

---

---

# LES MICROMYCÈTES

Ce chapitre est consacré aux champignons microscopiques, les micromycètes, impliqués dans la biodétérioration. Nous commencerons par quelques généralités, puis nous nous intéresserons plus particulièrement aux souches sélectionnées dans cette étude.

## 1. Généralités

### 1.1. Introduction à la taxinomie

Il existe aujourd'hui un nombre considérable d'organismes et la tâche de les nommer et de les classer s'avère être complexe. La taxinomie, ou science de la classification des êtres vivants, fut établie par Carl Von Linne au XVIII<sup>e</sup> siècle. Il proposait alors un système de classification basé sur les ressemblances et les différences des organismes dans leur morphologie, leur fonctionnement, leur habitat et leur reproduction. La classification est en continuel changement. Le classement traditionnel des espèces est surtout basé sur la présence (ou l'absence) d'un caractère morphologique. Le classement repose sur une hiérarchie fixe de catégories. Au niveau le plus bas de ce système, on trouve l'*espèce* à laquelle correspond un type particulier d'organisme vivant ; plusieurs espèces différentes peuvent constituer un *genre*, plusieurs genres une *famille*, plusieurs famille un *ordre* ; puis vient la *classe* suivie de l'*embranchement* et enfin le *règne*. La classification phylogénétique\* est un nouveau système de classification systématique des êtres vivants (Figure 3). Elle pourrait, à plus ou moins long terme, remplacer la classification traditionnelle basée sur des traits phénotypiques et des préférences nutritionnelles. Initiée par Carl Woese en 1990 à partir de données génétiques, elle montre notamment que les procaryotes pouvaient être divisés en deux groupes trop différents pour pouvoir être identifiés comme un seul.

---

\* Phylogénétique : relatif à l'étude de la formation et de l'évolution des organismes vivants en vue d'établir leur parenté.

La première hiérarchie est donc composée de trois domaines :

- Archéobactéries
- Eubactéries
- Eucaryotes

Le domaine des Eucaryotes est subdivisé en quatre règnes :

- les protistes (eucaryote unicellulaire)
- les champignons (eucaryote multicellulaire)
- les végétaux (eucaryote multicellulaire)
- les animaux (eucaryote multicellulaire)

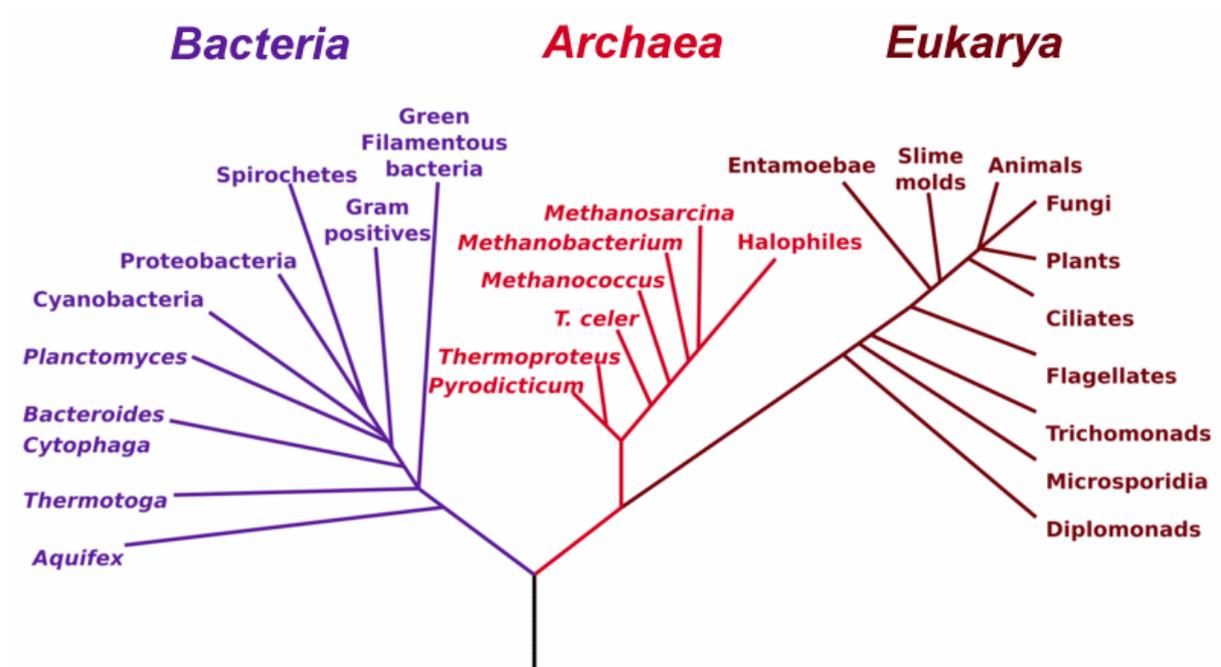


Figure 3 : Arbre phylogénétique selon la classification proposée par Woese et al. (1990)

On désigne scientifiquement un individu par le genre et l'espèce auxquels il appartient ; c'est la nomenclature binomiale. Des deux termes latins utilisés, seul le nom du genre prend une majuscule, mais les deux s'écrivent en italique (Bourbonnais, 2005).

