
Des insectes mangeurs de plastiques à l'étude de la biodégradation des polymères par les micro-organismes de leurs tubes digestifs

Auteur : Rousseau, Zoé

Promoteur(s) : Francis, Frédéric; Delvigne, Frank

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : sciences et technologies de l'environnement, à finalité spécialisée

Année académique : 2021-2022

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/15459>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**DES INSECTES MANGEURS DE PLASTIQUES A
L'ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES
POLYMERES PAR LES MICRO-ORGANISMES DE
LEURS TUBES DIGESTIFS**

ZOÉ ROUSSEAU

TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT

ANNEE ACADEMIQUE 2021 - 2022

(CO)-PROMOTEURS : FRANCIS FRÉDÉRIC & DELVIGNE FRANK

© Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

© Any reproduction of this document, by any means whatsoever, is only allowed with the authorization of the author and the academic authority of Gembloux Agro-Bio Tech.

This document reflects only the views of its author.

**DES INSECTES MANGEURS DE PLASTIQUES A
L'ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES
POLYMERES PAR LES MICRO-ORGANISMES DE
LEURS TUBES DIGESTIFS**

ZOÉ ROUSSEAU

TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT

ANNEE ACADEMIQUE 2021 - 2022

(CO)-PROMOTEURS : FRANCIS FRÉDÉRIC & DELVIGNE FRANK

Remerciements

Ce mémoire est le fruit d'un travail de recherche de près de six mois. En préambule, je désire exprimer ma reconnaissance aux personnes qui m'ont aidée pour cette rédaction.

Je souhaite tout d'abord remercier Monsieur Frédéric Francis, mon promoteur, qui a toujours fait preuve de disponibilité et d'intérêt malgré son emploi du temps chargé. Sa supervision ainsi que ses conseils avisés ont été très précieux tout au long de ce travail.

Je remercie également Lallie Glacet, pour son suivi, sa patience et le temps qui m'a été accordé. Ce travail de fin d'étude n'aurait pas pu voir le jour sans son accompagnement, son dynamisme et ses pistes de réflexion.

Je voudrais adresser mes remerciements aux membres de l'unité d'entomologie fonctionnelle et évolutive pour l'accueil durant ce quadrimestre. Un merci tout particulier à Emilie, Ibtissem, Jeanine, Sandra et Didier pour le matériel, la disponibilité, et le partage d'expérience. Merci également au personnel du Bureau Environnement et Analyses de Gembloux (BEAGx) pour la collaboration, spécialement Virginie, qui s'est toujours montrée de bons conseils et d'une aide essentielle.

Merci aux camarades de STE qui m'ont épaulée et accompagnée, que ce soit pour des manipulations, du code, de la mise en page, de la relecture ou encore un support moral lorsque nécessaire. De manière plus générale, je suis extrêmement reconnaissante pour ces deux belles années de Master. Merci pour les rencontres et l'intégration, merci de m'avoir donné un aperçu de l'esprit gembloutois.

Je témoigne toute ma gratitude à ma famille, mes frères et sœurs et mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée, quelles que soient les circonstances. Merci pour la présence, la prévenance et l'implication.

Les moments passés auprès de mes acolytes du mardi ont également su nourrir mes réflexions et m'ont amené des compétences essentielles à la réalisation de ce travail. Merci spécialement à mes colocataires, qui ont vécu avec moi ce quadrimestre laborieux/rythmé/éprouvant, et qui m'ont apporté réconfort et écoute.

Enfin, un merci particulier à toi, pour m'avoir accompagné jusqu'ici sans défaillir. Merci pour les remises en question et la bienveillance. Je te souhaite le meilleur.

Résumé

Dans le contexte mondial actuel, la demande en matières premières ne cesse de croître, et des millions de tonnes de plastique sont produites chaque année. Les systèmes de dégradation étant non performants, ces composés s'accumulent dans l'environnement jusqu'à constituer de réels dangers pour les organismes vivants et les écosystèmes. Des voies alternatives sont alors envisagées, comme la biodégradation, impliquant l'utilisation de microorganismes. Il a par conséquent été mis en évidence que certaines espèces d'insectes, telles que *Tenebrio molitor* et *Galleria mellonella*, disposent de capacités leur permettant de dépolymériser le plastique.

Le présent travail s'inscrit dans ce contexte d'élimination des déchets plastiques au moyen de techniques de gestion alternatives - plus spécifiquement celles impliquant l'exploitation du microbiote intestinal de *G. mellonella* et de *T. molitor*. Une fois les populations de chaque espèce initiées, les conditions d'élevage ont été standardisées. Par la suite, un dispositif expérimental a été mis au point, visant à développer une diète standardisée à base de plastique. Les tests de croissance ont permis de sélectionner pour *T. molitor* une diète à base de 50% de farine et de son, avec 50% de polyuréthane solide. Des pistes d'amélioration du dispositif concernant *G. mellonella* ont été avancées, au vu du manque d'efficacité du système actuel et de l'absence de résultats satisfaisants.

En outre, l'étude du microbiome intestinal de ces insectes a été entamée au moyen d'une caractérisation morphologique des isolats bactériens selon le traitement administré. De premières hypothèses ont alors pu être avancées sur les colonies associées ou non à la dépolymérisation de plastique. Elles seront confirmées par le séquençage de l'ADN et des protéines du tube digestif des larves, ici amorcé.

Ce travail permet donc une meilleure compréhension des relations entre taux de plastique administré et croissance des individus, tout en fournissant une première approche du microbiote intestinal d'insectes ingérant le plastique. Les conclusions qui en découlent constituent une base au projet *PLASTINSECT*, visant à étudier les processus biochimiques impliqués dans la décomposition de polymères par *T. molitor* et *G. mellonella*.

Abstract

In the current global context, the demand for raw materials is constantly increasing, and millions of tons of plastic are produced every year. As degradation systems are inefficient, these compounds accumulate in the environment until they constitute real dangers for living organisms and ecosystems. Alternative ways of degradation are then considered, such as biodegradation, involving the use of microorganisms. It has therefore been shown that some species of insects, such as *Tenebrio molitor* and *Galleria mellonella*, have the ability to depolymerize plastic.

The present work is part of this context of plastic waste disposal by means of alternative management techniques - more specifically those involving the exploitation of the intestinal microbiota of *G. mellonella* and *T. molitor*. We started new insect populations for which rearing conditions have been standardized. Subsequently, an experimental set-up was elaborated to develop a standardized plastic-based diet. The growth tests allowed the selection of a diet for *T. molitor* based on 50% flour and bran, with 50% solid polyurethane. The lack of efficiency of the current system and the absence of satisfactory results have led to the improvement of the system for *G. mellonella*.

In addition, the study of the intestinal microbiome of these insects was initiated through a morphological characterization of the bacterial isolates according to the administered treatment. First hypotheses could then be put forward on the colonies associated or not with the degradation of plastic. These hypotheses will be confirmed by sequencing the DNA and proteins of the larval digestive tract, which has been initiated here. This work allows thus a better understanding of the relationship between the level of plastic administered and the growth of individuals, while providing a first approach to the gut microbiota of plastic-degrading insects. The resulting findings provide a basis for the *PLASTINSECT* project aimed at studying the biochemical processes involved in polymer degradation by *T. molitor* and *G. mellonella*.

Table des matières

I	Introduction	1
II	Objectifs	2
III	Bibliographie	3
1	<i>Tenebrio molitor</i>	3
1.1	Taxonomie, origine, distribution	3
1.2	Biologie	4
1.2.1	Généralités	4
1.2.2	Cycle de vie	4
1.2.3	Reproduction et développement	6
1.3	Alimentation	6
1.4	Microbiome du tube digestif	7
1.5	Dégradation de polymères	8
2	<i>Galleria mellonella</i>	9
2.1	Taxonomie, origine, distribution	9
2.2	Biologie	9
2.2.1	Généralités	9
2.2.2	Cycle de vie	10
2.2.3	Reproduction et développement	12
2.3	Alimentation	12
2.4	Microbiome du tube digestif	13
2.5	Dégradation de polymères	13
3	Polymères	14
3.1	Polyéthylène	14
3.1.1	Formule chimique	14
3.1.2	Propriétés et utilisations	14
3.1.3	Dégradation	14
3.2	Polystyrène	15
3.2.1	Formule chimique	15
3.2.2	Propriétés et utilisations	15
3.2.3	Dégradation	15
3.3	Polyuréthane	16
3.3.1	Formule chimique	16
3.3.2	Propriétés et utilisations	16
3.3.3	Dégradation	17
IV	Matériels et méthodes	18
1	Matériel biologique : élevages	18
1.1	Élevage de <i>Tenebrio molitor</i>	18
1.2	Élevage de <i>Galleria mellonella</i>	18
2	Tests de croissance et optimisation des diètes	19
2.1	Test préparatoire	19
2.2	Dispositif expérimental et suivi de l'expérience pour <i>Tenebrio molitor</i>	20
2.3	Dispositif expérimental et suivi de l'expérience pour <i>Galleria mellonella</i>	21
3	Préparation des échantillons	21
4	Extractions génomique et protéomique	22
4.1	Désintégration cellulaire et homogénéisation	22

4.2	Extraction d'ARN, d'ADN et des protéines	23
4.3	Analyse des résultats du séquençage	23
5	Caractérisation des communautés bactériennes du tube digestif	23
5.1	Mise en culture sur milieu solide	23
5.2	Coloration de Gram	24
6	Analyses statistiques	24
V	Résultats	26
1	Tests de croissance	26
1.1	<i>Tenebrio molitor</i>	26
1.1.1	Effet du traitement sur la mortalité et le nombre de métamorphoses	26
1.1.2	Effet du traitement sur la prise de poids	27
1.1.3	Influence du poids initial sur la prise de masse	27
1.1.4	Comparaison des moyennes	28
1.2	<i>Galleria mellonella</i>	29
2	Caractérisation des communautés bactériennes du tube digestif	29
2.1	Identification morphologique	30
2.2	Récapitulatifs	33
VI	Discussion	34
1	Gestion des élevages	34
1.1	<i>Tenebrio molitor</i>	34
1.2	<i>Galleria mellonella</i>	34
2	Dispositif expérimental	34
3	Tests de croissance	35
3.1	Effet du traitement sur le taux de mortalité et l'émergence	35
3.2	Effet du traitement sur la prise de poids	35
3.3	Effet du poids initial sur la prise de poids	36
3.4	Choix du taux d'incorporation et de la forme	36
4	Caractérisation des communautés bactériennes du tube digestif	36
4.1	Mises en culture sur milieu solide	36
4.2	Résultats du séquençage	37
4.2.1	<i>Tenebrio molitor</i>	37
4.2.2	<i>Galleria mellonella</i>	37
VII	Conclusions	38
	Bibliographie	39
	Annexes	46

