μL
- Filtration à l'aide d'un filtre Millex (0,22 μm)
- Mettre 100 µl dans une plaque 96 puits
- Dosage pyoverdine :
  - Lecture DO à 400 nm
  - Fluorescence PVD : excitation 400 nm ; émission 450 nm ; gain 45
- Dosage du fer et du magnésium

#### Après 24 h de culture :



## 12. Cycles d'altération des déchets amiantés en présence des *Pseudomonas*

<u>Objectif</u>: Effectuer des cycles d'altération en présence de *Pseudomonas mandelii* SB8.3 afin d'extraire le fer et le magnésium de déchets amiantés.

Mode opératoire :

#### Inoculation bactérie-amiante T0 :



#### A chaque cycle de 24 h de culture :

- Suivi de la croissance
  - Prélèvement de 100 µL
  - Cascade de dilution et étalement sur boîte pour dénombrement
- Les étapes suivantes sont ensuite effectuées :



## 13. Suivi de l'expression des voies sidérophores en présence de déchets amiantés

<u>Objectif</u>: Suivre l'expression des voies de biosynthèse de la pyoverdine et de la pyochéline en présence de déchets amiantés.

#### Mode opératoire :

- Souches utilisées :
  - P. aeruginosa PvdJ-mcherry : Protéine de biosynthèse de la pyoverdine
  - P. aeruginosa PchA-mcherry : Protéine de biosynthèse de la pyochéline
- Les étapes suivantes ont été effectuées :



- Après incubation, mettre 100 µl dans une plaque 96 puits
- Lecture mcherry : excitation 570 nm ; émission 610 nm

<u>Remarques</u>: Ces expériences ont été effectuées par Sarah Fritsch lors de son stage de M2 pour les déchets de chrysotile-gypse et lors du stage de M1 d'Agathe Jaouen pour les déchets de fibrociment.

## 14. Influence des mutants pyoverdine, pyochéline et du double mutant dans l'altération de déchets amiantés

<u>Objectif</u>: Suivre l'altération de déchets amiantés en présence de souches de *P. aeruginosa* mutées dans la voie pyoverdine, pyochéline ou dans les deux voies afin d'étudier l'influence de ces voies dans l'extraction de fer et de magnésium de ces déchets.

#### Mode opératoire :

- Souches utilisées :
  - *P. aeruginosa* WT : Souche sauvage
  - *P. aeruginosa*  $\Delta$ PVD : Souche incapable de produire de la pyoverdine
  - *P. aeruginosa*  $\Delta$ PCH : Souche incapable de produire de la pyochéline
  - *P. aeruginosa* ΔPVDΔPCH : Souche incapable de produire de la pyoverdine et de la pyochéline
- Les étapes suivantes ont été effectuées :



#### Après 40 h de culture :

- Suivi de la croissance
  - Prélèvement de 100 µL
  - Cascade de dilution et étalement sur boîte pour dénombrement
- Les étapes suivantes sont ensuite effectuées :



## 15. Comparaison d'altération du milieu succinate et CAA

Objectif : Comparer l'impact du milieu succinate et CAA sur l'altération du chrysotile-gypse.

Mode opératoire :

- 20 mL de milieu Succ-Mg ou CAA-mg + 0,2 g de chrysotile-gypse
- Incubation à 30°C et 220 rpm

#### Après chaque cycle de 24 h d'incubation :

- Ajouter 20 mL de milieu Succ-Mg ou CAA-mg et vortexer
- Centrifugation 30 min à 9871 g
- Filtration du surnageant à l'aide d'un filtre Millex (0,22 μm)
- Mesure du pH et dosage du fer et du magnésium

### 16. Préparation des solutions d'acides organiques

Objectif: Préparer les solutions d'acides organiques.

Mode opératoire :

- Filtration du jus de choucroute et du petit lait :
  - papier Whatman ; 3 filtres et 2 à 3 fois selon la viscosité
  - papier nitrocellulose ; 1 filtres et 2 à 3 fois selon la viscosité
- Mesurer le pH
- Filtration stérile 0,22 μm

## 17. Cinétique d'altération de déchets amiantés en présence de jus de choucroute et de petit lait

<u>Objectif</u>: Comparer l'efficacité d'altération de déchets amiantés par du jus de choucroute et du petit lait.

Mode opératoire :

- Ajouter 20 mL De jus de choucroute et de petit lait à 0,2 g d'échantillons d'amiante
- Incubation à 30°C à 220 rpm
- Prélèvement de 400 µL à 24, 48 et 96 h
- Filtration des prélèvements avec un filtre Millex (0,22 μm)
- Dosage du fer, du magnésium des prélèvements et mesure du pH à la fin de la cinétique

## 18. Cycles d'altération de déchets amiantés en présence de jus de choucroute et de petit lait

<u>Objectif</u>: Effectuer des cycles d'altération en présence de jus de choucroute ou de petit lait afin d'extraire le fer et le magnésium de déchets amiantés.

#### Mode opératoire :

A chaque cycle de 24 et 96 h :

- Ajouter 20 mL de jus de choucroute ou de petit lait à 0,2 g d'échantillons d'amiante
- Incubation à 30°C à 220 rpm
- Après 24 ou 96 h, centrifugation 30 min à 9871 g

- Filtration du surnageant avec un filtre Millex (0,22 μm)
- Dosage du fer, du magnésium et mesure du pH

## **19.** Cinétiques d'altération de déchets amiantés en présence de petit lait avec ou sans ajout de *Lactobacillus plantarum*

<u>Objectif</u>: Comparer l'efficacité d'altération de déchets amiantés en présence de petit lait avec ou sans ajout de *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.

Mode opératoire : 30°C/ 24H -80°C Centrifugation 2 lavages Remise en suspension du culot L. plantarum 5 min/9871 g petit lait 5ml dans 10 mL de petit lait 20 mL MRS Diluer au 1/10 en petit lait pour mesurer DO 600 puis т0 aiuster la DO à 1 2mL de culture 20mL de petit lait DO 1 18mL de petit lait 🗲 0,2g amiante 0,2g amiante Incubation à 30°C à 220 rpm

- Prélèvement de 400 µL à 24, 48, 72 et 96 h
- Filtration des prélèvements avec un filtre Millex (0,22 μm)
- Dosage du fer, du magnésium des prélèvements et mesure du pH à la fin de la cinétique

## 20. Cycles d'altération de déchets amiantés en présence de petit lait avec ajout de *Lactobacillus plantarum*

<u>Objectif</u>: Effectuer des cycles d'altération de déchets amiantés en présence de petit lait avec ajout de *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.

Mode opératoire :



A chaque cycle de 72 h de culture, on effectue les étapes suivantes :



<u>Remarques</u>: après un cycle de 72 h, les acides organiques produits lors de l'altération des déchets amiantés ont été quantifiés par le centre de ressources technologiques AERIAL en utilisant la technique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

# Bibliographie

- Ahmed, E. and Holmström, S.J.M. (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol* **7**: 196–208.
- Altendorf, K. and Epstein, W. (1996) The Kdp-ATPase of Escherichia coli. In, Lee, A.G. (ed), *Biomembranes: A Multi-Volume Treatise*, ATPases. JAI, pp. 403–420.
- Alteri, C.J., Lindner, J.R., Reiss, D.J., Smith, S.N., and Mobley, H.L.T. (2011) The broadly conserved regulator PhoP links pathogen virulence and membrane potential in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **82**: 145–163.
- Amiante Fiche toxicologique n°145 INRS (2018).
- Amouzou, K.-S., Prevost, H., and Divies, C. (1985) Influence de la supplémentation du lait en magnésium sur la fermentation lactique réalisée par S. lactis et S. thermophilus. Le Lait 65: 21–34.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodríguez-Quiñones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27: 215–237.
- Aouad, G., Crovisier, J.-L., Damidot, D., Stille, P., Hutchens, E., Mutterer, J., et al. (2008) Interactions between municipal solid waste incinerator bottom ash and bacteria (Pseudomonas aeruginosa). *Sci Total Environ* **393**: 385–393.
- Arhin, A. and Boucher, C. (2010) The outer membrane protein OprQ and adherence of Pseudomonas aeruginosa to human fibronectin. *Microbiology* **156**: 1415–1423.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., and Höfte, M. (2002) Induction of Systemic Resistance to Botrytis cinerea in Tomato by Pseudomonas aeruginosa 7NSK2: Role of Salicylic Acid, Pyochelin, and Pyocyanin. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 1147–1156.
- Aznar, A. and Dellagi, A. (2015) New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *J Exp Bot* **66**: 3001–3010.
- Balducci, G., Foresti, E., Lelli, M., Lesci, I.G., Marchetti, M., Pierini, F., and Roveri, N. (2012) Process for treating an asbestos containing material.
- Barker, K.D., Barkovits, K., and Wilks, A. (2012) Metabolic Flux of Extracellular Heme Uptake in Pseudomonas aeruginosa Is Driven by the Iron-regulated Heme Oxygenase (HemO). *J Biol Chem* 287: 18342–18350.
- Bastiaansen, K.C., Otero-Asman, J.R., Luirink, J., Bitter, W., and Llamas, M.A. (2015) Processing of cell-surface signalling anti-sigma factors prior to signal recognition is a conserved autoproteolytic mechanism that produces two functional domains. *Environ Microbiol* 17: 3263–3277.
- Bernstein, D., Dunnigan, J., Hesterberg, T., Brown, R., Velasco, J.A.L., Barrera, R., et al. (2013) Health risk of chrysotile revisited. *Crit Rev Toxicol* **43**: 154–183.
- Berti, A.D. and Thomas, M.G. (2009) Analysis of Achromobactin Biosynthesis by Pseudomonas syringae pv. syringae B728a. *J Bacteriol* **191**: 4594–4604.
- Bhakta, M.N. and Wilks, A. (2006) The Mechanism of Heme Transfer from the Cytoplasmic Heme Binding Protein PhuS to the δ-Regioselective Heme Oxygenase of Pseudomonas aeruginosa. *Biochemistry* 45: 11642–11649.
- Bhattacharya, S., John, P.J., and Ledwani, L. (2015) Bacterial Weathering of Asbestos. *Silicon* 7: 419–431.
- Bhattacharya, S., John, P.J., and Ledwani, L. (2016) Fungal weathering of asbestos in semi arid regions of India. *Ecotoxicol Environ Saf* **124**: 186–192.
- Bhattacharya, S., Ledwani, L., and John, P.J. (2016) Siderophores, the answer for micro to