## 1.2. Le règne des Champignons

Le règne des Champignons est divisé en 4 classes (Figure 4) : Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota. Les champignons sont hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils sont

incapables d'utiliser l'énergie solaire, et utilisent donc de nombreuses molécules carbonées fabriquées par d'autres êtres vivants.

Les chytridiomycètes sont des champignons souvent unicellulaires et sont probablement proches des algues.

La plupart des zygomycètes vivent sur des matières végétales et animales en décomposition dans le sol. Quelques uns sont parasites de plantes, d'insectes, d'animaux et de l'homme.

De nombreuses espèces d'ascomycètes sont familières et économiquement importantes ; par exemple les moisissures rouges, brunes et bleu-vert qui détériorent la nourriture sont des ascomycètes. Le nom d'ascomycète provient de leur structure reproductrice caractéristique, l'asque (du grec *askos*, sac) en forme de massue ou de sac.

Les basidiomycètes sont communément connus sous le nom de « champignons à chapeau ».

Les deutéromycètes (ou champignons imparfaits) ne constituent pas un groupe naturel, mais un ensemble artificiel regroupant environ 15 000 espèces (plus du quart des champignons actuellement connus) ne présentant jamais, ou très exceptionnellement, de forme sexuée. Ils se reproduisent uniquement par voie végétative au moyen de spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium. On place ces formes asexuées dans les classes auxquelles appartiennent leur phase sexuée (soit Ascomycota soit Basidiomycota). Ils sont responsables d'un grand nombre de maladies des végétaux et humaines (Boiron, 2002).

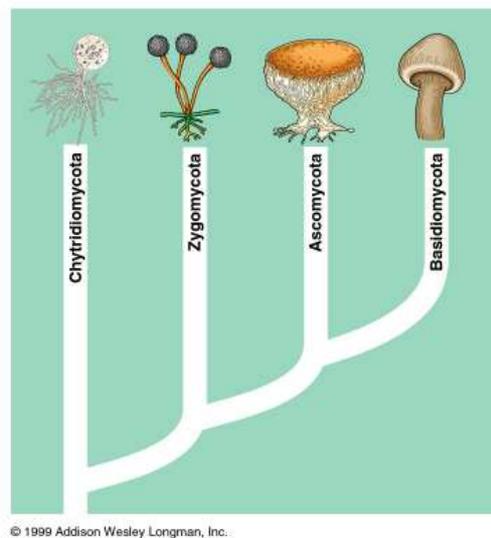


Figure 4 : Les classes du règne des Champignons

### **1.3. La diversité des ascomycètes**

Nous travaillons dans cette étude avec des espèces appartenant à la classe Ascomycota. C'est pourquoi nous présentons les similitudes et les différences de développement rencontrés pour cette classe uniquement.

#### **1.3.1. Mode de développement**

L'appareil végétatif, qui permet la croissance et le développement, est composé de filaments appelés hyphes dont l'ensemble constitue un réseau : le mycélium. Il va à la recherche de ses aliments, dégrade le support par émission d'enzymes et d'acides, en transforme les composants à l'intérieur de la cellule et rejette les déchets à l'extérieur, ou les stocke. La dégradation du substrat peut être infime ou considérable, selon l'adaptation spécifique du champignon, la durée et les conditions de son développement. Cette activité de dégradation est la cause de la détérioration des supports. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes. L'accroissement de celles-ci s'effectue par le sommet, ou apex, où s'effectue l'essentiel des réactions de synthèse et dégradation du métabolisme dit « primaire », indispensable à la construction de la cellule du champignon. Les produits du métabolisme « secondaire » non indispensables au fonctionnement de la cellule, sont plutôt stockés en région subapicale. Les métabolites secondaires les plus connus sont les pigments, les antibiotiques, les mycotoxines... (Roquebert, 1997).

#### **1.3.2. La reproduction**

La plupart des micromycètes se multiplient par des spores, d'origine sexuée et/ou asexuée. Ce sont des cellules au métabolisme réduit, entourées de parois protectrices épaisses qui les isolent du milieu ambiant. Elles sont produites en très grand nombre et peuvent survivre plusieurs mois à plusieurs années. C'est sous cette forme que les micromycètes sont dispersés puis se déposent sur de nouveaux supports. Lorsque les conditions environnementales deviennent favorables, elles germent comme des graines, et redonne du mycélium qui reformera, à son tour des spores (Figure 5) (Roquebert, 1997).

Les spores se forment à partir du mycélium selon des processus plus ou moins différenciés, mais en tout cas très variés. Elles peuvent être solitaires groupées en chaînes ou en têtes, portées à la surface du mycélium, ou contenues dans des enveloppes cellulaires. Le développement normal d'une moisissure comprend une phase végétative de croissance, et

presque simultanément, une phase reproductive au cours de laquelle se forment les spores assurant la dispersion. La germination des spores est à l'origine de la phase végétative (Boissier, 2003). L'identification des moisissures repose principalement sur leur mode de formation et de groupement du mycélium.