Table des figures

1	Répartition géographique des espèces sauvages du genre <i>Tenebrio</i> (Linné) (LECLERCQ, 1948a)	3
2	Cycle de vie de <i>Tenebrio molitor</i> (SINGH, 1975)	4
3	Photographie de tous les stades larvaires de <i>Tenebrio molitor</i> (PARK et al., 2014)	5
4	Système digestif de <i>Tenebrio molitor</i> (PETERSEN, 1986)	6
5	Abondance relative des phyla (a) et des genres (b) prédominants (10 premiers) dans l'intestin des vers de farine nourris avec les différents régimes (LOU et al., 2021)	7
6	Dégradation du polystyrène par les vers de farine (YANG et al., 2015a)	8
7	Schéma du système proposé pour la dégradation des polystyrènes dans l'intestin de <i>Tenebrio molitor</i> (YANG et al., 2015a)	8
8	Distribution globale de la fausse teigne de la ruche en décembre 2016 dans les régions apicoles (KWADHA et al., 2017)	9
9	Différents stades larvaires de <i>Galleria mellonella</i> (DESAI et al., 2019)	11
10	Dimorphisme sexuel chez la nymphe de <i>Galleria mellonella</i> (KWADHA et al., 2017)	11
11	Dimorphisme sexuel chez l'imago de <i>Galleria mellonella</i> (DESAI et al., 2019)	12
12	Anatomie de <i>Galleria mellonella</i> (SINGKUM et al., 2019)	13
13	Structure chimique du polyéthylène pur (PEACOCK, 2000)	14
14	Formule chimique du polystyrène (HO et al., 2018)	15
15	Voie commune de synthèse du polyuréthane (AKINDOYO et al., 2016)	16
16	Exemples d'utilisation courante du polyuréthane (PU) selon les principales catégories (AKINDOYO et al., 2016)	16
17	Évolution du système de cages pour l'élevage de <i>Galleria mellonella</i> (Rousseau 2022)	18
18	Évolution du dispositif expérimental avant (A) et après (B) le test préliminaire (Rousseau 2022)	20
19	Différentes modalités de diètes testées pour <i>Tenebrio molitor</i> (PU : polyuréthane, diète : 1/3 de son pour 2/3 de farine de blé, x10 : chaque régime étudié sur 10 vers, x3 : expérience reproduite à trois reprises)	20
20	Différentes modalités de diètes testées pour <i>Galleria mellonella</i> (PE : polyéthylène, diète : recette (METWALLY et al., 2012), x10 : chaque régime étudié sur 10 vers, x3 : expérience reproduite à trois reprises)	21
21	Tube digestif (bouche : haut à droite) de la larve de (A) <i>Galleria mellonella</i> (Photographie : Latour 2018) et (B) <i>Tenebrio molitor</i> (Photographie : Rousseau 2022) positionnée sur la face ventrale, au stéréomicroscope	21
22	Schéma de la méthodologie appliquée pour l'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'acide ribonucléique (ARN) et les protéines (Qiagen, 2020)	22
23	Bactéries Gram positives (A) et Gram négatives (B) après une coloration de Gram	24
24	Nombre de larves mortes et métamorphosées de <i>Tenebrio molitor</i> au cours de l'expérience pour chaque traitement (1 : PU 100%, 2 : diète 100%, 3 : PU poudre 33%, 4 : PU poudre 50%, 5 : PU solide 33%, 6 : PU solide 50%)	26
25	Moyennes des différences de poids cumulées [g] des larves de <i>Tenebrio molitor</i> au cours du temps pour chaque traitement	27
26	Relation entre le poids initial [g] (jour 0) et le poids final [g] (jour 31) pour chaque individu de <i>Tenebrio molitor</i> selon le traitement, avec (A) ou sans (B) droite de régression linéaire	28
27	Comparaison des moyennes des différences de poids cumulées de <i>Tenebrio molitor</i> au cours du temps entre les traitements	28
28	Évolution du poids [g] des larves de <i>Tenebrio molitor</i> après 31 jours d'expérience selon le traitement	29
29	Galerie creusée dans le PU par une larve de <i>Tenebrio molitor</i>	36

Liste des tableaux

1	Durée des stades du cycle de vie de <i>Galleria mellonella</i> (traduit de WARREN et HUDDLESTON, 1962)	10
2	Résumé des différentes utilisations de polystyrène selon le type (HO et al., 2018)	15
3	Tableau récapitulatif de l'identification morphologique des colonies bactériennes	33
4	Tableau récapitulatif de la présence des colonies dans les traitements et des résultats du test Gram	33

Acronymes

ADN acide désoxyribonucléique

ARN acide ribonucléique

ARNr acide ribonucléique ribosomique

EPS mousse de polystyrène expansé

GPPS polyéthylène à usage général

HIPS polystyrène à haut impact

HR humidité relative

LC-MS/MS spectrométrie de masse en tandem

mL millilitres

mm millimètres

mM millimoles

PBS phosphate-buffered saline

PE polyéthylène

PEBD polyéthylène basse densité

PEHD polyéthylène haute densité

PET polyéthylène téréphtalate

pH potentiel hydrogène

PLA polylactide

PP polypropylène

PS polystyrène

PU polyuréthane

PVC polychlorure de vinyle

Rpm Revolution per minute

Première partie

Introduction

La demande en matières premières n'a cessé de s'accroître au fil des années, corrélée aux avancées scientifiques et technologiques ainsi qu'à l'augmentation de la population (Samways, 2022), le recours aux matériaux plastiques en particulier. Ces derniers se sont immiscés dans la plupart des secteurs économiques, que ce soit l'automobile, la construction, l'agriculture ou encore l'emballage (Eriksen et al., 2019). À travers le monde, 380 millions de tonnes de plastique sont produits chaque année (Celik et al., 2019). En Europe plus spécifiquement, cette consommation de polymères a atteint 50,7 millions de tonnes en 2019 (PlasticsEurope, 2019).

Parmi les catégories de plastiques les plus répandues, beaucoup sont dérivées du pétrole : polystyrène (PS), polyéthylène (PE), polypropylène (PP), polyuréthane (PU), polychlorure de vinyle (PVC) et polyéthylène téréphtalate (PET). Ces composés possèdent des propriétés recherchées et sont donc employés pour un grand nombre d'applications (Geyer et al., 2017). Or, du fait de leur nature stable largement exploitée, la plupart de ces polymères sont résistants à la dégradation (Geyer et al., 2017), cette dernière pouvant être définie comme un changement physique ou chimique de la substance sous l'action de facteurs environnementaux (Shah et al., 2008). En effet, les plastiques dérivés du pétrole sont majoritairement dénués de groupes fonctionnels typiques sensibles à l'hydrolyse enzymatique, mécanisme de dégradation dominant (Billen et al., 2020).

De ce fait, depuis quelques décennies, l'accumulation de ces déchets plastiques fait l'objet de réelles préoccupations environnementales (Johansen et al., 2022). Cette hausse, encouragée par une augmentation globale du niveau de vie et une croissance économique soutenue, met en avant les lacunes des systèmes de gestion des plastiques. Il est possible de citer le manque d'espace dans les décharges ou encore les faibles taux de recyclage de certaines matières, qui génèrent inévitablement des répercussions sur le milieu. Les microplastiques sont par exemple devenus des problèmes émergents, qui mettent en danger le vivant en contaminant les écosystèmes et en s'accumulant dans les eaux, les sols et l'atmosphère (Carmen, 2021 ; Li et al., 2018).

Ne disposant pas de moyen durable d'altération des déchets plastiques, différentes méthodes sont exploitées pour tenter d'y remédier. Depuis les années 1970, la biodégradation est étudiée comme processus alternatif de dégradation de polymères plastiques (Guillet et al., 1974). Elle implique l'utilisation de micro-organismes tels que les champignons et les bactéries afin d'exploiter les polymères comme substrat pour leur croissance (Bhardwaj et al., 2012). Cependant, les taux de dégradation du plastique par les isolats bactériens restent faibles (Austin et al., 2018 ; Shah et al., 2008 ; Tokiwa et al., 2009).

En 1954, Gerhardt et Lindgren mettaient en avant l'aptitude de neuf espèces d'insectes, ravageurs des denrées stockées, à pénétrer dans les films de polyéthylène (Riudavets et al., 2007). À ce jour, outre *Tenebrio molitor*, le ver de farine, six insectes auraient la capacité de décomposer la structure du plastique selon un modèle de dépolymérisation (Brandon et al., 2018 ; Kundungal et al., 2019 ; Peng et al., 2020) : *Achroia grisella* (Pyralidae), *Tenebrio obscurus* (Tenebrionidae), *Zophobas atratus* (Tenebrionidae), *Plesiophthalmus davidis* (Tenebrionidae), *Plodia interpunctella* (Pyralidae) et *Galleria mellonella* (Pyralidae). Cette méthode de dégradation du plastique s'avère efficace et intéressante à approfondir dans la mesure où les taux de consommation de plastique sont plus hauts que pour les autres espèces de bactéries et de champignons isolées (Brandon et al., 2018 ; Jiang et al., 2021 ; Yang et al., 2015a, 2015b). Par ailleurs, la lumière intestinale de ces espèces d'insectes abrite une grande variété de micro-organismes jouant un rôle clé dans les phénomènes de dépolymérisation (Genta et al., 2006 ; Lou et al., 2021 ; Yang et al., 2015a).

Deuxième partie

Objectifs

La présente étude s'inscrit dans la problématique actuelle de gestion des déchets plastiques au moyen de techniques de dégradation alternatives, et plus particulièrement celles impliquant l'exploitation du microbiote intestinal d'insectes consommant du plastique. En outre, ce travail a pour but de contribuer à un projet visant le développement de nouveaux procédés de dégradation. Et ce, via l'analyse du microbiome présent dans le tube digestif de deux types d'insectes au stade larvaire : le ver de farine, *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) et la fausse teigne la ruche, *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758). Il s'agira donc d'évaluer le taux et la forme de plastique les plus adaptés à une croissance optimale des larves en vue de développer des élevages sous ces nouvelles conditions.

Pour ce faire, une standardisation des conditions d'élevage des deux espèces a été réalisée, dans le but de disposer en continu des stades larvaires des deux insectes. Par la suite, des tests ont été mis en place afin d'optimiser les diètes contenant du plastique, de sorte à sélectionner celle maximisant la prise de poids et la consommation de plastique des individus tout en minimisant leur taux de mortalité. Par après, a été amorcée l'étude des communautés microbiennes présentes dans le tube digestif des larves exposées à ces régimes. Le séquençage du gène codant pour l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr) 16S va alors permettre d'identifier les genres et espèces des isolats bactériens. D'autre part, au moyen d'une analyse du protéome par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), qui va pousser plus loin la caractérisation et la détermination quantitative des souches bactériennes. Par ailleurs, l'autre moitié des tubes digestifs (non soumise à l'extraction) a été mise en culture afin d'observer les communautés bactériennes cultivables selon les régimes.

En plus d'apporter une connaissance approfondie du taux de plastique le plus adéquat à fournir aux larves, ce travail fournit également une approche comparative de l'impact de différentes formes et quantités de polymères sur la croissance de deux modèles d'insectes. Ces avancées permettront à l'avenir d'établir des élevages sous ces conditions, pour ensuite étudier le microbiote intestinal et *in fine* sélectionner les procédés de dégradation de matières plastiques les plus efficaces, pouvant être reproduits en bioréacteurs.