nanosized asbestos fibre related health hazard. AIP Conf Proc 1724: 020102.

Bordebeure, S. (2017) Déchets Amiantés, ADEME.

- Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., and Albrecht-Gary, A.-M. (2012) Pyochelin, a siderophore of Pseudomonas aeruginosa: Physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton Trans* 41: 2820–2834.
- Brankovic, S.R., Glisic, R.M., Dekic, V.R., and Marin, M.A. (2015) Metal accumulation and tolerance of selected plants of asbestos tailings (Stragari). *Hem Ind* 313.
- Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2009) The Pseudomonas aeruginosa Pyochelin-Iron Uptake Pathway and Its Metal Specificity. *J Bacteriol* 191: 3517–3525.
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., and Schalk, I.J. (2009) New insights into the metal specificity of the Pseudomonas aeruginosa pyoverdine–iron uptake pathway. *Environ Microbiol* **11**: 1079–1091.
- Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S., and Lebeau, T. (2009) Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* **74**: 280–286.
- Braun, V. and Killmann, H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* 24: 104–109.
- Brillet, K., Journet, L., Célia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F., and Cobessi, D. (2007) A β Strand Lock Exchange for Signal Transduction in TonB-Dependent Transducers on the Basis of a Common Structural Motif. *Structure* 15: 1383–1391.
- Brillet, K., Ruffenach, F., Adams, H., Journet, L., Gasser, V., Hoegy, F., et al. (2012) An ABC Transporter with Two Periplasmic Binding Proteins Involved in Iron Acquisition in Pseudomonas aeruginosa. ACS Chem Biol 7: 2036–2045.
- Briskot, G., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (1989) Bacterial Constituents, XXXVII. Pyoverdin-Type Siderophores from Pseudomonas aeruginosa. *Liebigs Ann Chem* **1989**: 375–384.
- Britigan, B.E., Rasmussen, G.T., and Cox, C.D. (1997) Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the Pseudomonas aeruginosa siderophore pyochelin. *Infect Immun* **65**: 1071–1076.
- Bryn Pinzgauer Flickr, And they call it a mine!, https://www.flickr.com/photos/12394349@ N06/9614949716/.
- Budzikiewicz, H., Schröder, H., and Taraz, K. (2014) Zur Biogenese der Pseudomonas-Siderophore: Der Nachweis analoger Strukturen eines Pyoverdin-Desferriferribactin-Paares. *Z Für Naturforschung C* **47**: 26–32.
- Cartron, M.L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C.J., and Andrews, S.C. (2006) Feo Transport of Ferrous Iron into Bacteria. *Biometals* 19: 143–157.
- Chan, Y.M., Agamuthu, P., and Mahalingam, R. (2004) Solidification and Stabilization of Asbestos Brake Lining Dust Using Polymeric Resins. *Environ Eng Sci* **17**: 203–213.
- Chan, Y.M., Agamuthu, P., and Mahalingam, R. (2000) Solidification and stabilization of asbestos waste from an automobile brake manufacturing facility using cement. J Hazard Mater 77: 209–226.
- Chao, C.C. and Aust, A.E. (1994) Effect of Long-Term Removal of Iron from Asbestos by

Desferrioxamine B on Subsequent Mobilization by Other Chelators and Induction of DNA Single-Strand Breaks. *Arch Biochem Biophys* **308**: 64–69.

- Chardot-Jacques, V., Calvaruso, C., Simon, B., Turpault, M.-P., Echevarria, G., and Morel,
   J.-L. (2013) Chrysotile Dissolution in the Rhizosphere of the Nickel
   Hyperaccumulator Leptoplax emarginata. *Environ Sci Technol* 47: 2612–2620.
- Chateau, L. (2015) Neutralisation des dangers inhérents aux déchets d'amiantes et perspectives de valorisation Projet VALMIANTE 2, ADEME, SOMEZ, CNRS.
- Choi, I. and Smith, R.W. (1972) Kinetic study of dissolution of asbestos fibers in water. J Colloid Interface Sci 40: 253–262.
- Christensen, S.N. (2004) Epilithic lichen vegetation of corrugated asbestos-cement roof tiles in the Copenhagen area. *Graph Scr* **15**: 7–13.
- Clevenger, K.D., Mascarenhas, R., Catlin, D., Wu, R., Kelleher, N.L., Drake, E.J., et al. (2017) Substrate Trapping in the Siderophore Tailoring Enzyme PvdQ. *ACS Chem Biol* **12**: 643–647.
- Cobessi, D., Celia, H., Folschweiller, N., Schalk, I.J., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2005) The Crystal Structure of the Pyoverdine Outer Membrane Receptor FpvA from Pseudomonas aeruginosa at 3.6Å Resolution. *J Mol Biol* **347**: 121–134.
- Cobessi, D., Celia, H., and Pattus, F. (2005) Crystal Structure at High Resolution of Ferricpyochelin and its Membrane Receptor FptA from Pseudomonas aeruginosa. *J Mol Biol* **352**: 893–904.
- Coffey, B.M., Akhand, S.S., and Anderson, G.G. (2014) MgtE is a dual-function protein in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* **160**: 1200–1213.
- Conway, T.M. and John, S.G. (2014) Quantification of dissolved iron sources to the North Atlantic Ocean. *Nature* **511**: 212–215.
- Cornelis, P. (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1637–1645.
- Cornelis, P. and Bodilis, J. (2009) A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environ Microbiol Rep* 1: 256–262.
- Cornelis, P. and Dingemans, J. (2013) Pseudomonas aeruginosa adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 75.
- Cornell, R.M. and Schwertmann, U. (2003) The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses, John Wiley & Sons.
- Cox, C.D., Rinehart, K.L., Moore, M.L., and Cook, J.C. (1981) Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci* 78: 4256–4260.
- Cromie, M.J. and Groisman, E.A. (2010) Promoter and Riboswitch Control of the Mg2+ Transporter MgtA from Salmonella enterica. *J Bacteriol* **192**: 604–607.
- Cromie, M.J., Shi, Y., Latifi, T., and Groisman, E.A. (2006) An RNA Sensor for Intracellular Mg2+. *Cell* **125**: 71–84.
- Cuív, P.Ó., Clarke, P., and O'Connell, M. (2006) Identification and characterization of an iron-regulated gene, chtA, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* 152: 945–954.
- Cunliffe, H.E., Merriman, T.R., and Lamont, I.L. (1995) Cloning and characterization of

pvdS, a gene required for pyoverdine synthesis in Pseudomonas aeruginosa: PvdS is probably an alternative sigma factor. *J Bacteriol* **177**: 2744–2750.