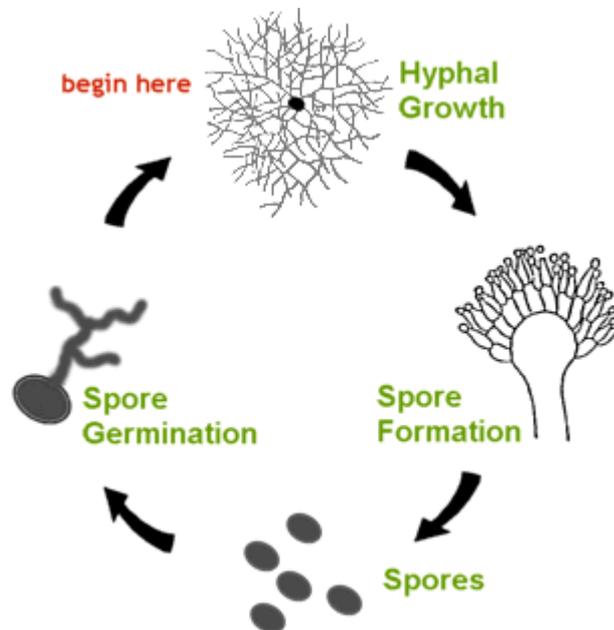


Figure 5 : Cycle de développement des Hyphomycètes (d'après Kubeldis, 2003)

### 1.3.3. Cas particuliers

#### 1.3.3.1. Les champignons lévuriformes

Les champignons lévuriformes ont la capacité de se développer selon un mode de croissance type levure (Figure 6) ou selon la forme mycélienne (Figure 7). Les blastospores représentent la forme unicellulaire du champignon et se caractérisent par des cellules ovoïdes de type lévuriforme. Ce sont des cellules bourgeonnantes ; le bourgeonnement étant un processus de division cellulaire permettant de générer ultimement deux blastospores à partir d'une cellule parentale.

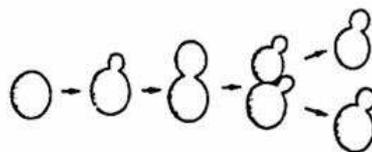


Figure 6 : Bourgeonnement d'une blastospore (d'après Barron, 1999)

Une blastospore produit une nouvelle cellule à partir d'un site déterminé situé à proximité de l'un de ses pôles (Figure 6).

La forme hyphe (mycélienne) est caractérisée par la formation d'un tube microscopique à partir d'un site indéterminé situé sur le blastospore. Le terme « tube germinatif » est utilisé pour décrire cette structure. Au fur et à mesure que l'hyphe s'allonge, des septa sont formés et séparent les unités cellulaires distinctes.

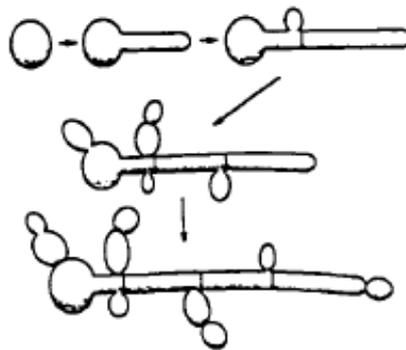


Figure 7 : Formation d'hyphes chez les champignons lévuriformes (d'après Barron, 1999)

De plus, une hyphe peut permettre la formation de blastospores et/ou d'hyphes secondaires situées latéralement au tube germinatif principal et à proximité des septa. Ainsi, une hyphe peut émerger à partir d'une blastospore ou d'une hyphe préexistante (Figure 7).

### 1.3.3.2. Les champignons méristématiques

Le développement méristématique est rare chez les champignons, mais est fréquemment rencontré chez les lichens (association d'une algue et d'un champignon), qui sont sujets aux conditions de sécheresse. Une cellule méristématique est une cellule non différenciée qui est apte à se diviser.

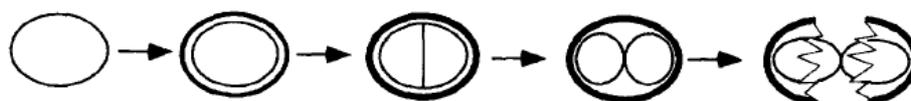


Figure 8 : Croissance méristématique (d'après Wollenzien, 1995)

La croissance méristématique se fait par gonflement de la cellule initiale qui donne naissance à deux nouvelles cellules, qui peuvent à leur tour se diviser (Figure 8). Le développement ne se fait pas forcément de façon apicale (en bout de chaîne). Les champignons méristématiques ont la capacité de se réorganiser de façon interne, en remplaçant les cellules mourantes ou mortes par de nouvelles (Gorbushina et al., 2003). Ils sont particulièrement adaptés aux conditions environnementales hostiles car leur croissance ne dépend pas de la quantité d'eau disponible.

## 2. Les mécanismes de biodétérioration par les champignons

Le processus de biodétérioration commence dès que le champignon s'installe et colonise la surface du matériau. Les principaux mécanismes peuvent se résumer ainsi :

- Production d'acides. Les acides organiques (tels que l'acide oxalique, citrique, propionique, etc.) conduisent à la dissolution des carbonates et à la décohésion des grains. Ce mode de biodétérioration est documenté pour les espèces des hyphomycètes comme *Penicillium* et *Aspergillus* mais jamais démontré pour les « black fungi » (Wollenzien et al., 1995 ; De Leo et Urzì, 2003).
- Dommages esthétiques dues aux pigments fongiques (particulièrement la mélanine et les caroténoïdes) (Sterflinger, 1999 ; Urzì et al., 2000a).
- Croissance intercrystalline. Dans ce cas le champignon se développe le long des défauts de la matrice.
- Biopitting. Ce mode de biodétérioration a été décrit pour les « black fungi », et plus spécialement pour les champignons méristématiques. Il a été suggéré que la formation de petits cratères serait due à la décohésion des grains déterminée par la pénétration des hyphes à l'intérieur des pierres (Sterflinger et Krumbein, 1997).