Troisième partie

Bibliographie

1 *Tenebrio molitor*

1.1 Taxonomie, origine, distribution

Domaine : Biota
Règne : Animalia
Phylum : Arthropoda
Classe : Insecta
Ordre : Coleoptera
Famille : Tenebrionidae
Genre : *Tenebrio*
Espèce : *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758)

Tenebrio molitor (Linnaeus, 1758), autrement connu sous l'appellation de ver de farine ou ténébrion meunier, est un insecte de l'ordre des Coleoptera appartenant à la famille des Ténébrionidés, taxon qui comprend environ 20 000 espèces dans 2 300 genres dans le monde (Eriksson et al., 2020). Bien que la famille se soit établie sur tous les continents, la plupart de ces espèces préfèrent les climats chauds : beaucoup sont xérophiles et colonisent déserts et zones arides. Toutefois, certaines espèces sont malgré tout recensées dans les régions froides telles que la Laponie ou la Sibérie (Leclercq, 1948a).

Le genre *Tenebrio* comporte quant à lui 26 espèces dans la nature. Les régions habitées par ce dernier sont les suivantes : Europe centrale et septentrionale, Nord de l'Afrique, Est et Ouest Africain, Inde, Japon, Amérique du Nord et Eurasie (Leclercq, 1948a). Les hypothèses convergent dans l'idée que le genre trouverait son origine en région eurasiatique, entre la Volga, le Golfe Persique et le Plateau de Pamir. Le berceau du genre *Tenebrio* serait donc la région se situant au centre de la zone de répartition, illustrée en Figure 1 (Cotton et Saint George, 1929 ; Leclercq, 1948a).

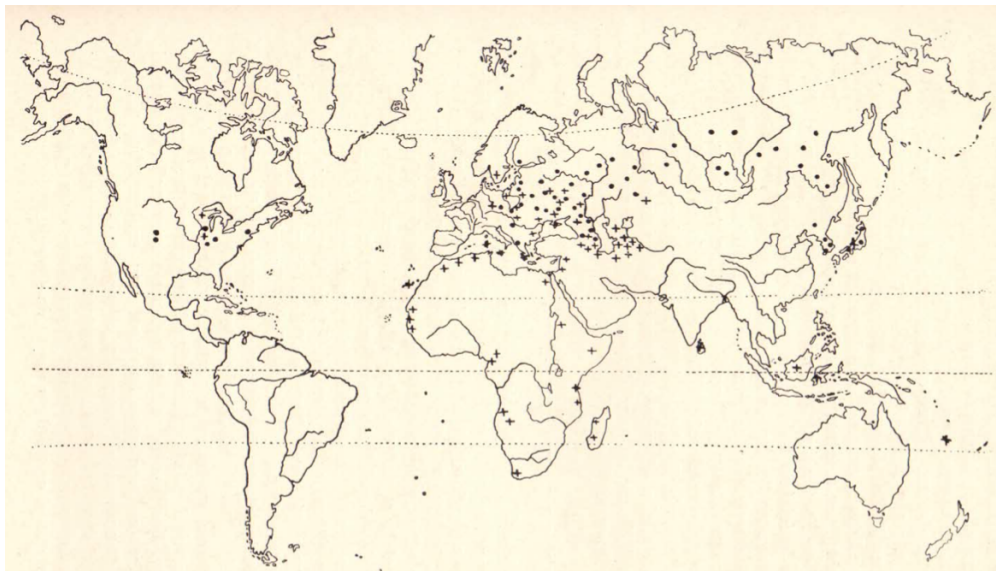


FIGURE 1 – Répartition géographique des espèces sauvages du genre *Tenebrio* (Linné) (Leclercq, 1948a)

En ce qui concerne *Tenebrio molitor* plus particulièrement, l'espèce est qualifiée de cosmopolite, c'est-à-dire pouvant être retrouvée dans un grand nombre de pays, répartis partout sur Terre. Néanmoins, il n'est pas exact de parler d'ubiquité puisque ce spécimen est très fréquent dans certaines régions et extrêmement peu recensé dans d'autres (Leclercq, 1948a). Cet insecte se développe majoritairement dans les régions tempérées. En effet, c'est en Europe, en Asie Moyenne, en Amérique du Nord et en Australie qu'ils sont les plus abondants. *A contrario*, ils sont peu présents dans les zones intertropicales. De manière plus générale, les vers de farine sont plus représentés dans l'hémisphère

nord que dans l'hémisphère sud, où ils ont été introduits par navigation. Comme l'ont mis en avant Cotton et Saint George (1929), une seconde grande zone où abondent les vers de farine sont les États-Unis. Cela s'expliquerait par divers facteurs, tels que l'économie agricole ou encore le climat, favorable au développement de ces populations d'insectes dès leur introduction sur l'aire géographique. De ce fait, les régions importatrices de céréales constituent des berceaux majeurs de développement de ces espèces (Leclercq, 1948a). Selon leurs habitudes au stade larvaire et au stade imago, les espèces de *Tenebrionidae* peuvent être classées en plusieurs groupes : habitant les céréales, les bois en décomposition ou encore les champignons (Daggy, 1946). Les habitats de prédilection de *T. molitor* sont plus particulièrement les endroits sombres et humides, tels que les entrepôts, moulins ou magasins de céréales (Singh, 1975) ou encore la végétation forestière en décomposition (Howard, 1955).

1.2 Biologie

1.2.1 Généralités

Les coléoptères *T. molitor* sont de petite taille, 13 à 17 millimètres (mm) de long. Ils sont noirs ou de couleur sombre, aux antennes moniliformes et pièces buccales de petite taille. Les larves sont, quant à elles, longues, fines et vermiformes. Elles sont de couleur plus claire et sont moins sclérifiées que les adultes (Howard, 1955). Ces spécimens représentent des ravageurs des produits céréaliers stockés. En effet, les larves de ces coléoptères sont considérées comme destructrices et parasites de denrées alimentaires telles que la farine, les grains ou le maïs (Cotton et Saint George, 1929). Il a été mis en avant que des conditions optimales pour l'élevage des vers de farine impliquent une température de 25 à 28°C et une humidité relative (HR) de 60 à 70%. Par contre, ces insectes peuvent survivre dans des conditions extrêmement sèches pendant de longues périodes, car ils sont capables de retirer de l'eau de la nourriture ingérée et de l'atmosphère (Ribeiro et al., 2018). En effet, ils ont la particularité d'absorber activement l'eau de l'air bien que le point de saturation ne soit pas atteint. Cette absorption peut avoir lieu dans différents organes, notamment le rectum des larves. Ce processus requiert de l'énergie, car il implique d'outrepasser la différence substantielle d'activité de l'eau entre l'atmosphère et l'activité de l'hémolymphe (Hansen et al., 2004).

1.2.2 Cycle de vie

Le ténébrion meunier passe par quatre stades majeurs de développement tout au long de son existence : stades larvaire, nymphal, imago et œufs (Figure 2). Lorsqu'il suit son cycle naturel, dans des conditions non contrôlées, *T. molitor* passe généralement l'hiver au stade de larve. L'adulte émerge par la suite au printemps et au début de l'été, vit ensuite durant 2-3 mois puis meurt (Cotton, 1927). En revanche, lorsqu'il est soumis à des conditions de laboratoire, le ver de farine peut compléter son développement d'œuf à adulte dans un laps de temps plus court et ainsi effectuer plus d'une génération par an. La durée totale du cycle de vie dépend notamment de la température et de l'âge des parents, comme mis en avant par Ludwig et Fiore (Ludwig et Fiore, 1960). Lorsque les conditions sont optimales et que le cycle entier est réalisé dans le même habitat, il peut durer entre 75 et 90 jours (Park et al., 2013 ; Ribeiro et al., 2018).

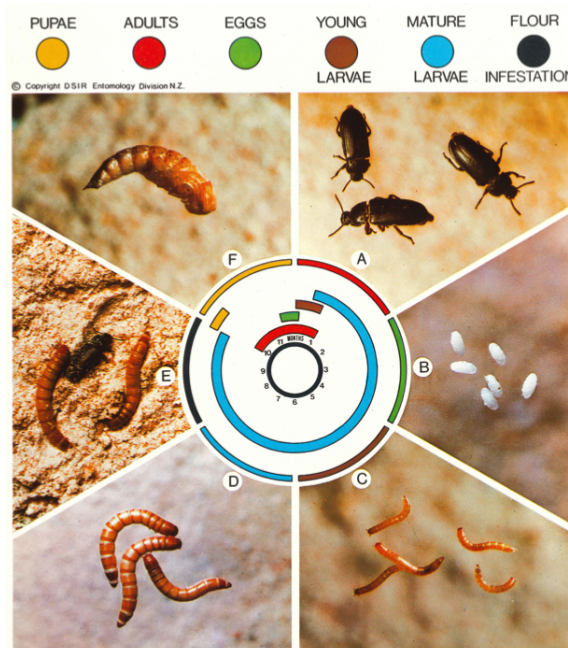


FIGURE 2 – Cycle de vie de *Tenebrio molitor* (Singh, 1975)

Œufs

L'œuf de *T. molitor* est ovale, opaque, blanc laiteux et brillant. Il mesure environ 1,5 mm de long et 0,60 mm de large (Singh, 1975). Une femelle peut pondre tout au long de son cycle de vie entre 250 à 1 000 œufs, isolés ou regroupés en amas, fixés au substrat ou aux parois des récipients où ils sont pondus (Ribeiro et al., 2018). Le nombre d'œufs générés au cours d'une journée varie, le nombre moyen d'œufs pondus par une femelle durant l'oviposition est de 276. Une sécrétion collante recouvre ces œufs fraîchement pondus (Cotton et Saint George, 1929), qui éclosent en 4 jours à 26-30°C, mais peuvent nécessiter jusqu'à 34 jours à 15°C (Kim et al., 2015).

Larves

La larve est initialement blanche, mais tend vers le brun jaunâtre au fur et à mesure de sa croissance, passant de 2 à 25 mm environ. Le nombre de stades larvaires varie de 9 à 21 (Figure 3) et la durée totale du stade oscille entre 57 jours en conditions contrôlées, jusqu'à 629 jours en conditions ambiantes (Cotton, 1927). Lorsque la température est de 30°C, la durée de la période larvaire est en moyenne de 165 jours (Kim et al., 2015).

Une fois prêtes à se nymphoser, les larves adoptent des comportements géonégatifs, migrent vers la surface du milieu nutritif et restent quelques jours au stade de prépupe (Singh, 1975). Morphologiquement, les prépupes sont donc des larves en instance de métamorphose, à l'aspect immobile et recourbé, dont la couleur évolue de brun à blanc. Dans des conditions non contrôlées, en entrepôts non chauffés par exemple, les larves ne se transforment pas en nymphes durant plusieurs mois alors qu'en laboratoire, ce laps de temps est considérablement réduit (Cotton et Saint George, 1929).