- Cunrath, O., Gasser, V., Hoegy, F., Reimmann, C., Guillon, L., and Schalk, I.J. (2015) A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in Pseudomonas aeruginosa. *Environ Microbiol* 17: 171–185.
- Cvetkovic, A., Menon, A.L., Thorgersen, M.P., Scott, J.W., Poole Ii, F.L., Jenney Jr, F.E., et al. (2010) Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized. *Nature* **466**: 779–782.
- Dabboussi, F., Hamze, M., Singer, E., Geoffroy, V., Meyer, J.-M., and Izard, D. (2002) Pseudomonas mosselii sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. *Int J* Syst Evol Microbiol 52: 363–376.
- Daghino, S., Martino, E., Fenoglio, I., Tomatis, M., Perotto, S., and Fubini, B. (2005) Inorganic Materials and Living Organisms: Surface Modifications and Fungal Responses to Various Asbestos Forms. *Chem – Eur J* 11: 5611–5618.
- Daghino, S., Martino, E., and Perotto, S. (2010) Fungal weathering and implications in the solubilization of metals from soil and from asbestos fiber. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol* **1**: 329–338.
- Daghino, S., Martino, E., Vurro, E., Tomatis, M., Girlanda, M., Fubini, B., and Perotto, S. (2008) Bioweathering of chrysotile by fungi isolated in ophiolitic sites. *FEMS Microbiol Lett* 285: 242–249.
- Daghino, S., Turci, F., Tomatis, M., Favier, A., Perotto, S., Douki, T., and Fubini, B. (2006) Soil Fungi Reduce the Iron Content and the DNA Damaging Effects of Asbestos Fibers. *Environ Sci Technol* 40: 5793–5798.
- Daghino, S., Turci, F., Tomatis, M., Girlanda, M., Fubini, B., and Perotto, S. (2009) Weathering of chrysotile asbestos by the serpentine rock-inhabiting fungus Verticillium leptobactrum. *FEMS Microbiol Ecol* **69**: 132–141.
- Damien, A. (2016) Guide du traitement des déchets 7e éd.: Réglementation et choix des procédés, Dunod.
- Dann, C.E., Wakeman, C.A., Sieling, C.L., Baker, S.C., Irnov, I., and Winkler, W.C. (2007) Structure and Mechanism of a Metal-Sensing Regulatory RNA. *Cell* **130**: 878–892.
- Dériot, G. and Godefroy, J.-P. (2005) Le drame de l'amiante en France, Sénat.
- Dong, H. and Lu, A. (2012) Mineral–Microbe Interactions and Implications for Remediation. *Elements* **8**: 95–100.
- Douguet, D., Carteron, H., Janiaud, P., and Pinhas, N. (1997) Effets sur la santé des principaux types d'exposition à l'amiante, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM).
- Drake, E.J., Cao, J., Qu, J., Shah, M.B., Straubinger, R.M., and Gulick, A.M. (2007) The 1.8 Å Crystal Structure of PA2412, an MbtH-like Protein from the Pyoverdine Cluster of Pseudomonas aeruginosa. *J Biol Chem* **282**: 20425–20434.
- Draper, R.C., Martin, L.W., Beare, P.A., and Lamont, I.L. (2011) Differential proteolysis of sigma regulators controls cell-surface signalling in Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol* 82: 1444–1453.
- Edgar, R.J., Hampton, G.E., Garcia, G.P.C., Maher, M.J., Perugini, M.A., Ackerley, D.F., and Lamont, I.L. (2017) Integrated activities of two alternative sigma factors coordinate

iron acquisition and uptake by Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol* **106**: 891–904.

- Elhosary, M.A., Bahey-El-Din, M., AbdelBary, A., El Guink, N., and Aboushleib, H.M. (2019) Immunization with the ferric iron-binding periplasmic protein HitA provides protection against Pseudomonas aeruginosa in the murine infection model. *Microb Pathog* 131: 181–185.
- Elias, S., Degtyar, E., and Banin, E. (2011) FvbA is required for vibriobactin utilization in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* **157**: 2172–2180.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J., and de Lorenzo, V. (1999) Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *J Bacteriol* **181**: 6223–6229.
- Favero-Longo, S., Siniscalco, C., and Piervittori, R. (2006) Plant and lichen colonization in an asbestos mine: Spontaneous bioattenuation limits air dispersion of fibres. *Plant Biosyst* 140: 190–205.
- Favero-Longo, S.E., Castelli, D., Fubini, B., and Piervittori, R. (2009) Lichens on asbestos– cement roofs: Bioweathering and biocovering effects. J Hazard Mater 162: 1300– 1308.
- Favero-Longo, S.E., Girlanda, M., Honegger, R., Fubini, B., and Piervittori, R. (2007) Interactions of sterile-cultured lichen-forming ascomycetes with asbestos fibres. *Mycol Res* 111: 473–481.
- Favero-Longo, S.E., Turci, F., Tomatis, M., Castelli, D., Bonfante, P., Hochella, M.F., et al. (2005) Chrysotile asbestos is progressively converted into a non-fibrous amorphous material by the chelating action of lichen metabolites. *J Environ Monit* 7: 764–766.
- Feinbaum, R.L., Urbach, J.M., Liberati, N.T., Djonovic, S., Adonizio, A., Carvunis, A.-R., and Ausubel, F.M. (2012) Genome-Wide Identification of Pseudomonas aeruginosa Virulence-Related Genes Using a Caenorhabditis elegans Infection Model. *PLOS Pathog* 8: e1002813.
- Felnagle, E.A., Barkei, J.J., Park, H., Podevels, A.M., McMahon, M.D., Drott, D.W., and Thomas, M.G. (2010) MbtH-Like Proteins as Integral Components of Bacterial Nonribosomal Peptide Synthetases. *Biochemistry* 49: 8815–8817.
- Ferret, C., Sterckeman, T., Cornu, J.-Y., Gangloff, S., Schalk, I.J., and Geoffroy, V.A. (2014) Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent Pseudomonas. *Environ Microbiol Rep* 6: 459–467.
- Fillat, M.F. (2014) The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys* **546**: 41–52.
- Fournier, C., Smith, A., and Delepelaire, P. (2011) Haem release from haemopexin by HxuA allows Haemophilus influenzae to escape host nutritional immunity. *Mol Microbiol* 1: 133–148.
- Franza, T., Mahé, B., and Expert, D. (2005) Erwinia chrysanthemi requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol Microbiol* 55: 261–275.
- Fuchs, R., Schafer, M., Geoffroy, V., and Meyer, J.-M. (2001) Siderotyping A Powerful Tool for the Characterization of Pyoverdines. *Curr Top Med Chem* 1: 31–57.
- Gadd, G.M. (2017) Geomicrobiology of the built environment. Nat Microbiol 2: 16275.
- Gadd, G.M. (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals

and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycol Res 111: 3-49.

- Gadd, G.M. (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* **156**: 609–643.
- Gaille, C., Kast, P., and Haas, D. (2002) Salicylate biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. Purification and characterization of PchB, a novel bifunctional enzyme displaying isochorismate pyruvate-lyase and chorismate mutase activities. J Biol Chem 277: 21768–21775.
- Gaille, C., Reimmann, C., and Haas, D. (2003) Isochorismate Synthase (PchA), the First and Rate-limiting Enzyme in Salicylate Biosynthesis of Pseudomonas aeruginosa. *J Biol Chem* **278**: 16893–16898.
- Ganne, G., Brillet, K., Basta, B., Roche, B., Hoegy, F., Gasser, V., and Schalk, I.J. (2017) Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chem Biol* **12**: 1056–1065.
- Gasser, V., Guillon, L., Cunrath, O., and Schalk, Isabelle.J. (2015) Cellular organization of siderophore biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa: Evidence for siderosomes. J Inorg Biochem 148: 27–34.
- Gautier, A.L., Monfort-Climent, D., Lahondere, D., and Michel, P. (2017) Recueil de données chiffrées sur les gisements de déchets d'amiante au regard des filières de traitement disponibles, BRGM.
- Givry, S. and Duchiro, F. (2008) Optimization of culture medium and growth conditions for production of L-arabinose isomerase and D-xylose isomerase by Lactobacillus bifermentans. *Mikrobiologiia* 77: 324–330.
- Gold J, Amandusson H, Krozer A, Kasemo B, Ericsson T, Zanetti G, and Fubini B (1997) Chemical characterization and reactivity of iron chelator-treated amphibole asbestos. *Environ Health Perspect* **105**: 1021–1030.
- Gorbushina, A.A. (2007) Life on the rocks. Environ Microbiol 9: 1613–1631.
- Gosen, B.S.V. (2007) The Geology of Asbestos in the United States and Its Practical Applications. *Environ Eng Geosci* 13: 55–68.
- Greenwald, J., Nader, M., Celia, H., Gruffaz, C., Geoffroy, V., Meyer, J.-M., et al. (2009) FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter. *Mol Microbiol* 72: 1246–1259.
- Groisman, E.A., Hollands, K., Kriner, M.A., Lee, E.-J., Park, S.-Y., and Pontes, M.H. (2013) Bacterial Mg2+ Homeostasis, Transport, and Virulence. *Annu Rev Genet* **47**: 625–646.
- Gronow, J.R. (1987) The dissolution of asbestos fibres in water. Clay Miner 22: 21-35.
- Gross, H. and Loper, J.E. (2009) Genomics of secondary metabolite production by Pseudomonas spp. *Nat Prod Rep* **26**: 1408–1446.
- Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G.L.A., Shanzer, A., and Schalk, I.J. (2010) The Ferrichrome Uptake Pathway in Pseudomonas aeruginosa Involves an Iron Release Mechanism with Acylation of the Siderophore and Recycling of the Modified Desferrichrome. *J Bacteriol* 192: 1212–1220.
- Hannauer, M., Braud, A., Hoegy, F., Ronot, P., Boos, A., and Schalk, I.J. (2012) The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa. *Environ Microbiol* 14: 1696–1708.

- Hannauer, M., Schäfer, M., Hoegy, F., Gizzi, P., Wehrung, P., Mislin, G.L.A., et al. (2012) Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of Pseudomonas aeruginosa involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain. *FEBS Lett* **586**: 96–101.
- Hannauer, M., Yeterian, E., Martin, L.W., Lamont, I.L., and Schalk, I.J. (2010) An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by Pseudomonas aeruginosa. *FEBS Lett* **584**: 4751–4755.