## 3. Les champignons impliqués dans la biodétérioration

Parmi les micro-organismes impliqués dans la biodétérioration des matériaux de construction, les champignons jouent un rôle important : ils se distinguent des bactéries car ils sont responsables d'une détérioration esthétique des matériaux de construction (croûtes noires, marron), et des algues et cyanobactéries car leur pouvoir de détérioration est nettement plus important, dans la mesure où ils provoquent une détérioration chimique (métabolites acides), voire physique (ancrage des hyphes dans la matrice). May *et al.* (1993) mentionnent les

champignons parmi les agents majeurs de la détérioration microbienne des matériaux de construction. Lezinicka *et al.* (1988) soulignent l'importance particulière des champignons *dematiceous* (de couleur foncée) dans la coloration et la détérioration du patrimoine culturel. La plupart de ces champignons appartiennent à la classe des ascomycètes. En général, deux groupes de champignons sont isolés de la surface des pierres :

- le premier groupe inclus les espèces des genres *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phoma* parmi ceux qui ne produisent pas de mélanine. On trouve également ceux qui présentent une pigmentation sombre tels qu'*Alternaria*, *Ulocladium*, *Cladosporium*, producteurs de mélanine. Sont aussi présents les champignons levuriformes comme *Exophiala*. La plupart de ces champignons sont ubiquistes\* et largement répartis (Domsch et al., 1980). Ils sont caractérisés par une croissance rapide en milieu de culture classique, avec une humidité relative élevée et des conditions nutritives eutrophiques\*\* (Braams 1992 ; De Leo et al., 1996 ; Sterflinger, 2000). La présence de ces champignons sur les monuments à différentes étapes de la détérioration, pour des expositions en environnement extérieur et pour différentes zones climatiques est bien documentée (Hirsch et al., 1995 ; Urzì et al., 1995 ; Urzì et Realini, 1998 ; De Leo et Urzì, 2003).
- le second groupe inclus les champignons appelés méristématiques ou MCF (Micro Colonial Fungi). D'un point de vue taxonomique, ils représentent un vaste groupe hétérogène de champignons à la pigmentation sombre. Ils partagent comme caractéristique commune, la présence de mélanine à l'intérieur de leurs cellules (cellules qui gonflent, hyphes et/ou spores). La production de mélanine et le développement méristématique leur permettent de survivre en conditions de stress tel qu'une humidité relative basse, ou une importante exposition au soleil (De Hoog, 1993). On utilise également le terme « rock-inhabiting fungi » pour ce groupe de champignons, ce qui souligne bien que la plupart ont été isolés à partir de la surface des pierres. Récemment, de nombreuses souches de ce groupe ont été décrites comme des espèces nouvelles (Sterflinger et al., 1997 ; Wollenzien et al., 1997 ; De Leo et al., 2003a), et les recherches écologiques et taxonomiques sont actuellement en cours (De Leo et al., 2003a). Ils ont la capacité de se réorganiser de façon interne, en remplaçant les cellules mourantes ou mortes par de nouvelles

---

\* Ubiquiste : se dit des espèces susceptibles d'être observées dans de très nombreux habitats.

\*\* Eutrophique : se dit d'un milieu qui se retrouve enrichie en éléments nutritifs.

(Gorbushina et al., 2003). Il est possible de former des hyphes qui pénètrent en profondeur à l'intérieur du matériau, se protégeant ainsi des conditions environnementales non favorables. En ce sens, la partie visible des MCF est comme la partie émergée des icebergs, car les hyphes peuvent pénétrer rapidement de plusieurs millimètres jusqu'au centimètre à l'intérieur des roches dures à la recherche d'un environnement plus protecteur (Gorbushina, 2007).

Le premier groupe est dominant lorsque les conditions sont favorables tandis que le second prévaut en environnement rude et hostile (Gorbushina, 2007). Il est très probable que les champignons méristématiques en particulier possèdent leur niche écologique naturelle sur la surface des pierres (Wollenzien et al., 1995) et donc de la plupart des matériaux de construction.

Une étude menée par Urzi *et al.* (2001), porte sur l'examen de 49 échantillons de pierres prélevés sur sites dans divers pays européens (brique, mortier, marbre). Quarante-deux échantillons présentaient une colonisation par des champignons *dematiaceous*. Parmi les souches les plus fréquemment isolées, ils trouvèrent les genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Ulocladium*. Dans certains cas, des souches ubiquistes non-*dematiaceous* du genre *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium* ont été isolées. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Fusarium*, sont des champignons acidogéniques produisant différents acides organiques comme : acide oxalique, gluconique, malique, citrique etc, pour des concentrations basses et normales en glucose (de la Torre *et al.*, 1991). Ces acides forment des sels de calcium ou agissent comme agent de chélation de cations minéraux favorisant la biodétérioration (Berthelin, 1983). Cependant, l'attaque des champignons n'est pas exclusivement chimique par la production d'acides organiques. Le développement des « black fungi » sur les pierres n'est pas seulement inesthétique, salissant les monuments, en raison du changement de couleur et de l'apparition de points noirs, mais il est également la cause de lésions en forme de cratère et exfoliation de la surface de la pierre combinée avec une perte du matériau (Urzi *et al.*, 2001). L'attaque physique de ces champignons est un facteur important de la biodétérioration des pierres (Diakumaku *et al.*, 1995). Leur pigmentation sombre (mélanine et mycosporines) les protège des irradiations, des températures extrêmes et d'une possible dessiccation (Zdanova *et al.*, 1973). Ces pigments contribuent considérablement à la survie de ces champignons aux conditions extrêmes. Une étude sur la microflore présente sur des sculptures et des bâtiments de St-Petersbourg a montré qu'ils étaient sujets à une biodétérioration active par des micromycètes possédant une pigmentation sombre. Les hyphes