FIGURE 3 – Photographie de tous les stades larvaires de *Tenebrio molitor* (Park et al., 2014)

Nymphes

La nymphe mesure 15 mm de long et 5 mm de large et est dénuée de cocon ou de couverture protectrice. De couleur initialement blanche, à l'exception des extrémités de l'épine caudale et des appendices latéraux, la pupa devient rapidement brun-jaunâtre au fur et à mesure de son vieillissement (Cotton et Saint George, 1929). De part et d'autre de la nymphe sont observables de larges rangées de lamelles latérales caractéristiques (Singh, 1975). Ce stade dure maximum 20 jours en hiver et minimum 7 jours en été, lorsque les températures moyennes sont plus importantes (Cotton, 1927). Le processus d'émergence ou passage de l'adulte à la nymphe représente pour le ténébrion une situation critique où ces insectes peuvent rencontrer des difficultés (Leclercq, 1956). L'ensemble du processus dure environ 30 minutes et suit des étapes bien précises telles que l'extension et la contraction de l'abdomen, la libération de la tête et des pattes ou encore le déplacement de celles-ci.

Imagos

Les adultes émergent d'abord comme des coléoptères, ils présentent une couleur blanchâtre avec des exosquelettes mous qui durcissent et s'assombrissent petit à petit (Ribeiro et al., 2018). Le coléoptère adulte est allongé et légèrement convexe, mesurant 17 à 25 mm de long. De couleur brun foncé, il est quelque peu brillant. Mâles comme femelles présentent des ailes développées, sont assez semblables à première vue et de proportions à peu près égales (Singh, 1975). Bien que superficiellement identiques, les deux sexes se distinguent néanmoins via les organes génitaux, qui sont aisément exposés par une légère pression sur l'abdomen (Cotton et Saint George, 1929). La durée de vie d'une femelle adulte va de 37 jours minimum à 96 jours maximum, avec une moyenne de 65 jours. Pour les mâles adultes, il y a de légères variations avec une durée allant de 39 jours à 92 jours, pour une moyenne de 58 jours (Cotton, 1927). Ces chiffres ont été confirmés par Ribeiro et al. (2018) qui mettaient en avant le fait que le stade adulte dure entre 16 et 173 jours, avec une moyenne de 31,8 à 62 jours.

1.2.3 Reproduction et développement

L'accouplement se déroule quelques jours après l'émergence et se répète à intervalles réguliers durant le cycle de vie de l'insecte. Le système d'accouplement naturel de *T. molitor* est encore peu étudié ; néanmoins les femelles sont connues pour être polyandres, c'est-à-dire multipliant les partenaires. Après la copulation, les mâles transfèrent un spermatophore libérant les spermatozoïdes aux femelles (McConnell et Judge, 2018). Une fois fécondée, la femelle génère des œufs pendant une période qui dépend majoritairement de la température ; dans des conditions de laboratoire ordinaires, les adultes de *T. molitor* commencent à pondre entre 5 et 18 jours après l'émergence (Cotton et Saint George, 1929).

1.3 Alimentation

Les pièces buccales du ténébrion adulte sont les palpes maxillaires et labiaux ainsi que les mandibules. Ces dernières jouent un rôle essentiellement broyeur (Cotton et Saint George, 1929). Comme illustré en Figure 4, le tube digestif du ténébrion se compose en premier lieu d'un proventricule, correspondant à notre œsophage. Il est suivi d'un important organe nommé mésentéron, ou intestin moyen, qui présente de nombreuses invaginations. Ces « cryptes » ont un rôle régénératoire et remplacent les cellules de la doublure du mésentéron durant la digestion et l'absorption. Vient ensuite l'iléon, un tube étroit recourbé vers la gauche, évoluant parallèlement au mésentéron. Le rôle de ce dernier est d'acheminer les déchets jusqu'au rectum, large tube s'étendant postérieurement, où les fluides sont absorbés et les fèces concentrées. Par ailleurs, le système excréteur est également visible sur le schéma, formé par les tubules de Malpighi (Petersen, 1986).

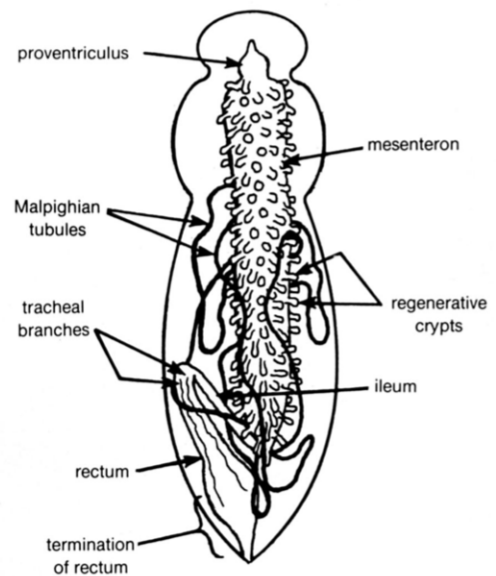


FIGURE 4 – Système digestif de *Tenebrio molitor* (Petersen, 1986)

Cet insecte est omnivore et détritivore, pouvant donc se nourrir d'insectes morts, de fruits ou légumes en voie de décomposition (Jung et al., 2014). La larve de *T. molitor* possède en outre une alimentation pouvant se baser sur les matières farineuses telles que la farine et la semoule. De fait, cet insecte est considéré comme un ravageur des endroits où ces denrées sont produites et conservées (Leclercq, 1953). Également friands d'aliments d'origine animale, ces vers peuvent consommer des déchets de viande, des corps d'insectes morts ou encore des plumes. Il est par ailleurs fréquent que *T.*

molitor pratique le cannibalisme (Billen et al., 2020). Les larves des vers de farine présentent une bonne résistance à la famine et peuvent demeurer de longues périodes sans nourriture ni humidité (Cotton et Saint George, 1929).

Par ailleurs, des recherches ont mis en avant le fait qu'incorporer des carottes au substrat nutritif des vers améliore considérablement la mortalité des ténébrions, leur poids, ou leur période de maturation (Rovai et al., 2021). Fournir occasionnellement des légumes frais, comme les carottes et les laitues, peut être très bénéfique pour les larves en raison de leur forte teneur en eau (Cotton et Saint George, 1929). Il faut néanmoins veiller à ce que la nourriture ne soit pas trop humide pour éviter les moisissures et la perte de la colonie (Leclercq, 1965).

1.4 Microbiome du tube digestif

Parmi les hôtes permanents du tube digestif de *T. molitor*, il est possible de citer les Protozoaires, et plus particulièrement les Sporozoaires du groupe des Grégarines. Quatre espèces se retrouvent dans l'intestin de ces insectes : *Gamocystis (Clepsidrina, Gregarina) polymorpha* (Hammerschmidt, 1838), *Gregarina cuneata* et *Steinina ovalis* (Stein, 1848) et *Gamocystis (Gregarina) steini* (Berndt, 1902). Les expériences de Summer en 1933 ont démontré que la présence de ces Grégarines est nécessaire à la bonne croissance des larves de ténébrion (Leclercq, 1948b).

Néanmoins, le genre bactérien dominant dans l'intestin des vers de farine varie significativement selon la nourriture qui leur est administrée (Ong et al., 2018; Urbanek et al., 2020). D'autant plus si les vers de farine sont exposés à des diètes contenant des polymères plastiques, qui voient alors leur microbiome intestinal considérablement modifié. Plusieurs modes d'alimentation contenant du plastique ont été expérimentés dans un article de Lou et al. (2021) et il a été mis en avant que, bien que la diversité bactérienne n'ait pas changé significativement selon les modes, les populations prédominantes ainsi que leur abondance respective ont varié. *Spiroplasma*, *Lactococcus*, et *Enterococcus* étaient prédominantes peu importe le régime, suggérant un caractère indispensable à la digestion et à la survie des vers de farine. Lorsque du son ou du PS était administré individuellement, *Pedicoccus* était relativement peu représenté; alors que, lorsque du son et du PS composaient simultanément la diète, l'abondance de *Pedicoccus* était observée. La même tendance est à souligner pour *Lactococcus*, qui était davantage représenté dans des diètes à base de son et de PE (Lou et al., 2021).

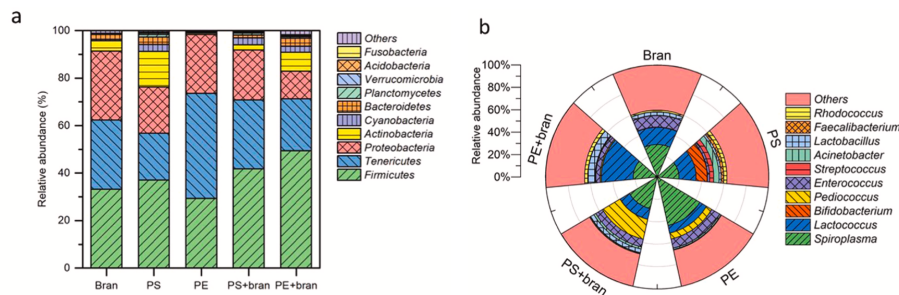


FIGURE 5 – Abondance relative des phyla (a) et des genres (b) prédominants (10 premiers) dans l'intestin des vers de farine nourris avec les différents régimes (Lou et al., 2021)

Enterobacteriaceae et *Spiroplasmataceae* représentent par ailleurs des familles prédominantes dans l'intestin des larves nourries avec du polyéthylène basse densité (PEBD) ou du PS. Lorsque ces larves ont été nourries avec du plastique, l'abondance relative des familles de *Streptococcaceae* et *Lactobacillaceae* a également changé de façon notable, prouvant ainsi qu'il s'agissait de bactéries liées à la dégradation de polymères (Yang et al., 2021). Les souches ayant une activité de dégradation du plastique ont été identifiées comme les espèces des genres *Klebsiella*, *Pseudomonas* et *Serratia* (Urbanek et al., 2020). D'autres expériences ont été menées sur des vers de farine nourris à la mousse de PU et ont permis de souligner un changement dans la composition de la communauté microbienne intestinale de ces derniers. Une augmentation de l'abondance des *Enterobacteriaceae* et *Hafnia* non classifiés par rapport aux groupes témoins a été observée. En plus des bactéries intestinales, les champignons

intestinaux et les enzymes oxydatives jouent un rôle clé dans la dépolymérisation et la biodégradation des plastiques (Machona et al., 2021 ; Wang et al., 2022). L'étude menée par Bhardwaj et al. (2012) présentait les différents groupes d'enzymes impliquées dans la biodégradation du plastique telles que laccase, cutinase, hydrolase, esterase, protéase et uréase (Bhardwaj et al., 2012).

1.5 Dégradation de polymères

Bien que les vers de farine soient connus pour leur flexibilité alimentaire (Machona et al., 2021), ces derniers peuvent également consommer des sources d'alimentation non conventionnelles, comme des déchets organiques ou encore des polymères plastiques. En effet, le PS, généralement résistant à la biodégradation, peut être consommé par les vers de farine qui dépolymérisent les molécules de PS à longue chaîne et forment des métabolites au sein de leurs intestins (Yang et al., 2015a), comme illustrés à la Figure 6.



FIGURE 6 – Dégradation du polystyrène par les vers de farine (Yang et al., 2015a)

Dans leur article, Yang et al. (2015) proposent un diagramme schématique de la dégradation intestinale du PS, présent en Figure 7. Dans un premier temps, le polystyrène est mâché puis ingéré dans l'intestin, de sorte à augmenter la surface de contact entre les enzymes et le microbiote extracellulaire (étape 1). Par après, les fragments sont mélangés avec les microbes, qui produisent les enzymes nécessaires à leur polymérisation en petites molécules (étapes 2 et 3). Ensuite, les produits sont dégradés ou minéralisés en CO_2 par les microbes fonctionnels (étapes 4 à 6). Enfin, les fragments de polymères et d'autres produits intermédiaires finissent évacués sur forme de fèces (étape 7) (Yang et al., 2015a).