Hantke, K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. Curr Opin Microbiol 4: 172-177.

- Hardy, J.A. and Aust, A.E. (1995) The effect of iron binding on the ability of crocidolite asbestos to catalyze DNA single-strand breaks. *Carcinogenesis* 16: 319–325.
- Heinrichs, D.E. and Poole, K. (1993) Cloning and sequence analysis of a gene (pchR) encoding an AraC family activator of pyochelin and ferripyochelin receptor synthesis in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **175**: 5882–5889.
- Hersman, L.E., Forsythe, J.H., Ticknor, L.O., and Maurice, P.A. (2001) Growth of Pseudomonas mendocina on Fe(III) (Hydr)Oxides. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4448–4453.
- Hider, R.C. and Kong, X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 27: 637–657.
- Hiradate, S. and Inoue, K. (1998) Dissolution of iron from iron (Hydr)Oxides by mugineic acid. *Soil Sci Plant Nutr* **44**: 305–313.
- Ho, C.-P., Hseu, Z.-Y., Chen, N.-C., and Tsai, C.-C. (2012) Evaluating heavy metal concentration of plants on a serpentine site for phytoremediation applications. *Environ Earth Sci* **70**: 191–199.
- Ho, W.W., Li, H., Eakanunkul, S., Tong, Y., Wilks, A., Guo, M., and Poulos, T.L. (2007)
   Holo- and Apo-bound Structures of Bacterial Periplasmic Heme-binding Proteins. J Biol Chem 282: 35796–35802.
- Hoegy, F., Lee, X., Noel, S., Rognan, D., Mislin, G.L.A., Reimmann, C., and Schalk, I.J. (2009) Stereospecificity of the Siderophore Pyochelin Outer Membrane Transporters in Fluorescent Pseudomonads. *J Biol Chem* 284: 14949–14957.
- Hohlneicher, U., Hartmann, R., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (2014) Pyoverdin, Ferribactin, Azotobactin - a New Triade of Siderophores from Pseudomonas chlororaphis ATCC 9446 and Its Relation to Pseudomonas fluorescens ATCC 13525. Z Für Naturforschung C 50: 337–344.
- Hollands, K., Proshkin, S., Sklyarova, S., Epshtein, V., Mironov, A., Nudler, E., and Groisman, E.A. (2012) Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination. *Proc Natl Acad Sci* 109: 5376–5381.
- Imperi, F., Tiburzi, F., and Visca, P. (2009) Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 20440–20445.
- Imperi, F. and Visca, P. (2013) Subcellular localization of the pyoverdine biogenesis machinery of Pseudomonas aeruginosa: A membrane-associated "siderosome." FEBS Lett 587: 3387–3391.
- Inertam, la solution de destruction définitive des déchets d'amiante Inertam.
- Jones, A.M., Lindow, S.E., and Wildermuth, M.C. (2007) Salicylic Acid, Yersiniabactin, and Pyoverdin Production by the Model Phytopathogen Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000: Synthesis, Regulation, and Impact on Tomato and Arabidopsis Host Plants. J

Bacteriol 189: 6773-6786.

- Jülich, M., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Geoffroy, V., Meyer, J.-M., and Gardan, L. (2014) The Structure of the Pyoverdin Isolated from Various Pseudomonas syringae Pathovars. Z Für Naturforschung C 56: 687–694.
- Kamp, D.W., Israbian, V.A., Yeldandi, A.V., Panos, R.J., Graceffa, P., and Weitzman, S.A. (1995) Phytic Acid, an Iron Chelator, Attenuates Pulmonary Inflammation and Fibrosis in Rats after Intratracheal Instillation of Asbestos. *Toxicol Pathol* 23: 689– 695.
- Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., Vladykovskaya, E.N., and Hiramatsu, M. (2000) Protective Effects of Green Tea Catechins against Asbestos-Induced Cell Injury. *Planta Med* **66**: 762–764.
- Kraemer, S.M. (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci* **66**: 3–18.
- Kumar, A. and Maiti, S.K. (2014) Translocation and bioaccumulation of metals in Oryza sativa and Zea mays growing in chromite-asbestos contaminated agricultural fields, Jharkhand, India. *Bull Environ Contam Toxicol* 93: 434–441.
- Lahondère, D., Misseri, M., and Roy, X. (2014) Comprendre l'amiante par la géologie. *RGRA* 4–8.
- Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002) Siderophoremediated signaling regulates virulence factor production in Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci* 99: 7072–7077.
- Lamont, I.L. and Martin, L.W. (2003) Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* **149**: 833–842.
- Lansky, I.B., Lukat-Rodgers, G.S., Block, D., Rodgers, K.R., Ratliff, M., and Wilks, A. (2006) The Cytoplasmic Heme-binding Protein (PhuS) from the Heme Uptake System of Pseudomonas aeruginosa Is an Intracellular Heme-trafficking Protein to the δ-Regioselective Heme Oxygenase. *J Biol Chem* 281: 13652–13662.
- Lasat, M.M. (2002) Phytoextraction of Toxic Metals. J Environ Qual 31: 109–120.
- Lazo, D.E., Dyer, L.G., and Alorro, R.D. (2017) Silicate, phosphate and carbonate mineral dissolution behaviour in the presence of organic acids: A review. *Miner Eng* 100: 115–123.
- Leach, L.H., Morris, J.C., and Lewis, T.A. (2007) The role of the siderophore pyridine-2,6-bis (thiocarboxylic acid) (PDTC) in zinc utilization by Pseudomonas putida DSM 3601. *BioMetals* **20**: 717–726.
- Lebeau, T., Braud, A., and Jézéquel, K. (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environ Pollut* **153**: 497–522.
- Létoffé, S., Nato, F., Goldberg, M.E., and Wandersman, C. (1999) Interactions of HasA, a bacterial haemophore, with haemoglobin and with its outer membrane receptor HasR. *Mol Microbiol* **33**: 546–555.
- Lew, L.-C., Liong, M.-T., and Gan, C.-Y. (2013) Growth optimization of Lactobacillus rhamnosus FTDC 8313 and the production of putative dermal bioactives in the presence of manganese and magnesium ions. *J Appl Microbiol* **114**: 526–535.
- Lewis, T.A., Leach, L., Morales, S., Austin, P.R., Hartwell, H.J., Kaplan, B., et al. (2004)

Physiological and molecular genetic evaluation of the dechlorination agent, pyridine-2,6-bis(monothiocarboxylic acid) (PDTC) as a secondary siderophore of Pseudomonas. *Environ Microbiol* **6**: 159–169.

- Li, K., Xu, C., Jin, Y., Sun, Z., Liu, C., Shi, J., et al. (2013) SuhB Is a Regulator of Multiple Virulence Genes and Essential for Pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa. *mBio* **4**: e00419-13.
- Llamas, M.A., Imperi, F., Visca, P., and Lamont, I.L. (2014) Cell-surface signaling in Pseudomonas: stress responses, iron transport, and pathogenicity. *FEMS Microbiol Rev* 38: 569–597.
- Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Ratledge, C., and Bitter, W. (2008) Characterization of five novel Pseudomonas aeruginosa cell-surface signalling systems. *Mol Microbiol* 67: 458–472.
- Llamas, M.A., Sparrius, M., Kloet, R., Jiménez, C.R., Vandenbroucke-Grauls, C., and Bitter,
   W. (2006) The Heterologous Siderophores Ferrioxamine B and Ferrichrome Activate
   Signaling Pathways in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 188: 1882–1891.
- Macfarlane, E.L.A., Kwasnicka, A., Ochs, M.M., and Hancock, R.E.W. (1999) PhoP–PhoQ homologues in Pseudomonas aeruginosa regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol Microbiol* **34**: 305–316.
- Mapelli, F., Marasco, R., Balloi, A., Rolli, E., Cappitelli, F., Daffonchio, D., and Borin, S. (2012) Mineral-microbe interactions: Biotechnological potential of bioweathering. J Biotechnol 157: 473–481.
- Martin, A.K., Johnson, G.C., McCarthy, D.F., and Filson, R.B. (1992) Attempts to control lichens on asbestos cement roofing. *Int Biodeterior Biodegrad* **30**: 261–271.
- Martino, E., Cerminara, S.T., Prandi, L., Fubini, B., and Perotto, S. (2004) Physical and biochemical interactions of soil fungi with asbestos fibers. *Environ Toxicol Chem* 23: 938–944.
- Martino, E., Prandi, L., Fenoglio, I., Bonfante, P., Perotto, S., and Fubini, B. (2003) Soil Fungal Hyphae Bind and Attack Asbestos Fibers. *Angew Chem Int Ed* **42**: 219–222.
- Martino, P.D. (2016) What About Biofilms on the Surface of Stone Monuments? *Open Conf Proc J* **7**:.
- Matthijs, S., Budzikiewicz, H., Schäfer, M., Wathelet, B., and Cornelis, P. (2008) Ornicorrugatin, a New Siderophore from Pseudomonas fluorescens AF76. Z Für Naturforschung C 63: 8–12.
- Matthijs, S., Laus, G., Meyer, J.-M., Abbaspour-Tehrani, K., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., and Cornelis, P. (2009) Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium Pseudomonas entomophila L48 and its close relative Pseudomonas putida KT2440. *BioMetals* 22: 951.
- Matthijs, S., Tehrani, K.A., Laus, G., Jackson, R.W., Cooper, R.M., and Cornelis, P. (2007) Thioquinolobactin, a Pseudomonas siderophore with antifungal and anti-Pythium activity. *Environ Microbiol* **9**: 425–434.
- McMorran, B.J., Kumara, H.M.C.S., Sullivan, K., and Lamont, I.L. (2001) Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* **147**: 1517–1524.
- McMorran, B.J., Merriman, M.E., Rombel, I.T., and Lamont, I.L. (1996) Characterisation of

the pvdE gene which is required for pyoverdine synthesis in Pseudomonas aeruginosa. *Gene* **176**: 55–59.