étaient présents à l'intérieur des pores des pierres et causent lentement leur destruction (Gorbushina et al., 2002). Pour montrer la capacité des micromycètes à se développer sur les pierres, Gorbushina et al. (2002) ont inoculé des échantillons prélevés sur des monuments, après stérilisation, par des micromycètes : *Exophiala moniliae* et *Phialophora melinii*. Après 5 jours d'incubation seulement, le développement des deux souches est observé sur les échantillons, et ce sans aucun ajout d'éléments nutritifs. La matière organique déjà présente dans la matrice a permis le développement fongique. Les substrats minéraux fraîchement exposés à l'air extérieur présentent une lacune en nutriments organiques, ce qui les rend réfractaires à la croissance végétative des champignons. Pour palier à ce problème, certains groupes de champignons ont abandonné leur système de développement par élongation des hyphes (qui est plus appropriée pour la pénétration et l'utilisation du substrat) et ont adopté une croissance comme les levures (par bourgeonnement) (Gorbushina, 2007).

En résumé, certaines souches, comme *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, sont responsables de la biodétérioration du matériau par voie chimique (production d'acides organiques) alors que d'autres, comme *Alternaria*, *Phoma*, *Conosporium* attaquent le matériau par voie physique (pénétration en profondeur dans la matrice). Notons aussi que les micromycètes possédant une pigmentation sombre, *Alternaria*, *Exophiala* sont responsables d'une biodétérioration esthétique indéniable. Il faut souligner également l'importance des champignons méristématiques dans la biodétérioration. En effet, contrairement aux micromycètes couramment identifiés qui sont ubiquistes, les champignons méristématiques sont quasiment tous isolés à partir de la surface de pierres. De plus, la nature de la flore fongique varie selon la teneur en eau du support. Une humidité croissante du substrat entraîne l'apparition successive de genres fongiques, dits de première (*Aspergillus*, *Penicillium*), deuxième (*Cladosporium*, *Ulocladium*), et de troisième colonisation (*Stachybotrys*) (Grant et al., 1989 ; Boissier, 2003).

#### 4. Les micromycètes de l'étude

Nous venons de voir que les micromycètes colonisateurs des matériaux de constructions peuvent se regrouper en quatre grandes catégories, et pour étudier la biodétérioration d'une matrice cimentaire par les champignons nous avons sélectionné une souche représentative de chaque catégorie : (i) *Alternaria alternata* pour représenter un hyphomycète producteur de mélanine, (ii) *Aspergillus niger* pour un hyphomycète acidogénique, (iii) *Exophiala* sp. pour

un champignon lévuriforme, et (iv) *Conosporium uncinatum* pour les champignons méristématiques (Planche 2).

#### **4.1. *Alternaria alternata***

*Alternaria* est abondamment retrouvée lors de prélèvements sur sites d'échantillons de marbre (Wollenzien *et al.*, 1995). Plus récemment, Simonovicova *et al.* (2004) étudièrent les types de champignons retrouvés sur divers substrats minéraux dans un cimetière à Bratislava. Trente-six espèces de micro-champignons ont été isolées, dont les plus fréquemment retrouvées : *Acremonium* sp., *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp., et *Trichoderma* sp. Les espèces d'*Alternaria* furent également retrouvées parmi les micro-champignons dominants sur substrat minéral. Diakumaku (1995) considère que les espèces du genre *Alternaria* sont les principales causes de coloration marron et noire sur le marbre, les roches calcaires, et le grès des monuments en Europe et en Afrique. Cette coloration est due à la synthèse de mélanine, un pigment de couleur sombre. Bien que ce genre comprenne les parasites de plantes, quelques espèces sont ubiquistes et fréquemment trouvées dans les sols. *A.alternata* est la plus commune de ces espèces. Elle est bien adaptée aux conditions de froid, avec une température minimum de croissance allant de  $-5^{\circ}\text{C}$  à  $0^{\circ}\text{C}$  (Simonovicova *et al.*, 2004). La croissance maximum apparaît pour un pH de 4-4,5, mais la croissance est possible pour une gamme de pH allant de 2,7 à 8,0 selon Domsch *et al.* (1980). Elle semble être sensible à la pollution atmosphérique : elle est largement retrouvée dans les biofilms formant des croûtes noires à Lexington, une zone peu polluée, et que très rarement à Cambridge, site pollué (Mitchell *et al.*, 2000). *Alternaria alternata* est capable de se développer en conditions d'anoxie (taux d'oxygène = 0,25%). Les spores contiennent environ 86% d'eau; sous des conditions très sèches, elles restent viables pendant plusieurs années. Les spores d'*Alternaria alternata* sont produites en chaîne, c'est-à-dire que la nouvelle spore est formée par extrusion à la suite de la précédente.