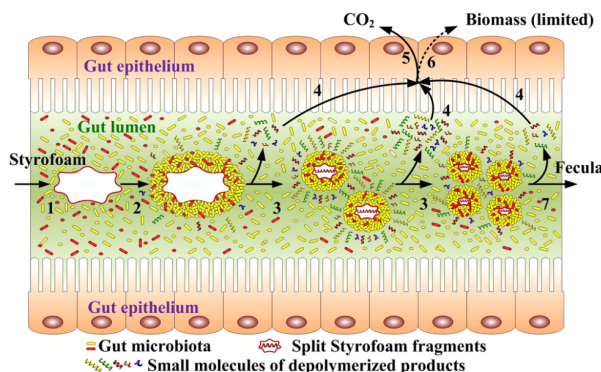


FIGURE 7 – Schéma du système proposé pour la dégradation des polystyrènes dans l'intestin de *Tenebrio molitor* (Yang et al., 2015a)

La dégradation de ces résidus du pétrole peut être perçue comme analogue à la digestion de la cellulose chez les mammifères ruminants, dans une idée de mutualisme avec les consortiums microbiens et l'hôte. Il a été confirmé que, lorsque les bactéries intestinales étaient supprimées par l'ajout d'un antibiotique, la capacité du ver à effectuer la dépolymérisation de ces molécules à longue chaîne et de les minéraliser en CO_2 était grandement impactée (Yang et al., 2015b). Ces micro-organismes, agrégés en un grand organe appelé bactériome, contribuent donc activement à l'activité digestive et leur composition est déterminée par le type d'alimentation apporté (Urbanek et al., 2020). Selon le type de polymère fourni à l'insecte et son stade de développement, certaines souches bactériennes vont ou non se développer. En plus du polystyrène, les larves de *T. molitor* sont capables de biodégrader et dépolymériser le PE ou encore le polychlorure de vinyle (PVC) ou le polylactide (PLA) bien que la minéralisation de ces derniers composants soit limitée (Božek et al., 2017 ; Peng et al., 2019).

2 *Galleria mellonella*

2.1 Taxonomie, origine, distribution

Domaine : Biota
Règne : Animalia
Phylum : Arthropoda
Classe : Insecta
Ordre : Lepidoptera
Famille : Pyralidae
Genre : *Galleria*
Espèce : *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)

Galleria mellonella ou la fausse teigne de ruche, appartient à la sous-famille Galleriinae au sein de la famille des Pyralidae, de l'ordre des Lépidoptères (Wojda et al., 2020). Autrefois classé sous l'appellation *Galleria obliquella* par Walker et *Galleria cerena* par Fabricius, cet insecte a été renommé *Galleria mellonella* par Linnaeus en 1758 (Kwadha et al., 2017). Signalé la première fois dans des colonies d'abeilles domestiques d'Asie du Sud et de l'Est (*Apis cerdana*) par Paddock en 1918, ce ravageur s'est répandu en Afrique du Nord, Grande-Bretagne et dans certaines parties de l'Europe, d'Amérique du Nord et de Nouvelle-Zélande (Paddock, 1918). De manière plus générale, la fausse teigne est omniprésente partout où l'apiculture est pratiquée, car il s'agit d'un nuisible emblématique des colonies d'abeilles (Shimanuki, 1981). Comme illustré en Figure 8, *G. mellonella* s'est implantée sur presque tous les continents (sauf l'Antarctique) et couvre pratiquement toutes les zones du globe. En effet, sa présence a été confirmée dans 27 pays africains, 9 pays d'Asie, 5 d'Amérique du Nord, 3 d'Amérique latine, en Australie, en Nouvelle-Zélande, dans 33 pays d'Europe. Néanmoins, la propagation de ce spécimen est limitée par les conditions climatiques : les larves de ce dernier étant sensibles au froid, elles se développeront préférentiellement dans les régions tropicales et subtropicales (Kwadha et al., 2017).

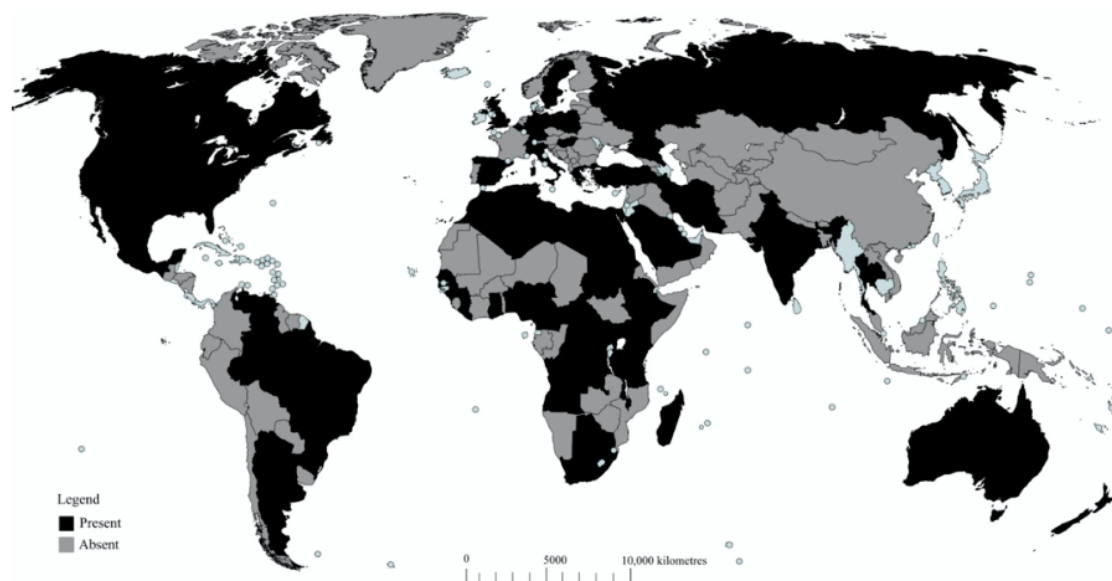


FIGURE 8 – Distribution globale de la fausse teigne de la ruche en décembre 2016 dans les régions apicoles (Kwadha et al., 2017)

2.2 Biologie

2.2.1 Généralités

G. mellonella peut survivre aussi bien la nuit que le jour, mais est réticente à l'exposition à la lumière. Ces spécimens, dans leur habitat naturel, volent donc la nuit et restent dans l'obscurité la journée (Nielsen et Brister, 1979 ; Warren et Huddleston, 1962). Les larves de fausse teigne sont de structure

tubulaire, permettant de stocker et traiter la nourriture. Adultes, les papillons peuvent mesurer entre 14 et 38 mm d’envergure en fonction de la taille et de l’habitat, ils modulent leur comportement selon les changements de température (Singkum et al., 2019). Dans la même idée, la température et l’humidité exercent une influence prépondérante sur l’éclosion des œufs et le développement des larves. Paddock (1918) a démontré qu’une HR moyenne d’environ 35% et une température de 32°C sont idéales pour l’éclosion des œufs et le développement des larves.

2.2.2 Cycle de vie

La fausse teigne est un insecte holométabole, ayant un cycle de vie qui passe par quatre stades de développement distincts. La durée totale de son développement varie de 4 semaines à 6 mois selon les conditions de vie auxquelles l’insecte est soumis, de même pour la durée des différents stades, qui est reprise en Table 1 (Kumar et Khan, 2018). Les facteurs biotiques interspécifiques et intraspécifiques (nourriture et compétition) et abiotiques tels que la température et l’HR sont de fait d’une importance capitale (Kwadha et al., 2017). Les températures de développement optimales varieraient entre 29 et 33°C et 29 à 33% semble être une gamme d’HR appropriée pour la survie de l’espèce (Paddock, 1918). L’étude de Kumar et Khan (2018) a par ailleurs démontré que la période larvaire, nymphale et la longévité des adultes étaient significativement plus longues durant les périodes de décembre-février que juillet-août. Ces résultats ont été associés à la température plus basse, qui réduit drastiquement la fécondité et le pourcentage d’éclosion (Kumar et Khan, 2018). La durée du cycle de vie complet de la fausse teigne est d’environ 6-8 semaines à 29-39°C avec 4-6 générations par an (Singkum et al., 2019).

TABLE 1 – Durée des stades du cycle de vie de *Galleria mellonella* (traduit de Warren et Huddleston, 1962)

Stade	Durée moyenne du stade (jours)	Intervalle (jours)
Œuf	10,2	7-20
Larval	32,9	25-38
Pré-pupal	6,9	2-24
Pupal	8,2	6-11
Pré-oviposition	3,2	1-10
Œuf à œuf	58,1	41-103
Longévité du mâle	14,8	2-28
Longévité de la femelle	7,2	2-18

Œufs

Les œufs de *G. mellonella* sont de taille variable, avec une longueur et largeur moyenne de 0,478 mm et 0,394 mm. De forme ovale et de couleur rose à blanc, ils présentent des lignes qui leur confèrent une texture rugueuse composée de polygones interconnectés (Kwadha et al., 2017; Wojda et al., 2020). Quelques jours avant l’éclosion, la larve est visible sous la forme d’un anneau de couleur sombre et devient entièrement formée et visible à l’approche de l’éclosion (Paddock, 1918; Wojda et al., 2020). Les œufs éclosent généralement en 5 à 8 jours ou 8 à 10 jours après la ponte, cette période pouvant aller jusqu’à 30 jours lorsque les températures sont basses (Kumar et Khan, 2018). Une faible humidité est favorable à l’éclosion des œufs, celle-ci devrait dans l’idéal être de 35% (Paddock, 1918).

Larves

La larve de *G. mellonella* appartient au type polypode, c’est-à-dire éruciforme ou en forme de chenille, possédant neuf paires de spiracles (Wojda et al., 2020). Après l’éclosion, les larves mesurent 1 à 3 mm de long pour 0,12 à 0,15 mm de diamètre. Durant le dernier stade, avant d’entamer la nymphose, ces dernières atteignent 25 à 30 mm de long pour 5 à 7 mm de large. Chaque spécimen possède six pattes sur le thorax, un certain nombre de prolegs sur les troisième et sixième segments abdominaux (Smith, 1965). La larve se caractérise également par une tête petite et pointue, de couleur brun rougeâtre, le corps est long et cylindrique, d’une couleur grise avec le bouclier prothoracique brun (Paddock, 1918). Sont comptabilisés entre 8 et 10 stades de mue; la période larvaire dure entre 28 jours et 7 mois selon les facteurs abiotiques (Kwadha et al., 2017). Les stades larvaires qui sont au

nombre de 7, allant de L1 à L7 (Figure 9) présentent des durées respectives moyennes de 4.08, 5.72, 5.28, 6.96, 6.76, 7.64 et 8.40 jours, pour un cycle de durée totale d'environ 45 jours (Wojda et al., 2020). Les larves de dernier stade cessent de s'alimenter et se déplacent vers des endroits sûrs où elles peuvent implémenter leur cocon. La larve devient ensuite inactive pendant plusieurs heures pour que s'entame la pupaison (Desai et al., 2019 ; Wojda et al., 2020). Le temps nécessaire pour qu'une larve se transforme en pupa varie selon les couvées, la durée était de 3,75 jours à température normale et 6,4 jours en automne (Paddock, 1918). À noter qu'aucun caractère morphologique externe ne permet de déterminer le sexe de l'individu durant le stade larvaire (Kwadha et al., 2017).