- McPhee, J.B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M.D., et al. (2006) Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB Two-Component Regulatory Systems to Mg2+-Induced Gene Regulation in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 188: 3995–4006.
- Meneely, K.M., Barr, E.W., Bollinger, J.M., and Lamb, A.L. (2009) Kinetic Mechanism of Ornithine Hydroxylase (PvdA) from Pseudomonas aeruginosa: Substrate Triggering of O2 Addition but Not Flavin Reduction. *Biochemistry* 48: 4371–4376.
- Meneely, K.M., Luo, Q., Dhar, P., and Lamb, A.L. (2013) Lysine221 is the general base residue of the isochorismate synthase from Pseudomonas aeruginosa (PchA) in a reaction that is diffusion limited. *Arch Biochem Biophys* **538**: 49–56.
- Mercado-Blanco, J., Drift, K.M.G.M. van der, Olsson, P.E., Thomas-Oates, J.E., Loon, L.C. van, and Bakker, P.A.H.M. (2001) Analysis of the pmsCEAB Gene Cluster Involved in Biosynthesis of Salicylic Acid and the Siderophore Pseudomonine in the Biocontrol Strain Pseudomonas fluorescensWCS374. *J Bacteriol* 183: 1909–1920.
- Meyer, J.-M. (2010) Pyoverdine Siderophores as Taxonomic and Phylogenic Markers. In, Ramos, J.L. and Filloux, A. (eds), *Pseudomonas: Volume 6: Molecular Microbiology, Infection and Biodiversity*. Dordrecht: Springer, pp. 201–233.
- Meyer, J.-M. (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent Pseudomonas species. *Arch Microbiol* **174**: 135–142.
- Meyer, J.-M. (2007) Siderotyping and Bacterial Taxonomy: A Siderophore Bank for a Rapid Identification at the Species Level of Fluorescent and Non-Fluorescent Pseudomonas.
  In, Varma,A. and Chincholkar,S.B. (eds), *Microbial Siderophores*, Soil Biology. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 43–65.
- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M., and Budzikiewicz, H. (2008) Siderotyping of fluorescent Pseudomonas: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *BioMetals* 21: 259–271.
- Meyer, J.M., Hohnadel, D., Khan, A., and Cornelis, P. (1990) Pyoverdin-facilitated iron uptake in Pseudomonas aeruginosa: immunological characterization of the ferripyoverdin receptor. *Mol Microbiol* **4**: 1401–1405.
- Michel, L., Bachelard, A., and Reimmann, C. (2007) Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* 153: 1508–1518.
- Michel, L., González, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T., and Reimmann, C. (2005) PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of Pseudomonas aeruginosa requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol Microbiol* **58**: 495–509.
- Mikkelsen, R. (2010) Soil and fertilizer magnesium. Better Crops Plant Food 94: 26-28.
- Mislin, G.L.A., Hoegy, F., Cobessi, D., Poole, K., Rognan, D., and Schalk, I.J. (2006) Binding Properties of Pyochelin and Structurally Related Molecules to FptA of Pseudomonas aeruginosa. *J Mol Biol* 357: 1437–1448.
- Mohanty, S.K., Gonneau, C., Salamatipour, A., Pietrofesa, R.A., Casper, B., Christofidou-Solomidou, M., and Willenbring, J.K. (2018) Siderophore-mediated iron removal from

chrysotile: Implications for asbestos toxicity reduction and bioremediation. *J Hazard Mater* **341**: 290–296.

- Monchaux, G., Bignon, J., Jaurand, M.C., Lafuma, J., Sebastien, P., Masse, R., et al. (1981) Mesotheliomas in rats following inoculation with acid-leached chrysotile asbestos and other mineral fibres. *Carcinogenesis* 2: 229–236.
- Mossialos, D., Ochsner, U., Baysse, C., Chablain, P., Pirnay, J.-P., Koedam, N., et al. (2002) Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol* 45: 1673–1685.
- Nadal-Jimenez, P., Koch, G., Reis, C.R., Muntendam, R., Raj, H., Jeronimus-Stratingh, C.M., et al. (2014) PvdP Is a Tyrosinase That Drives Maturation of the Pyoverdine Chromophore in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 196: 2681–2690.
- Ng, D.H.P., Kumar, A., and Cao, B. (2016) Microorganisms meet solid minerals: interactions and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 6935–6946.
- Nies, D.H. (2007) Bacterial Transition Metal Homeostasis. In, Nies, D.H. and Silver, S. (eds), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, Microbiology Monographs. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 117–142.
- Noerpel, M.R. and Lenhart, J.J. (2015) The impact of particle size on the adsorption of citrate to hematite. *J Colloid Interface Sci* **460**: 36–46.
- Nowack, B., Kari, F.G., and Krüger, H.G. (2001) The Remobilization of Metals from Iron Oxides and Sediments by Metal-EDTA Complexes. *Water Air Soil Pollut* **125**: 243– 257.
- Ochsner, U.A., Johnson, Z., and Vasil, M.L. (2000) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* **146**: 185–198.
- Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y., and Dover, N. (2001) Na+/H+ antiporters. *Biochim Biophys Acta BBA Bioenerg* **1505**: 144–157.
- Pal, A., Wauters, G., and Paul, A.K. (2007) Nickel tolerance and accumulation by bacteria from rhizosphere of nickel hyperaccumulators in serpentine soil ecosystem of Andaman, India. *Plant Soil* 37.
- Paolini, V., Tomassetti, L., Segreto, M., Borin, D., Liotta, F., Torre, M., and Petracchini, F. (2019) Asbestos treatment technologies. *J Mater Cycles Waste Manag* 21: 205–226.
- Park, S.-Y., Cromie, M.J., Lee, E.-J., and Groisman, E.A. (2010) A Bacterial mRNA Leader that Employs Different Mechanisms to Sense Disparate Intracellular Signals. *Cell* 142: 737–748.
- Paulen, A., Hoegy, Françoise., Roche, Béatrice., Schalk, I.J., and Mislin, G.L.A. (2017) Synthesis of conjugates between oxazolidinone antibiotics and a pyochelin analogue. *Bioorg Med Chem Lett* 27: 4867–4870.
- Payandeh, J., Pfoh, R., and Pai, E.F. (2013) The structure and regulation of magnesium selective ion channels. *Biochim Biophys Acta BBA Biomembr* **1828**: 2778–2792.
- Pearson, R.G. (1966) Acids and Bases. Science 151: 172–177.
- Perraud, Q., Moynié, L., Gasser, V., Munier, M., Godet, J., Hoegy, F., et al. (2018) A Key Role for the Periplasmic PfeE Esterase in Iron Acquisition via the Siderophore Enterobactin in Pseudomonas aeruginosa. ACS Chem Biol 13: 2603–2614.

- Persmark, M., Frejd, T., and Mattiasson, B. (1990) Purification, characterization, and structure of pseudobactin 589 A, a siderophore from a plant growth promoting Pseudomonas. *Biochemistry* 29: 7348–7356.
- Petermann, S.R., Sherwood, J.S., and Logue, C.M. (2008) The Yersinia high pathogenicity island is present in Salmonella enterica Subspecies I isolated from turkeys. *Microb Pathog* **45**: 110–114.
- Poole, K., Neshat, S., and Heinrichs, D. (1991) Pyoverdine-mediated iron transport in Pseudomonas aeruginosa: involvement of a high-molecular-mass outer membrane protein. *FEMS Microbiol Lett* 78: 1–5.
- Poole, K., Young, L., and Neshat, S. (1990) Enterobactin-mediated iron transport in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **172**: 6991–6996.
- Porcheron, G., Garenaux, A., Proulx, J., Sabri, M., and Dozois, C.M. (2013) Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 90.
- Poser, I., Rahman, Q., Lohani, M., Yadav, S., Becker, H.-H., Weiss, D.G., et al. (2004) Modulation of genotoxic effects in asbestos-exposed primary human mesothelial cells by radical scavengers, metal chelators and a glutathione precursor. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 559: 19–27.
- Quadri, L.E.N., Keating, T.A., Patel, H.M., and Walsh, C.T. (1999) Assembly of the Pseudomonas aeruginosa nonribosomal peptide siderophore pyochelin: In vitro reconstitution of aryl-4, 2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF. *Biochemistry* **38**: 14941–14954.
- Rajkumar, M., Vara Prasad, M.N., Freitas, H., and Ae, N. (2009) Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Crit Rev Biotechnol* **29**: 120–130.
- Ravel, J. and Cornelis, P. (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol* **11**: 195–200.
- Raymond, K.N. and Carrano, C.J. (1979) Coordination chemistry and microbial iron transport. *Acc Chem Res* 12: 183–190.
- Rédly, G.A. and Poole, K. (2003) Pyoverdine-Mediated Regulation of FpvA Synthesis in Pseudomonas aeruginosa: Involvement of a Probable Extracytoplasmic-Function Sigma Factor, FpvI. J Bacteriol 185: 1261–1265.
- Reimmann, C. (2012) Inner-membrane transporters for the siderophores pyochelin in Pseudomonas aeruginosa and enantio-pyochelin in Pseudomonas fluorescens display different enantioselectivities. *Microbiology* **158**: 1317–1324.
- Reimmann, C., Patel, H.M., Serino, L., Barone, M., Walsh, C.T., and Haas, D. (2001) Essential PchG-Dependent Reduction in Pyochelin Biosynthesis of Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 183: 813–820.
- Reimmann, C., Patel, H.M., Walsh, C.T., and Haas, D. (2004) PchC Thioesterase Optimizes Nonribosomal Biosynthesis of the Peptide Siderophore Pyochelin in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **186**: 6367–6373.
- Reimmann, C., Serino, L., Beyeler, M., and Haa, D. (1998) Dihydroaeruginoic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF, are induced by