Le genre *Alternaria* Nees ex Fr. comprend plus de 40 espèces. C'est un genre très commun dans le sol ; les espèces dites phylloplan<sup>\*</sup>, *A.alternata* et *A.tenuissima*, sont retrouvées en très grand nombre dans l'air extérieur pendant l'été. La toxicologie des toxines d'*Alternaria* a été passée en revue par Woody et Chu. La toxicité aiguë (DL<sub>50</sub>) des alternariols chez les rongeurs

---

<sup>\*</sup> Phylloplan : microenvironnement d'une feuille. Certains auteurs définissent le phylloplan comme la surface d'une feuille.

semble être d'un ordre de grandeur de 400 mg/kg, ce qui est plutôt bas, même s'ils sont répertoriés comme tératogènes\*\* à des niveaux 10 fois moins élevés. L'acide tenuazonique (DL<sub>50</sub> 10-200 mg/kg chez les rongeurs) est plus toxique et les autres altertoxines sont environ 1000 fois plus toxiques (DL<sub>50</sub> 200µg/kg chez le rongeur). Ren *et al.* montrent que seulement certains alternariols sont produits sur divers matériaux de construction, alors que les altertoxines ne sont pas produites en quantités décelables. Cependant les espèces de ce genre pourraient être la cause de problèmes de santé dans les moisissures de bâtiments, et des métabolites très différents pourraient être produits sélectivement sur les matériaux de constructions (Nielsen, 2002).

#### **4.2. *Aspergillus niger***

C'est une espèce qui est souvent identifiée à partir de prélèvements sur sites de monuments ou bâtiments dégradés (Warscheid et Braams, 2000 ; Urzi *et al.*, 1998). C'est un champignon acidogénique (de la Torre, 1991), c'est-à-dire qu'il produit des acides organiques, tels que l'acide ascorbique, citrique, acétique, gluconique,....

*Aspergillus niger* est une espèce du genre *Aspergillus*. Il existe plus de 160 espèces d'*Aspergillus*. *Aspergillus niger* se développe aussi bien sous peu de lumière (à l'intérieur), que sous la forte lumière de l'extérieur. C'est une espèce toxique et pathogène : elle provoque des otomycoses (mycoses pulmonaires) chez l'homme et les oiseaux. Elle peut provoquer l'aspergillose du conduit auditif externe chez les sujets présentant une lésion préalable ou une malformation anatomique du conduit auditif. Cependant, elle possède des toxines à propriétés insecticides, actives sur les moustiques responsables de la fièvre jaune.

Le mycélium d'*Aspergillus niger* est cloisonné. Les phialides\* sont portées directement par les vésicules dans le cas de têtes unisériées, ou par l'intermédiaire de métules dans le cas de têtes bisériées. Les phialides portent les conidies (ou spores) (Guillaume, 2005).

#### **4.3. *Exophiala sp.***

Les espèces du genre *Exophiala* sont ubiquistes et ont été isolées à partir de nombreux substrats, tels que le bois en décomposition, monuments, eaux polluées (Wand et Zabel, 1990,

---

\*\* Tératogène : se dit des substances susceptibles de provoquer des malformations congénitales par une action sur l'embryon.

\* Phialide : article mycélien fertile en forme de bouteille formant successivement des spores.

Gorbushina et al., 2002). Les cultures en milieu solide sont marron à verdâtre. La texture des colonies peut éventuellement devenir duveteuse en raison du développement des hyphes. Les cellules se reproduisent par bourgeonnement.