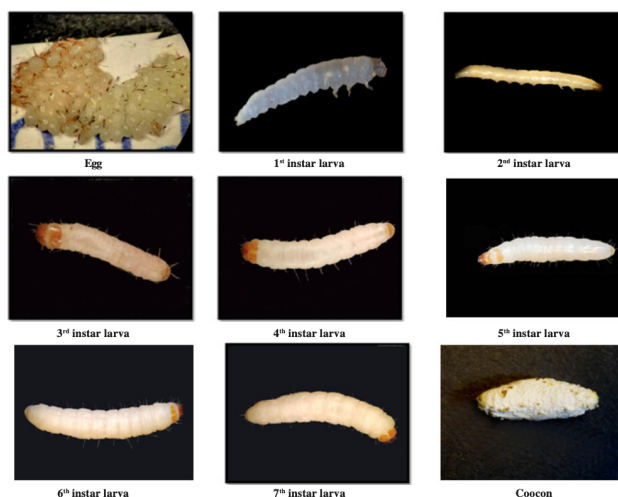


FIGURE 9 – Différents stades larvaires de *Galleria mellonella* (Desai et al., 2019)

Nymphes

Immuable, lorsque *G. mellonella* est sous forme de chrysalide, elle ne s'alimente plus et est logée dans un cocon. Ce stade dure de une à neuf semaines (Kwadha et al., 2017). Les nymphes possèdent une longueur de 12 à 20 mm et une largeur allant de 5 à 7 mm (Paddock, 1918). La pupa est obtuse, ses extrémités étant collées à son corps au moyen d'une sécrétion produite durant la mue (Wojda et al., 2020). La teinte de la chrysalide passe de blanche à jaune lorsque s'entame la nymphose, puis évolue du brun au brun foncé au fur et à mesure du développement (Kwadha et al., 2017 ; Paddock, 1918). En fonction de la température et de l'humidité, ce stade dure de 8 (28°C à 65% d'HR) à 50 jours (2,5°C, 44-100% d'HR) (Desai et al., 2019).

Un dimorphisme sexuel peut déjà être observé, car les pupes femelles sont généralement plus longues que les mâles ; les pupes mâles mesurent 14 mm en moyenne, et les femelles 16 mm (Paddock, 1918). Par ailleurs, il se marque aussi au niveau du sternum et sur certains segments abdominaux (Desai et al., 2019) comme mis en exergue en Figure 10.

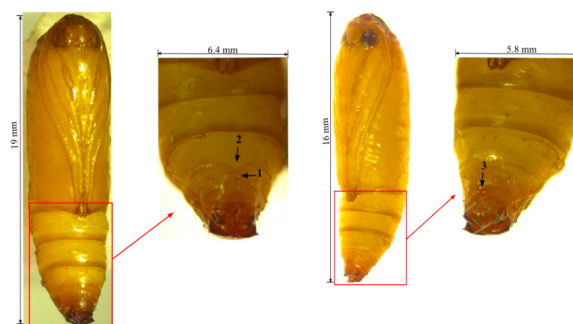


FIGURE 10 – Dimorphisme sexuel chez la nymphe de *Galleria mellonella* (Kwadha et al., 2017)

Imagos

Une fois libérés des cocons, les adultes restent inactifs jusqu'à ce que leurs ailes se solidifient. Les papillons nouvellement formés sont initialement d'un blanc crémeux puis adoptent une teinte grisâtre à brun violacé (Paddock, 1918). Une fois adultes, ces derniers mesurent de 10 à 18 mm de long (Kumar et Khan, 2018) avec une étendue d'ailes d'environ 30-32 mm. Ces ailes sont recouvertes d'écailles fines,

qui se détachent au toucher. Leurs pièces buccales étant dégénérées, les imagos de la fausse teigne ne peuvent pas consommer de nourriture et ont une durée de vie réduite, de 7 à 30 jours selon les conditions ambiantes (Paddock, 1918). Néanmoins, les mâles vivent légèrement plus longtemps (21 à 20 jours) que les femelles (8 à 15 jours) qui présentent trois phases : pré-oviposition, oviposition et post-oviposition (Desai et al., 2019 ; Kwadha et al., 2017). De ce fait, le dimorphisme sexuel se marque davantage à ce stade de développement de l'insecte (Figure 11). Une différence de sexe peut également être observée au niveau de l'aile antérieure qui est plus dentelée sur le bord extérieur chez le mâle (Kwadha et al., 2017 ; Paddock, 1918).

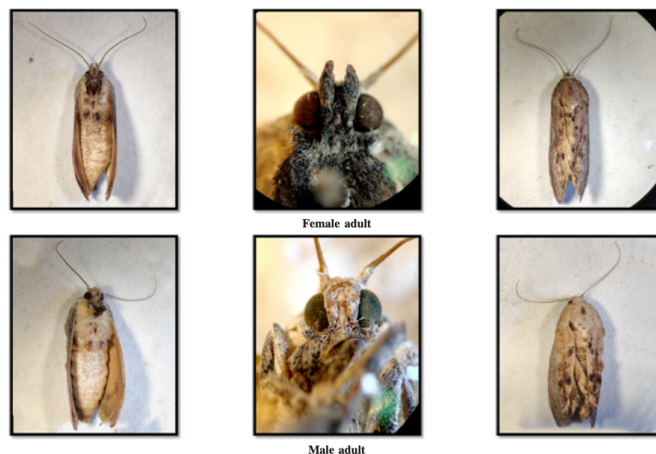


FIGURE 11 – Dimorphisme sexuel chez l'imago de *Galleria mellonella* (Desai et al., 2019)

2.2.3 Reproduction et développement

Le mode d'accouplement de ces spécimens est unique : le mâle attire la femelle avec des phéromones et émet de courtes impulsions sonores via des structures situées sur les ailes (Spangler, 1988 ; Wojda et al., 2020). La ponte a lieu assez rapidement après l'émergence qui est elle-même rapidement suivie de l'accouplement (Paddock, 1918). Entre 50 et 150 œufs sont pondus par jour et mettent 3 à 30 jours avant qu'éclosent les larves (Kwadha et al., 2017). La femelle pond un œuf à la fois et continue à en déposer tant que sa vitalité perdure, de préférence dans des crevasses et fissures plutôt que sur des surfaces ouvertes (Warren et Huddleston, 1962). La fausse teigne femelle possède une phéromone sexuelle « Nonanal », présente dans la cire d'abeille, qui expliquerait le choix de la cire comme lieu idéal de ponte (Singkum et al., 2019). Le taux de déposition est rapide (plus de 100 œufs par minute) et le nombre total d'œufs déposés avoisine les 300 (Paddock, 1918 ; Shimanuki, 1981). En outre, la période de développement global est elle aussi influencée par la température, l'humidité et les ressources alimentaires à disposition (Kumar et Khan, 2018).

2.3 Alimentation

Comme évoqué précédemment, les adultes de *G. mellonella* ont des pièces buccales dégénérées et le stade larvaire est la seule période de son développement où la fausse teigne ingère des aliments. Ces larves, parasites des élevages apicoles, consomment miel et cire lorsque ces dernières infestent les ruches (Paddock, 1918) ; elles peuvent aussi se trouver dans les nids de bourdons et de guêpes ou se nourrir de figuiers séchés (Singkum et al., 2019). Néanmoins, il est possible de supposer que la cire ne comble pas à elle seule les besoins nutritifs, et que d'autres substances sont nécessaires à la croissance et au développement de ces spécimens (Roy, 1937). De nombreux régimes ont été mis au point lors d'études portant sur l'alimentation de *G. mellonella* et il est ressorti que le lait écrémé séché et la levure en poudre amélioraient la croissance de ces individus. En outre, lorsque de la cire d'abeille était incluse, le développement s'en trouvait positivement affecté (Sohail et al., 2020). Il a été conclu que la cire d'abeille et ses constituants ne favorisaient la croissance que comme source d'eau métabolique (Marston et Campbell, 1973).

Pour les organes impliqués dans l'alimentation chez *G. mellonella*, il est pertinent d'aborder le système digestif de ce lépidoptère, qui se trouve dans une couche de graisse appelée graisse corporelle (Singkum et al., 2019) et se compose de trois parties : l'intestin antérieur, moyen et postérieur (Figure 12). L'intestin moyen occupe la majeure partie de la cavité corporelle de ces insectes. Par ailleurs, lors de la métamorphose, l'épithélium de cet intestin est renouvelé (Uwo et al., 2002).

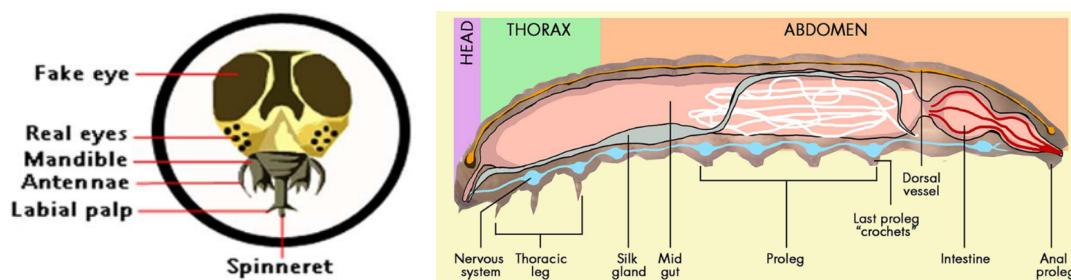


FIGURE 12 – Anatomie de *Galleria mellonella* (Singkum et al., 2019)

2.4 Microbiome du tube digestif

En 1908, Metalnikov mettait déjà en avant que les enzymes suivantes étaient présentes dans le tube digestif des larves de fausse teigne : « Proteolytique » agissant sur la fibrine, « Amylolytique » agissant sur l'amidon, « Lactase », agissant sur le lait et « Lipase » sur les graisses. Une enzyme lipolytique avait également été confirmée par Metalnikov (1904) et Pertzoff (1928) (Roy, 1937). Des analyses plus récentes, basées sur l'étude des séquences d'ARNr 16S en vue d'étudier les communautés intestinales de la fausse teigne, avaient mis en avant le fait que les genres *Enterococcus*, *Bacillus*, *Microbacterium* et *Acinetobacter* étaient les membres dominants (Saikia et al., 2022). De manière générale, la diversité du microbiome intestinal de *G. mellonella* semblerait faible et dominée par *Enterococcus*, symbiote connu de la fausse teigne (Peydaei et al., 2021).