extracellular pyochelin in Pseudornonas aeruginosa. Microbiology 144: 3135-3148.

- Reinhart, A.A., Powell, D.A., Nguyen, A.T., O'Neill, M., Djapgne, L., Wilks, A., et al. (2015) The prrF-Encoded Small Regulatory RNAs Are Required for Iron Homeostasis and Virulence of Pseudomonas aeruginosa. *Infect Immun* 83: 863.
- Retrait des revêtements de sol collés (2017) Désamiantage Ile Fr.
- Ringel, M.T. and Brüser, T. (2018) The biosynthesis of pyoverdines. *Microb Cell* 5: 424–437.
- Ringel, M.T., Dräger, G., and Brüser, T. (2016) PvdN Enzyme Catalyzes a Periplasmic Pyoverdine Modification. *J Biol Chem* **291**: 23929–23938.
- Ringel, M.T., Dräger, G., and Brüser, T. (2018) PvdO is required for the oxidation of dihydropyoverdine as the last step of fluorophore formation in Pseudomonas fluorescens. *J Biol Chem* 293: 2330–2341.
- Ringel, M.T., Dräger, G., and Brüser, T. (2017) The periplasmic transaminase PtaA of Pseudomonas fluorescens converts the glutamic acid residue at the pyoverdine fluorophore to α-ketoglutaric acid. *J Biol Chem* 292: 18660–18671.
- Robinson, G.D. and Bromberg, H. (2016) Asbestos (mineral). Salem Press Encycl Sci.
- Rozalen, M., Ramos, M.E., Fiore, S., Gervilla, F., and Huertas, F.J. (2014) Effect of oxalate and pH on chrysotile dissolution at 25 °C: An experimental study. *Am Mineral* **99**: 589–600.
- Ruffié, P. and Margery, J. (2007) Cancer et environnement: le cas de l'amiante. *Cancer Environ Case Asbestos* **9**: 335–339.
- Santé et sécurité au travail INRS.
- Schalk, I.J. and Guillon, L. (2013) Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids* 44: 1267–1277.
- Schalk, I.J., Hannauer, M., and Braud, A. (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol* **13**: 2844–2854.
- Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., and Brillet, K. (2012) Chapter Two Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore–Iron Outer Membrane Transporters. In, Argüello,J.M. and Lutsenko,S. (eds), *Current Topics in Membranes*, Metal Transporters. Academic Press, pp. 37–66.
- Scherpereel, A. (2016) Amiante et pathologie respiratoire. Presse Médicale 45: 117-132.
- Schlegel, K., Lex, J., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (2014) The X-Ray Structure of the Pyochelin Fe3+ Complex. *Z Für Naturforschung C* **61**: 263–266.
- Schlegel, K., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (2004) The stereoisomers of pyochelin, a siderophore of Pseudomonas aeruginosa. *Biometals* **17**: 409–414.
- Schvartz, C., Decroux, J., and Muller, J.-C. (2005) Guide de la fertilisation raisonnée: grandes cultures et prairies, France Agricole Editions.
- Serino, L., Reimmann, C., Visca, P., Beyeler, M., Chiesa, V.D., and Haas, D. (1997) Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginoic acid requires the iron-regulated pchDCBA operon in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 179: 248–257.
- Simmons, W.B. (2016) Amphibole. Encycl Br Inc.
- Sokolova, T.A., Tolpeshta, I.I., and Topunova, I.V. (2010) Biotite weathering in podzolic soil under conditions of a model field experiment. *Eurasian Soil Sci* **43**: 1150–1158.
- Spasiano, D., Luongo, V., Petrella, A., Alfè, M., Pirozzi, F., Fratino, U., and Piccinni, A.F.

(2017) Preliminary study on the adoption of dark fermentation as pretreatment for a sustainable hydrothermal denaturation of cement-asbestos composites. *J Clean Prod* **166**: 172–180.

- Spasiano, D., Luongo, V., Race, M., Petrella, A., Fiore, S., Apollonio, C., et al. (2019) Sustainable bio-hydrothermal sequencing treatment for asbestos-cement wastes. J Hazard Mater 364: 256–263.
- Spasiano, D. and Pirozzi, F. (2017) Treatments of asbestos containing wastes. J Environ Manage 204, Part 1: 82–91.
- Sterflinger, K. (2000) Fungi as geologic agents. Geomicrobiol J 17: 97–124.
- Sultana, R., Siddiqui, B.S., Taraz, K., Budzikiewicz, H., and Meyer, J.-M. (2000) A pyoverdine from Pseudomonas putida CFML 90-51 with a Lys ε-amino link in the peptide chain. *Biometals* **13**: 147–152.
- Sun, G.-X., Zhou, W.-Q., and Zhong, J.-J. (2006) Organotin Decomposition by Pyochelin, Secreted by Pseudomonas aeruginosa Even in an Iron-Sufficient Environment. *Appl Environ Microbiol* 72: 6411–6413.
- Talbi, G., Cambon, M., and Cambon, O. (2019) Virtuous cycle of destruction and total recycling of pure asbestos and asbestos-containing waste. *J Mater Cycles Waste Manag*.
- Teintze, M., Hossain, M.B., Barnes, C.L., Leong, J., and Van der Helm, D. (1981) Structure of ferric pseudobactin: a siderophore from a plant growth promoting Pseudomonas. *Biochemistry* **20**: 6446–6457.
- Thomassin, J.H., Goni, J., Baillif, P., Touray, J.C., and Jaurand, M.C. (1977) An XPS study of the dissolution kinetics of chrysotile in 0.1 N oxalic acid at different temperatures. *Phys Chem Miner* 1: 385–398.
- Toyokuni, S. (2009) Mechanisms of asbestos-induced carcinogenesis. *Nagoya J Med Sci* **71**: 1–10.
- Toyokuni, S. (2016) Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology. *Arch Biochem Biophys* **595**: 46–49.
- Trivedi, A.K. and Ahmad, I. (2011) Effects of Chrysotile Asbestos Contaminated Soil on Crop Plants. *Soil Sediment Contam* **20**: 767–776.
- Tseng, C.-F., Burger, A., Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., Yu, S.S.-F., Chan, S.I., and Abdallah, M.A. (2006) Bacterial siderophores: the solution stoichiometry and coordination of the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds. *JBIC J Biol Inorg Chem* 11: 419–432.
- Turci, F., Favero-Longo, S.E., Tomatis, M., Martra, G., Castelli, D., Piervittori, R., and Fubini, B. (2007) A Biomimetic Approach to the Chemical Inactivation of Chrysotile Fibres by Lichen Metabolites. *Chem – Eur J* 13: 4081–4093.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., and Frey-Klett, P. (2009) Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol* **17**: 378–387.
- Valdebenito, M., Crumbliss, A.L., Winkelmann, G., and Hantke, K. (2006) Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in Escherichia coli strain Nissle 1917. *Int J Med Microbiol* **296**: 513–520.
- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C.J., Kuča, K., and Musílek, K. (2015) Redox- and non-
redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol* **90**: 1–37.