#### **4.4. *Coniosporium uncinatum***

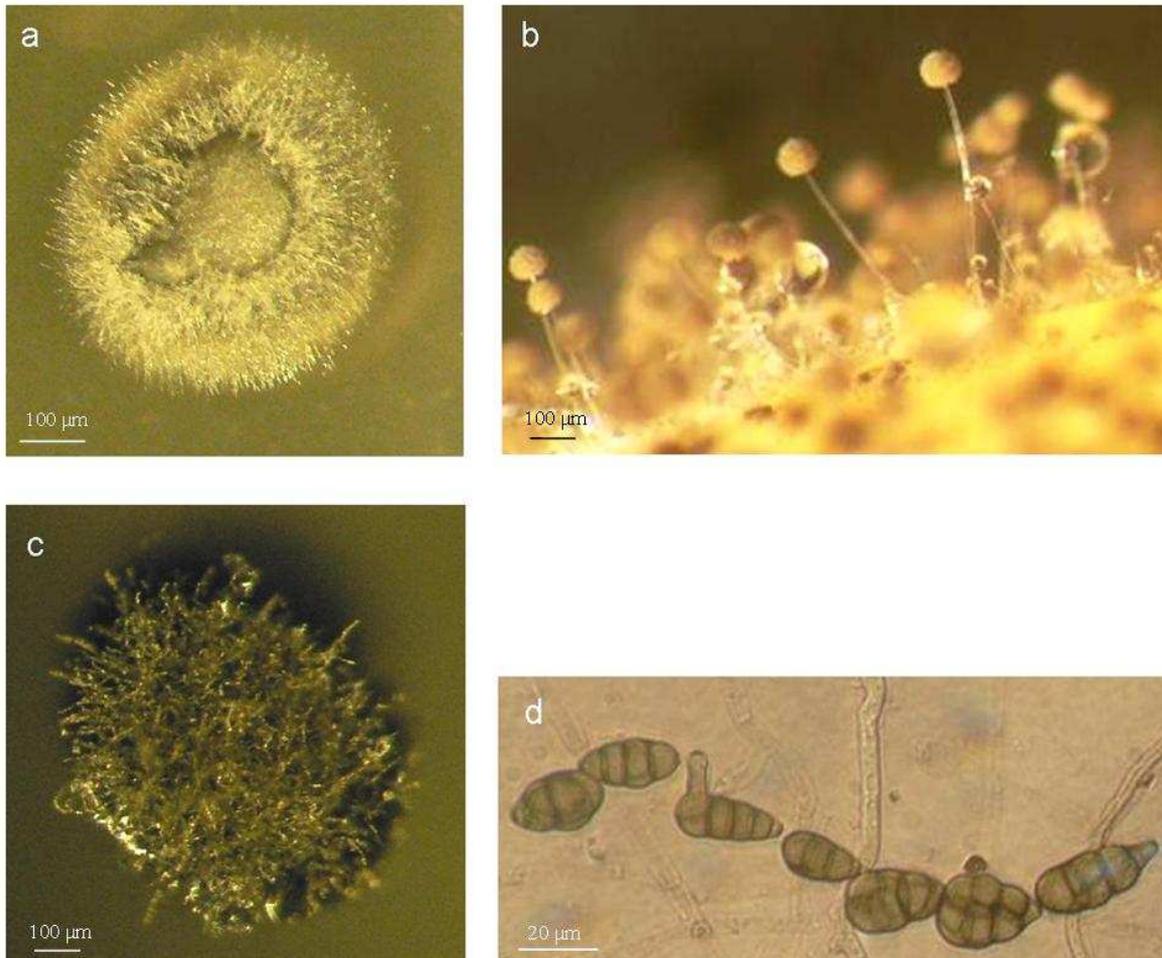
Les espèces de *Coniosporium* sont couramment isolées à partir de monuments localisés dans le bassin méditerranéen. Dans de nombreux cas ils constituent la microflore prédominante, voire même exclusive (Sterflinger, 1995 ; Garcia Valles et al., 1997 ; Urzì et al., 1998). Ceci peut être dû aux conditions extrêmes prévalant sur les matériaux pendant la saison sèche. Les colonies sont de couleur sombre, et atteignent 10 mm de diamètre en 4 semaines de culture sur Maltose Extract Agar. Le mycélium est composé d'hyphes particuliers marron, composés de parois cellulaires épaisses et lisses. Les cellules, presque sphériques, atteignent 6,5 -7,5 µm de longueur pour 5-6 µm de diamètre. On note également la présence d'hyphes terminal caractéristique courbé à l'extrémité des cellules pouvant atteindre 10 µm de longueur. *Coniosporium uncinatum* se développe pour une gamme de température allant de 10 à 30°C. La souche utilisée a été isolée à partir de prélèvements sur des statues en marbre situées dans le jardin du musée de Messine par Filomena De Leo (1999).

### **5. Quantification de la biomasse**

Pour estimer le degré et l'intensité de la biodétérioration d'un matériau, il faut quantifier les micro-organismes, c'est-à-dire quantifier la biomasse fongique. La biomasse peut se définir comme étant la masse totale des organismes vivants présents à un moment donné dans un environnement particulier. Plusieurs méthodes de quantification de la biomasse existent, certaines étant spécifiques à un type de micro-organismes.

Le problème majeur dans l'étude du développement fongique sur substrat solide est l'incapacité à déterminer la biomasse du mycélium directement par la mesure du poids sec ou humide. Ceci a conduit au développement de techniques indirectes pour l'estimation de la biomasse fongique. On trouve des méthodes basées sur l'observation microscopique (Jones et Mollison, 1948 ; Frankland et al., 1981 ; Söderstöm, 1977), où la biomasse est estimée à partir de la longueur des hyphes. Il y a également des méthodes biochimiques, basées sur le dosage chimique de composés cellulaires. Ces composés peuvent être spécifiques aux champignons comme la chitine, les acides gras phospholipides (18 :2ω6, 16 :1ω5), ou l'ergostérol (Seitz et

al., 1979 ; Zelles et al., 1992 ; Frostegard et Baath, 1996). Ils peuvent être également communs à tous les organismes comme les protéines ou l'adénosine triphosphate (ATP) (Gaunt et al., 1985 ; Barajas-Aceves et al., 2002). Parmi ces méthodes nous avons choisi de développer pour notre étude un dosage spécifique de la biomasse fongique : celui de l'ergostérol, et un plus global : le dosage des protéines qui permet l'estimation de la biomasse microbienne totale.



**Planche 2 : Observation de culture sur milieu solide (a) *Exophiala* sp., (b) *Aspergillus niger*, (c) *Coniosporium uncinatum* , (d) *Alternaria alternata***

### 5.1. Dosage de l'ergostérol

L'ergostérol est utilisé pour la mesure de la biomasse fongique car c'est un stérol endogène et prédominant trouvé seulement dans la membrane cellulaire des champignons (Weete, 1989),

et de certaines microalgues et protozoaires\* (Newell, 1992). Le dosage de l'ergostérol a été d'abord décrit pour le domaine de l'agriculture (Seitz et al., 1979). L'ergostérol joue un rôle important dans la croissance des champignons (Lees *et al.*, 1995). Il se trouve dans la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, principalement dans un état libre, et à un moindre degré estérifié en acide gras (Martin *et al.*, 1990). La biomasse fongique est déterminée en utilisant un facteur de conversion « Ergosterol-à-Biomasse fongique » à partir de cellules cultivées dans des cultures pures (Antibus *et al.*, 1993 ; Gessner *et al.*, 1993).