2.5 Dégradation de polymères

Les bactéries intestinales sont intrinsèquement liées au régime alimentaire : les modes d'alimentation parfois extrêmes de ces larves auraient sélectionné des micro-organismes inhabituels, entraînant alors la présence de bactéries dégradant les polymères complexes (Bombelli et al., 2017). De ce fait, une capacité de ces lépidoptères à dégrader les polymères plastiques se serait développée. Elle a été mise en avant par accident via des trous apparus dans les sacs où ces larves étaient conservées par Bombelli et al. (2017). Cette biodégradation a été également expliquée par une rupture du même type de liaisons au sein de ces polymères que dans les composants de la cire d'abeille (Peydaei et al., 2021 ; Wojda et al., 2020). En plus du tube digestif, les glandes salivaires des larves de fausse teigne participent également à la dégradation du plastique en fournissant des éléments essentiels à une digestion ultérieure dans le tractus intestinal (Peydaei et al., 2021). Cependant, l'ingestion de polymères aurait un impact sur la composition microbienne du tube digestif, mais pas celle associée aux glandes salivaires (Peydaei et al., 2021). Dans la même idée, lorsque du plastique est consommé, la proportion d'autres espèces bactériennes candidates à la biodégradation des polymères, telles que *Serratia*, *Bacillus* et *Acinetobacter* augmenterait (Cassone et al., 2021). Les études convergent à souligner que l'abondance d'*Enterobacter sp.* et de *Enterococcus sp.* dans le tube digestif des spécimens serait corrélée à l'ingestion de polymères plastiques (Peydaei et al., 2021 ; Ren et al., 2019 ; Zhang et al., 2019 ; Zhu et al., 2021).

3 Polymères

3.1 Polyéthylène

3.1.1 Formule chimique

Le polyéthylène (PE) est un polymère synthétique qui présente une structure d'hydrocarbures saturés linéaires à longue chaîne pouvant être exprimée comme il suit (Figure 13) (Ren et al., 2019). Les résines de polyéthylènes pures sont constituées d'alcane dont la formule est $(C_2)_n(H_4)_{(n+2)}$, où n représente le nombre de monomères d'éthylène formant la chaîne. Ce degré de polymérisation est généralement supérieur à 100, et peut même atteindre 250 000 dans certains cas (Peacock, 2000).

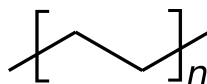


FIGURE 13 – Structure chimique du polyéthylène pur (Peacock, 2000)

Jusque dans les années 1950, toute la production du PE commercial impliquait des procédés à haute pression ; les composés formés étant qualifiés de polyéthylène haute densité (PEHD) ou *high density polyethylenes* (HDPE). D'autres voies ont émergé par la suite, utilisant des catalyseurs de type oxydes métalliques et nécessitant des conditions de température et de pression plus basses (PEBD ou *low density polyethylenes* [LDPE]) (Ronca, 2017).

3.1.2 Propriétés et utilisations

Ce polymère est un hydrocarbure aliphatique à longue chaîne de type thermoplastique (Ronca, 2017). Ces polymères sont résistants à température ambiante et deviennent cassants lors du refroidissement ; plus la masse molaire est élevée et la ramification importante, plus le point de fragilité est bas. Ce composé présente un intérêt particulier du fait de sa morphologie qui peut être contrôlée et adaptée par traitement. De ce fait, il s'agit d'un matériau pouvant être modulé selon les usages voulus, comme c'est le cas pour les résines de polyéthylènes (Peacock, 2000). Ce polymère est couramment utilisé dans la production de matériaux d'emballage (Mierzwa-Hersztek et al., 2019). Au niveau de l'utilisation des PEHD, ils conviennent particulièrement bien au confinement de liquides, comme les bouteilles de lait, détergents ou encore seaux. Pour ce qui est des PEBD, le degré de cristallisation est réduit et le point de fusion inférieur, conférant aux produits des résistances à la fonte importantes et des viscosités faibles. Les utilisations les plus répandues de PEBD comprennent les applications d'emballage commercial ou de sacs poubelles (Peacock, 2000).

3.1.3 Dégradation

Ce matériau présente une bonne résistance à la dégradation du fait de son poids moléculaire important et de sa teneur en antioxydants stabilisants qui sont ajoutés dès la production (Mierzwa-Hersztek et al., 2019). Depuis le début des années 1970, il a été mis en avant que la dégradation du polyéthylène pouvait être effectuée, dans des conditions naturelles, par certaines souches de bactéries, telles que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, *Moraxella*, *Penicillium* et *Aspergillus*. De par les propriétés du PE (forte hydrophobie, haute énergie de liaison chimique et poids moléculaire important), l'efficacité de cette dégradation est limitée et peut prendre jusqu'à plusieurs mois (Ren et al., 2019). En outre, la solution la plus utilisée pour dégrader le PE est la combinaison avec des polymères naturels tels que la cellulose, la gélatine ou l'amidon. La structure chimique du matériau en résultant se dégradera partiellement sous l'action de facteurs biologiques (Mierzwa-Hersztek et al., 2019).

3.2 Polystyrène

3.2.1 Formule chimique

Le polystyrène (PS) est un polymère qui se présente sous la forme d'une chaîne de polyéthylène ($[C_2H_4]_n$) linéaire auquel sont rattachés des cycles phényles. Ces derniers sont par ailleurs responsables de la température de transition vitreuse ainsi que de l'indice élevé de réfraction (Scheirs et al., 2003). Comme représenté en Figure 14, ce polymère aromatique de poids élevé est fabriqué à partir du monomère de styrène. La réaction de polymérisation permet d'atteindre des formes solides ou de mousse, alors que le monomère était initialement transparent, dur et cassant (Ho et al., 2018).

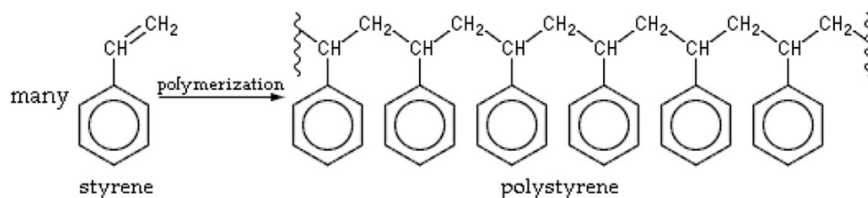


FIGURE 14 – Formule chimique du polystyrène (Ho et al., 2018)

3.2.2 Propriétés et utilisations

Les principales caractéristiques de ce matériau sont la faible densité, l'éclat, la brillance, l'absence de couleur, la facilité de fabrication ainsi que la dureté (Scheirs et al., 2003). La nature amorphe du composé lui confère en effet une grande stabilité et des propriétés mécaniques constantes. Néanmoins, le PS est une résine constituant une mauvaise barrière à l'oxygène ou à la vapeur d'eau, dont le point de fusion est relativement bas (Maul et al., 2007). Il est possible de dégager quatre types de produits issus de l'utilisation du PS : le polyéthylène à usage général (GPPS), le polystyrène à haut impact (HIPS), la mousse de PS et la mousse de mousse de polystyrène expansé (EPS) (Ho et al., 2018). Un résumé des différentes utilisations possibles selon le type de polystyrène est repris ci-dessous (Table 2).

TABLE 2 – Résumé des différentes utilisations de polystyrène selon le type (Ho et al., 2018)

Type de polystyrène	Application
Polystyrène à usage général (GPPS)/polystyrène orienté (OPS)	Paniers à fruits et légumes, récipients à tartes, plateaux à biscuits, récipients à charnières pour plats à emporter, dômes à gâteaux, couverts, assiettes, bols, plateaux, tasses (articles de service jetables).
Polystyrène à haute résistance aux chocs (HIPS)	Contenants de yogourt, crémiers, tasses pour boissons froides, couvercles, contenants de condiments à service unique, assiettes (à service unique et réutilisables), agitateurs.
Mousse de polystyrène	Plateaux de viande/volaille (préemballés et emballés en magasin), gobelets pour boissons froides, gobelets pour boissons chaudes, assiettes/bols à service unique, récipients à charnière pour emporter, plateaux pour repas scolaires et autres services alimentaires, autres feuilles de mousse (par exemple, boîtes à œufs et plateaux de fruits et légumes).
Mousse de polystyrène expansé (EPS)	Tasses et récipients, glacières (boîtes à raisin et à poisson), systèmes de panneaux isolants.

3.2.3 Dégradation

Une dégradation thermique de ce type de polymères est envisageable bien que les résultats ne soient pas aussi concluants que pour le polyéthylène (Faravelli et al., 2001). De plus, même s'ils peuvent être recyclés, la plupart des mousses de PS finissent dans des décharges malgré l'existence de réglementation (Ho et al., 2018). Ces composés peuvent également se dégrader dans l'environnement, mais à un rythme tellement lent qu'ils persistent sous forme solide pendant des périodes considérables. La biodégradation est aussi un processus envisageable, durant lequel des micro-organismes (champignons, bactéries et

archées) dégradent ces composés grâce à leurs enzymes extra- et intracellulaires. De nombreuses souches ont ainsi été isolées, contribuant à la dégradation du styrène. Il est possible de citer notamment *Rhodococcus ruber*, *Brevibacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* ou encore *Bacillus sp.* (Ho et al., 2018 ; Mierzwa-Hersztek et al., 2019 ; Saikia et al., 2022). La dégradation du PS peut se réaliser biologiquement, bien que ces processus soient lents (Ho et al., 2018). Ils peuvent cependant être accélérés via l'ajout d'additifs améliorant le taux de biodégradation des PS, tels que les sels métalliques ou encore par mélange avec des copolymères (Gorghiu et al., 2004).

3.3 Polyuréthane

3.3.1 Formule chimique

Le groupe uréthane, unité répétitive principale du polyuréthane (PU) est produit à partir de la réaction entre de l'alcool (-OH) et de l'isocyanate (NCO), comme présenté en Figure 15. D'autres groupes tels que les éthers, les esters, l'urée ou encore d'autres composés aromatiques sont également présents (Nakajima-Kambe et al., 1999). Le polyuréthane peut posséder la structure chimique d'un thermoplastique tout en ayant une structure physique typique d'un solide rigide, d'un élastomère souple ou encore d'une mousse. Ses nombreuses formes physiques et structures chimiques en font un polymère polyvalent et largement utilisé (Szycher, 2013).

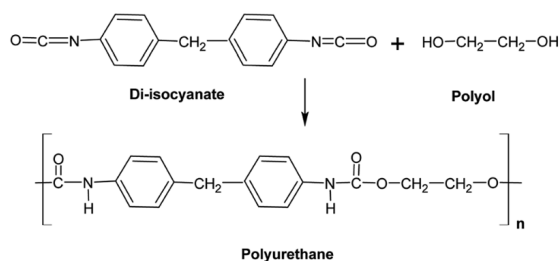


FIGURE 15 – Voie commune de synthèse du polyuréthane (Akindoyo et al., 2016)

3.3.2 Propriétés et utilisations

Il existe une multitude d'applications spécifiques au PU, pouvant être regroupées selon les propriétés du matériau recherchées : rigides, extensibles, thermoplastiques, liants, adhésifs, élastomères, revêtements, etc. (Somarathna et al., 2018). De fait, le PU conserve une grande résistance aux chocs à basse température, est facilement moussable, résiste à l'abrasion et à la propagation des déchirures, à l'ozone, à l'oxydation et à l'humidité (Szycher, 2013). Les propriétés mécaniques et physiques du PU sont fortement liées aux types de polyols et de diisocyanates impliqués dans la synthèse ainsi qu'à la structure de ce dernier. En effet, la modification de la formulation structurale du PU lui permet de passer de plastique dur à matière flexible (Akindoyo et al., 2016). La polyvalence de ce matériau ainsi que sa capacité à remplacer d'autres matériaux rares ont conduit à son incorporation dans de nombreux domaines d'application (Figure 16).