- Vandenende, C.S., Vlasschaert, M., and Seah, S.Y.K. (2004) Functional Characterization of an Aminotransferase Required for Pyoverdine Siderophore Biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa PAO1. J Bacteriol 186: 5596–5602.
- Vasil, M.L. (2007) How we learnt about iron acquisition in Pseudomonas aeruginosa: a series of very fortunate events. *BioMetals* **20**: 587–601.
- Véscovi, E.G., Soncini, F.C., and Groisman, E.A. (1996) Mg2+ as an Extracellular Signal: Environmental Regulation of Salmonella Virulence. *Cell* **84**: 165–174.
- Vidali, M. (2001) Bioremediation. an overview. Pure Appl Chem 73: 1163–1172.
- Virta, R.L. (2002) Asbestos: geology, mineralogy, mining, and uses, US Department of the Interior. US Geological Survey.
- Visca, P. (2004) Iron Regulation and Siderophore Signalling in Virulence by Pseudomonas Aeruginosa. In, Ramos, J.-L. (ed), *Virulence and Gene Regulation*. Boston, MA: Springer, pp. 69–123.
- Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I.L. (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* **15**: 22–30.
- Wagner, J.C., Sleggs, C.A., and Marchand, P. (1960) Diffuse Pleural Mesothelioma and Asbestos Exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med* **17**: 260–271.
- Waldron, K.J. and Robinson, N.J. (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol* **7**: 25–35.
- Wang, D. and Cullimore, D.R. (2010) Bacteriological challenges to asbestos cement water distribution pipelines. *J Environ Sci* 22: 1203–1208.
- Wang, D., Cullimore, R., Hu, Y., and Chowdhury, R. (2011) Biodeterioration of asbestos cement (AC) pipe in drinking water distribution systems. *Int Biodeterior Biodegrad* 65: 810–817.
- Wang, Y. and Newman, D.K. (2008) Redox Reactions of Phenazine Antibiotics with Ferric (Hydr)oxides and Molecular Oxygen. *Environ Sci Technol* 42: 2380–2386.
- Warscheid, Th. and Braams, J. (2000) Biodeterioration of stone: a review. Int Biodeterior Biodegrad 46: 343–368.
- Wasserbauer, R., Zadák, Z., and Novotný, J. (1988) Nitrifying bacteria on the asbestoscement roofs of stable buildings. *Int Biodeterior* 24: 153–165.
- Watteau, F. and Berthelin, J. (1994) Microbial dissolution of iron and aluminium from soil minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to alphatic acids. *Eur J Soil Biol* **30**: 1–9.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., and Coates, J.D. (2006) Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Microbiol* **4**: 752.
- Werner, A.J., Hochella, M.F., Guthrie, G.D., Hardy, J.A., Aust, A.E., and Rimstidt (1995) Asbestiform riebeckite (crocidolite) dissolution in the presence of Fe chelators: Implications for mineral-induced disease. *Am Mineral* 80: 1093–1103.
- Wilderman, P.J., Sowa, N.A., FitzGerald, D.J., FitzGerald, P.C., Gottesman, S., Ochsner, U.A., and Vasil, M.L. (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in Pseudomonas aeruginosa involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U* S A 101: 9792.

- Wong-Lun-Sang, S., Bernardini, J.-J., Hennard, C., Kyslík, P., Dell, A., and Abdallah, M.A. (1996) Bacterial siderophores: Structure elucidation, 2D 1H and 13C NMR assignments of pyoverdins produced by Pseudomonas fluorescens CHAO. *Tetrahedron Lett* 37: 3329–3332.
- Yao, M., Lian, B., Teng, H.H., Tian, Y., and Yang, X. (2013) Serpentine Dissolution in the Presence of Bacteria Bacillus mucilaginosus. *Geomicrobiol J* **30**: 72–80.
- Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L., and Schalk, I.J. (2010) Synthesis of the siderophore pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* 38: 1447–1459.
- Youard, Z.A., Mislin, G.L.A., Majcherczyk, P.A., Schalk, I.J., and Reimmann, C. (2007) Pseudomonas fluorescens CHA0 Produces Enantio-pyochelin, the Optical Antipode of the Pseudomonas aeruginosa Siderophore Pyochelin. *J Biol Chem* 282: 35546–35553.
- Youard, Z.A., Wenner, N., and Reimmann, C. (2011) Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in Pseudomonas species. *BioMetals* 24: 513–522.
- Zawadzka, A.M., Crawford, R.L., and Paszczynski, A.J. (2007) Pyridine-2,6bis(thiocarboxylic acid) Produced by Pseudomonas stutzeri KC Reduces Chromium(VI) and Precipitates Mercury, Cadmium, Lead and Arsenic. *BioMetals* **20**: 145–158.

## Annexes

		CHR-GY		P. aeruginosa PAO1		P. mandelii SB8.3	
	Cycles	Milieu succinate	CHR-GY + milieu succinate	Surnageant	CHR-GY + surnageant	Surnageant	CHR-GY + surnageant
	1	7.02	7.28	7.62	7.80	7.71	7.88
	2	7.05	7.13	7.49	7.60	7.65	7.71
	3	7.02	7.09	7.47	7.56	7.66	7.63
	4	7.01	7.09	7.67	7.74	7.66	7.77
24H avec pyoverdine 100μM	5	6.93	6.97	7.48	7.51	7.55	7.59
	6	6.93	7.00	7.45	7.64	7.64	7.74
	7	6.92	6.96	7.50	7.59	7.63	7.70
	8	6.94	6.96	7.46	7.59	7.66	7.72
	9	6.94	6.98	7.51	7.59	7.68	7.73
	1	6.94	6.94	7.47	7.62	7.74	7.79
	2	6.96	7.00	7.47	7.55	7.53	7.62
	3	7.03	7.06	7.49	7.59	7.64	7.66
96H avec pyoverdine 100µM	4	6.97	6.99	7.48	7.56	7.55	7.63
	5	6.94	7.06	7.49	7.63	7.62	7.69
	6	7.02	7.07	7.57	7.67	7.70	7.69
	7	7.05	7.07	7.63	7.68	7.71	7.68
24H avec pyoverdine 200µM	-	7.07	7.09	7.98	8.07	8.48	8.38
96H avec pyoverdine 200µM	-	7.08	7.10	8.03	8.04	8.54	8.55

<u>Annexe 1</u>: Mesure du pH après des cycles d'altération de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY) en présence de surnageants de culture de *Pseudomonas mandelii* SB8.3 ou *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

		T24	T48	Т96
	milieu succinate	7.06	7.07	7.07
	CHR-GY + milieu succinate	7.22	7.15	7.15
Proverdine P. mandelii SB8 2 à 25uM	Surnageant 7.2	7.23	7.26	7.26
	CHR-GY + surnageant	7.44	7.35	7.32
Pyoverdine P. mandelii SB8 3 à 50uM	Surnageant	7.43	7.52	7.49
	CHR-GY + surnageant	7.61	7.57	7.56
Pyoverdine P. mandelii SB8 3 à 100µM	Surnageant	7.83	7.93	8.11
	B8.3 à 100μM CHR-GY + surnageant 7.95		8.00	8.04
Pyoverdine P. mandelii SB8 3 à 150uM	Surnageant	8.28	8.35	8.51
	CHR-GY + surnageant	8.38	8.44	8.66
Pyoverdine P. mandelii SB8 3 à 2001M	Surnageant	8.64	8.74	8.78
	CHR-GY + surnageant	8.68	8.73	8.85

<u>Annexe 2</u>: Mesure du pH après des cycles d'altération de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY) en présence de surnageants de culture de *Pseudomonas mandelii* SB8.3 contenant différentes concentrations en pyoverdine (pH non ajusté).



<u>Annexe 3</u>: Suivi de l'extraction de fer (A) et de magnésium (B) de déchets de chrysotilegypse après 8 cycles de 24 heures en présence de succinate dépourvu de magnésium. CHR-GY (PAO1), (SB8.3) et (Succ-Mg) correspondent aux échantillons qui seront mis par la suite en présence de *P. aeruginosa* PAO1, *P. mandelii* SB8.3 et du milieu succinate sans magnésium. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 5 réplicats.



<u>Annexe 4</u>: Extraction de fer de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY) après quatre cycles d'incubation de 24 heures en présence de milieu casaminoacides et succinate dépourvu de magnésium. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

	CAA-Mg	CAA-Mg + CHR-GY	Succ-Mg	Succ-Mg + CHR-GY
T24-1	7.37	7.60	7.13	7.24
T24-2	7.42	7.59	7.13	7.30
T24-3	7.38	7.56	7.19	7.17
T24-4	7.40	7.58	7.15	7.19

<u>Annexe 5</u> : Mesure du pH après des cycles d'altération de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY) en présence de milieu casaminoacides et succinate dépourvu de magnésium.



<u>Annexe 6</u>: Suivi de la croissance de la souche sauvage de *Pseudomonas aeruginosa* (WT) et de mutant incapable de produire la pyoverdine ( $\Delta$ PVD), la pyochéline ( $\Delta$ PCH) ou les deux sidérophores (2 $\Delta$ ) dans un milieu casaminoacides avec (CAA) ou sans magnésium (CAA-Mg) en présence ou non de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY). Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.



<u>Annexe 7</u>: Cinétique d'extraction du magnésium de tuile de toit en fibrociment (Fibro) durant 24 h en présence de surnageants de culture de différentes souches de *Pseudomonas*, contenant 100  $\mu$ M de pyoverdine. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 5 réplicats.



<u>Annexe 8</u> : Extraction du magnésium de tuile de toit en fibrociment (Fibro) en présence de surnageants de culture de différentes souches de *Pseudomonas*, contenant 100 µM de pyoverdine, après 24, 48 et 96 h de contact. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 5 réplicats.