Saxena *et al.* (2001) ont démontré que la production d'ochratoxine A (OA) suivait la même tendance que la production d'ergostérol. Ainsi, le dosage d'ergostérol pourrait être utilisé comme indicateur de la production potentielle d'OA. L'OA est une mycotoxine produite par *Aspergillus ochraceus*, certaines souches d'*Aspergillus niger* et *Penicillium verrucosum* (Pitt *et al.*, 1997). Il est considéré que l'OA pourrait être une cause possible (jamais prouvée) d'une maladie humaine, connue sous le nom de néphropathie endémique des Balkans. Il a été également montré que l'OA est néphrotoxique (organe cible : le rein), génotoxique et cancérigène.

L'ergostérol est un excellent marqueur pour la quantification de la biomasse fongique sur les matériaux de construction et peut aussi être utilisé comme marqueur d'exposition dans l'air ou la poussière, employé spécialement par Larsson *et al.*, et Miller *et al.* (Nielsen, 2002).

Pour minimiser les erreurs de mesures, il peut être intéressant de comparer la quantité d'ergostérol à la concentration en ATP\*. Contrairement à l'ergostérol, le dosage de l'ATP n'est pas spécifique à la biomasse fongique, mais permet la mesure de biomasse microbienne totale (bactéries, champignons, protozoaire) (Ruzicka, 2000).

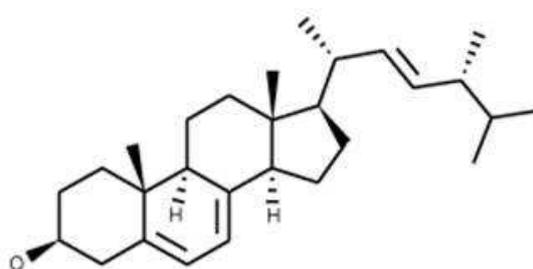


Figure 9 : Formule chimique développée de l'ergostérol

\* Protozoaire : organisme unicellulaire eucaryote.

\* ATP : Adénosine Tri-Phosphate. C'est une molécule dont la dégradation libère beaucoup d'énergie, récupérée pour le fonctionnement de nombreuses réactions chimiques.

Les techniques de dosages de l'ergostérol s'appuient sur une caractéristique de cette molécule : son absorbance à 282 nm, caractéristique que ne possèdent pas les autres stérols, ceci réduit donc la possibilité d'interférence pendant l'analyse chromatographique (Newell, 1992).

L'ergostérol est analysé par GC-MS (Larsson et Saraf, 1997), par HPLC (Gong, 2001), HPLC et GC-MS (Axelsson et al., 1995 ; Dales *et al.*, 1997) ou encore par GC-MS-MS (Nielsen *et al.*, 2000).

## 5.2. Le dosage des protéines

Les protéines sont des macromolécules, assemblages d'acides aminés, qui sont présentes chez tous les organismes vivants. On parle de protéine lorsque plus de 100 acides aminés sont liés au sein d'une chaîne d'acides aminés. Les propriétés des acides aminés (charge, hydrophobicité...) gouvernent la structure de la protéine, globulaire ou fibrillaire. Les protéines ont des fonctions très diverses : certaines pourront avoir une fonction structurale (elles participent à la cohésion structurale des cellules entre elles), enzymatique (elles catalysent les réactions chimiques de la matière vivante) ou encore une fonction de messenger (pour les protéines impliquées dans des processus de signalisation cellulaire).

Parmi les méthodes de dosage des protéines, la méthode de Bradford, est couramment utilisée car elle nécessite un appareillage simple (spectrophotométrie UV-vis), et c'est une méthode rapide. Le réactif de Bradford est utilisé pour déterminer la concentration en protéines en solution. Le dosage est basé sur la formation d'un complexe entre le colorant, bleu de Coomassie G250, et les protéines en solution. Le complexe protéines-colorant crée un changement du maximum d'absorbance du colorant entre 465 et 595 nm. L'absorption est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le milieu.

Comme le dosage de l'ATP, le dosage des protéines, n'est pas spécifique à la biomasse fongique, mais permet de mesurer la biomasse microbienne totale.

## 6. Conclusion

Ce chapitre a permis de souligner la place importante qu'occupent les champignons dans la biodétérioration des matériaux de construction. Les points importants à retenir sont :

- 
- Les champignons sont responsables d'une biodétérioration esthétique (essentiellement due à la présence de pigment fongique), chimique (via la production d'acides organiques), et physique (pénétration en profondeur des hyphes dans la matrice).
  - Quatre grandes catégories de champignons sont impliquées dans la biodétérioration : (i) les hyphomycètes producteurs de mélanine comme *Alternaria alternata*, (ii) les hyphomycètes acidogéniques tel qu'*Aspergillus niger*, (iii) les « yeast like fungi » comme *Exophiala* sp. et (iv) les champignons méristématiques avec *Conosporium uncinatum*.
  - La quantification de la biomasse peut être réalisée par le dosage de l'ergostérol et le dosage des protéines.