<u>Annexe 9</u>: Suivi de la croissance de souches de *Pseudomonas aeruginosa* marquées par une étiquette mCherry sur des protéines de biosynthèse de la pyochéline (PchA) et de la pyoverdine (PvdJ), après 40 h de croissance dans un milieu casaminoacides avec (CAA) ou sans magnésium (CAA-Mg) en présence ou non de tuile de toit en fibrociment (Fibro). Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.



<u>Annexe 10</u> : Suivi de la croissance de la souche sauvage de *Pseudomonas aeruginosa* (WT) et de mutant incapable de produire la pyoverdine ( $\Delta$ PVD), la pyochéline ( $\Delta$ PCH) ou les deux sidérophores (2 $\Delta$ ) dans un milieu casaminoacides avec (CAA) ou sans magnésium (CAA-Mg) en présence ou non de déchets de tuile de toit en fibrociment (Fibro). Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

	Jus de choucroute	Jus de choucroute + CHR-GY	Petit lait	Petit lait + CHR-GY
Cinétique T96	3.78	4.75	4.36	5.32
T24-1	3.71	4.03	4.28	4.57
T24-2	3.70	3.94	4.40	4.64
T24-3	3.72	3.97	4.27	4.49
T24-4	3.78	3.93	4.31	4.47
T24-5	3.70	3.81	4.30	4.38
T24-6	3.69	3.82	4.29	4.39
T24-7	3.60	3.66	4.35	4.43
T24-8	3.58	3.61	4.32	4.42
Т96	3.56	3.61	4.30	4.50

<u>Annexe 11</u> : Mesure du pH après des cycles d'altération de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY) en présence de jus de choucroute et de petit lait.



<u>Annexe 12</u> : Cinétique d'extraction de fer (A) et de magnésium (B) de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY) durant 240 h en présence de petit lait avec ajout de *Lactobacillus plantarum*. Les barres d'erreur sont des erreurs standards sur la moyenne de 3 réplicats.

	Petit lait + Lactobacillus plantarum	Petit lait + Lactobacillus plantarum + CHR-GY
T72-1	3.58	3.69
T72-2	3.72	3.48
T72-3	4.02	3.68
T72-4	4.03	3.75

<u>Annexe 13</u> : Mesure du pH après des cycles d'altération de déchets de chrysotile-gypse (CHR-GY) en présence de petit lait avec ajout de *Lactobacillus plantarum*.

	Jus de choucroute	Jus de choucroute + Fibro	Petit lait	Petit lait + Fibro
Cinétique T96	3.82	7.63	4.27	6.31

<u>Annexe 14</u> : Mesure du pH après une cinétique d'altération de tuyau de fibrociment (Fibro) en présence de petit lait avec ou sans ajout de *Lactobacillus plantarum*.

## Monitorat

Lors de ma deuxième année de thèse, j'ai eu la chance d'obtenir un poste en tant que moniteur à l'Université de Strasbourg. J'étais en charge des travaux pratiques (TP) et travaux dirigés (TD) au sein de l'équipe pédagogique de l'UE « Techniques Biologiques » en licence première année, dont l'objectif est d'enseigner les techniques de bases nécessaires en microbiologie.

Les TP/TD sont organisés en cinq parties complémentaires comprenant l'étude de la morphologie et de la croissance bactérienne, la réalisation d'une transformation bactérienne, l'analyse de l'ADN et l'étude de la méthode ELISA. L'analyse des résultats obtenus est effectuée lors des séances de TD.

Lors de ces 64 heures d'enseignement, j'ai été en charge de différents groupes d'étudiants que j'ai suivi tout au long des TP/TD. Associé à l'encadrement, j'étais en charge de l'évaluation des étudiants par des contrôles continus lors des séances de TP/TD et un contrôle terminal.

J'ai ainsi allié recherche et enseignement au cours de ma deuxième et troisième année de thèse. Cette expérience fut extrêmement formatrice et enrichissante et m'a notamment permis de faire preuve de pédagogie et de développer mon assurance lors de la prise de parole en public. De plus, j'ai pu transmettre au mieux mes connaissances en utilisant la vulgarisation scientifique et un vocabulaire adapté aux étudiants. Les retours positifs que j'ai pu obtenir m'on permis de prendre confiance en moi sur ma capacité à enseigner. J'ai ainsi pris beaucoup de plaisir à effectuer cette mission d'enseignement.

# Communications scientifiques

#### **Publications**

**S. David**, D. Ihiawakrim, R. Regis, V. A. Geoffroy. Iron removal from raw asbestos by siderophores-producing *Pseudomonas*. Soumission à Journal of Hazardous Materials 15 juillet 2019.

**S. David**, D. Ihiawakrim, R. Regis, V. A. Geoffroy. Efficiency of siderophores in iron and magnesium removal from flocking absestos waste : an innovative bacterial bioremediation strategy. Soumission à Environmental Science & Technology 28 Août 2019.

**S. David**, S. Fritsch, A. Forster, D. Ihiawakrim, V. A. Geoffroy. Flocking asbestos waste, an iron and magnesium source for *Pseudomonas*. En préparation pour soumission à Science of the Total Environment en septembre 2019.

**S. David**, V. A. Geoffroy. Biodeterioration of asbestos cement by sidorophore-producing *Pseudomonas*. En préparation.

#### **Communications orales**

**S. David**, V. Geoffroy. Développement d'un procédé de traitement de l'amiante par voie biologique. Journées des doctorants de l'ADEME, Valbonne (15-16 mars 2018).

**S. David**, V. Geoffroy. Efficacité de différentes pyoverdines sur l'altération de déchets amiantés. Séminaire de Microbiologie de Strasbourg (29 mars 2018).

**S. David**, V. Geoffroy. Flocking asbestos wastes weathering by siderophores : a focus on pyoverdines efficiency. Upper Rhine Cluster for Sustainability Research, Strasbourg (27-28 septembre 2018).

**S. David**, V. Geoffroy. Solution innovante de traitement de déchets amiantés par bioremédiation. Séminaire d'unité, Illkirch (2 mai 2019).

#### **Communications par affiche**

**S. David**, V. Geoffroy. Altération microbiologique de déchets amiantés pour une valorisation. Séminaire de Microbiologie de Strasbourg (1<sup>er</sup> mars 2017); Journées des doctorants de l'ADEME, Angers (14-15 mars 2017).

**S. David**, V. Geoffroy. Bioremediation of asbestos wastes. Journées campus d'Illkirch 2017 (27-28 mars 2017).

**S. David**, V. Geoffroy. Quand les bactéries neutralisent l'amiante. Les Doctoriales d'Alsace 2018, Strasbourg (14-18 mai 2018).

A. Jaouen, **S. David**, V. Geoffroy. Bacterial alteration of asbestos cement waste. Séminaire de Microbiologie de Strasbourg (28 mars 2019).

#### **Vulgarisation scientifique**

**S. David**, V. Geoffroy. Quand les bactéries neutralisent l'amiante. Interview vidéo par le service communication de l'université de Strasbourg (3 avril 2018).

**S. David**, V. Geoffroy. Strasbourg: Ils travaillent sur des bactéries qui mangent l'amiante, une solution bio. Article dans le 20 minutes (26 avril 2018).

**S. David**, V. Geoffroy. Amiante contre bactéries : l'ultime combat. Pint of Science 2019, Strasbourg (22 mai 2019).



Sébastien DAVID

### Altération de déchets amiantés par des bactéries et des sidérophores en vue du développement d'un procédé de bioremédiation

#### Résumé

Compte tenu de ses effets néfastes sur la santé, l'amiante est interdit en France depuis 1997, entrainant la gestion de tonnages importants de déchets. Les seules méthodes actuelles sont l'enfouissement ou la vitrification par la technologie plasma. L'objectif de ce projet de recherche était d'explorer diverses voies biologiques afin de développer un procédé biotechnologique permettant le traitement de déchets amiantés.

Ce travail a permis de démontrer la capacité des pyoverdines à solubiliser le fer présent dans les amiantes avec des efficacités variables selon leur structure. Nous avons mis en évidence que les Pseudomonas fluorescents sont capables de puiser dans les déchets le fer grâce à l'utilisation des sidérophores mais également du magnésium par un mécanisme restant à déterminer. De plus, des acides organiques en présence de bactéries a permis l'extraction d'une grande quantité de fer et de magnésium présente dans les déchets d'amiantes qui semble la plus prometteuse.

Mots clés : Amiantes, Métaux, Sidérophores, Pseudomonas, Pyoverdine, Acides organiques

#### Abstract

Considering its toxic effect on health, the use of asbestos has been banned in France since 1997. Currently, asbestos removal is a priority and we have to deal with huge amount of wastes. Only two treatments are in use, storage or transformation in glass by plasma technology. However, these methods do not eliminate the waste. The aim of this project is to explore various biological pathways in order to develop a biotechnical process to treat asbestos waste.

This work showed for the first time that pyoverdines are able to solubilize iron from asbestos with various efficiency depending in pyoverdine structure. We highlighted that waste represent an iron and magnesium source for fluorescent Pseudomonas thanks to the use of siderophores for iron release and an unknown mechanism for magnesium. Moreover, the use of organic acids associated with bacteria allowed a huge extraction of iron and magnesium from asbestos waste, which is the best pathway to date.

Keywords: Asbestos, Metals, Siderophores, Pseudomonas, Pyoverdine, Organic acids