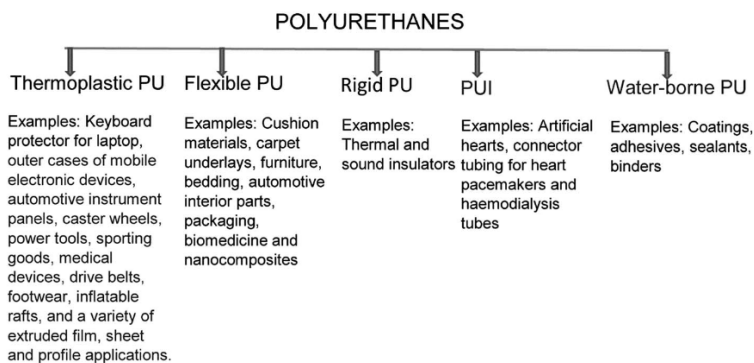


FIGURE 16 – Exemples d'utilisation courante du PU selon les principales catégories (Akindoyo et al., 2016)

La mousse de PU représente par ailleurs un des dérivés du polyuréthane le plus couramment utilisé. L'excellente résistance mécanique, la ténacité, la résistance à l'abrasion et à la corrosion confèrent à ce produit un intérêt en guise de revêtement (Akindoyo et al., 2016).

3.3.3 Dégradation

Recycler le polyuréthane est une pratique courante visant à réintégrer ce matériau dans la chaîne de production. Quatre catégories de recyclage sont répandues : le recyclage chimique et thermochimique avancé, le recyclage mécanique, la récupération d'énergie et le recyclage de produits (Akindoyo et al., 2016). La dégradation du PU par les bactéries a été mise en avant par Schmidt et al. (2016), signalant que certains types de champignons et bactéries avaient l'aptitude de dégrader des matériaux PU. Le PU peut de ce fait être utilisé comme source de carbones par des organismes capables de rompre les liaisons esters (Mathur et Prasad, 2012). Les espèces fongiques *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pullularia*, *Trichoderma* et *Chaetomium* étaient notamment impliquées dans ce phénomène. Parmi les bactéries, ce sont les espèces *Corynebacterium*, *Enterobacter agglomerans* et *Bacillus subtilis* qui ont été mises en avant (Nakajima-Kambe et al., 1999 ; Schmidt et al., 2017).

Quatrième partie

Matériels et méthodes

1 Matériel biologique : élevages

Les expériences ainsi que la tenue des élevages ont été réalisées au sein du département d'Entomologie fonctionnelle et évolutive de la faculté Agro-Bio Tech de Gembloux. Le suivi et la gestion de ces derniers dans le cadre du travail ont été effectués sur une période allant de mars 2022 à août 2022. Des figures supplémentaires relatives à cette section se trouvent en Annexe 1.

1.1 Élevage de *Tenebrio molitor*

L'élevage de *T. molitor* a été initié sur base d'une population présente au sein du département d'entomologie fonctionnelle et évolutive de la faculté de Gembloux Agro-Bio Tech. Ce dernier a été mené dans une logette d'environ 15 m^3 , dans l'obscurité totale. Les conditions de température et d'humidité durant l'expérience étaient respectivement de $31 \pm 7\text{ }^\circ\text{C}$ et $40 \pm 10\%$. Les vers de farine sont placés dans des boîtes de $30 \times 17,5 \times 8\text{ cm}$, le couvercle étant maintenu légèrement ouvert afin de permettre une certaine aération.

Le milieu nutritif sur lequel se développent les larves de *T. molitor* respecte des proportions établies après lecture de l'article de Rumbos et ses collègues (Rumbos et al., 2020) : un tiers de son pour deux tiers de farine de blé. La diète est renouvelée tous les trois jours et des tris sont effectués deux fois par semaine afin de séparer les larves des nymphes. Pour assurer une croissance optimale durant le stade larvaire, des aliments frais tels que des carottes peuvent être fournis aux individus (Kim et al., 2017; Liu et al., 2020).

1.2 Élevage de *Galleria mellonella*

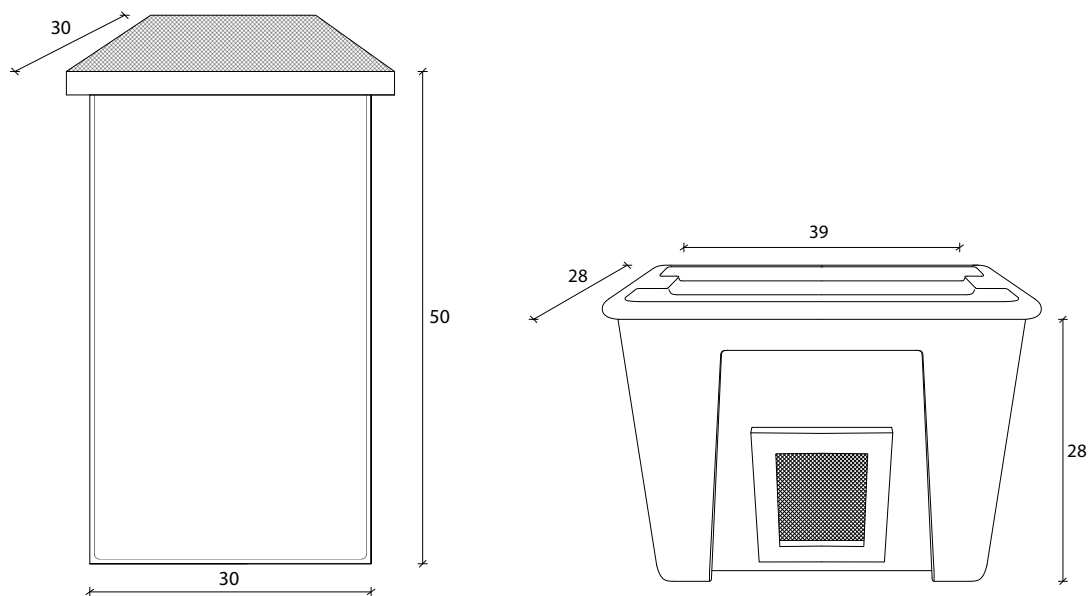


FIGURE 17 – Évolution du système de cages pour l'élevage de *Galleria mellonella* (Rousseau 2022)

La population de *G. mellonella* ayant permis d'amorcer l'élevage provient d'un magasin de reptiles, *Reptishop*, situé à Bruxelles. L'élevage a été mené dans l'obscurité totale, au sein d'une logette d'environ 15 m^3 (Annexe 1), où règnent des conditions de température et d'humidité de respectivement $31 \pm 7\text{ }^\circ\text{C}$ et $40 \pm 10\%$. Plusieurs systèmes de cages ont été envisagés, impliquant initialement

l'utilisation de vivariums en verre, qui ont par la suite été écartés pour des questions d'étanchéité et de contamination. L'évolution du dispositif de cage envisagé est illustrée en Figure 17 ci-dessus ; les cages ayant été retenues sont des boîtes en polypropylène de 28x28x39 cm. Afin de permettre à l'air de circuler, des grillages métalliques (à maille fine, de diamètre inférieur à 1 mm) ont été insérés sur deux faces de la boîte. Ces derniers sont fixés à l'aide d'un cadre en bois faisant office de jointure et assurant un système étanche.

Durant toute la durée du stade larvaire, les fausses teignes de ruche sont soumises à un type de diète, développé ci-après, puis transférées dès l'émergence dans une nouvelle cage, dépourvue de milieux nutritifs. Plusieurs recettes de diètes ont été envisagées, toutes constituées des mêmes ingrédients : farine, polenta, poudre de lait, levure de bière, miel et glycérine. Néanmoins, trouver l'équilibre adapté entre un taux d'humidité raisonnable, une bonne qualité nutritive et une structure aérée du substrat a nécessité de nombreux essais-erreurs au niveau de la préparation. Les proportions sélectionnées sont issues de l'article de Metwally et al. (2012), ces dernières optimisant la croissance des individus tout en leur fournissant des conditions de développement favorables :

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| — 350 grammes de farine de blé | — 70 grammes de levure de bière |
| — 200 grammes de polenta | — 100 millilitres de miel |
| — 130 grammes de poudre de lait | — 150 millilitres de glycérine |

Par ailleurs, les volumes de miel et de glycérine ont été convertis en unités de masse au moyen de la masse volumique, donnant ainsi respectivement 142 et 189 grammes de liquides. Cette conversion a été opérée puisque la perte de matière au niveau de la verrerie lors des mesures de volume générerait des différences significatives au niveau de la structure de la diète.

Une fois initié, l'élevage a nécessité un entretien régulier impliquant un renouvellement de la diète (toutes les deux semaines), le transfert des chrysalides ayant émergé dans un autre environnement (tri tous les trois jours) et la surveillance quotidienne des conditions de température et d'HR (photos de l'élevage de *G. mellonella* en Annexe 1).

2 Tests de croissance et optimisation des diètes

Dans le but de déterminer la proportion de plastique optimale à intégrer à la diète des larves, des tests de croissance ont été menés. Ces derniers visant ainsi à étudier l'influence du taux/de la forme de polymère ingéré sur le développement des individus.

2.1 Test préparatoire

Dans un premier temps, un test préliminaire a été conduit sur des larves de *T. molitor*, ce dernier ayant permis de tester et d'ajuster le dispositif initialement envisagé. Le système initial reposait sur l'utilisation de boîtes de Petri aux couvercles préalablement troués au scalpel afin d'y insérer de la toile ajourée (Figure 18, A). Le pré-test s'est avéré concluant, les proportions établies fournissant des résultats satisfaisants : prise de masse globale et taux de mortalité raisonnable. En revanche, le dispositif expérimental n'était pas optimal et générerait pertes de matière et imprécisions de mesure. Il a donc été remplacé par des boîtes en polypropylènes de 186x133x89 mm provenant de chez *Ava Papier* (Figure 18, B). Par la suite, l'expérience a été reproduite à trois reprises, pour minimiser les erreurs.

Avant le début de chaque expérience, les larves ont été privées de nourriture pendant 24 heures. Le protocole expérimental, détaillé en Annexe 2, impliquait la pesée des boîtes, larves, diètes et plastique au jour 1. Par la suite, la récolte des données (poids total des boîtes, poids et tailles des larves) a été effectuée aux J1, J2, J3, J5, J7, J9, J11, J14, J17, J20, J23, J27 et J31 (données finales). Cette fréquence a été établie de sorte à récolter les données par pas de 24h, puis 48h, puis 72h puis finalement 96h. À noter que les mesures de poids ont toutes été réalisées à l'aide d'une balance analytique (*VWR*®, modèle LA 314i), précise à 0,1 mg près.

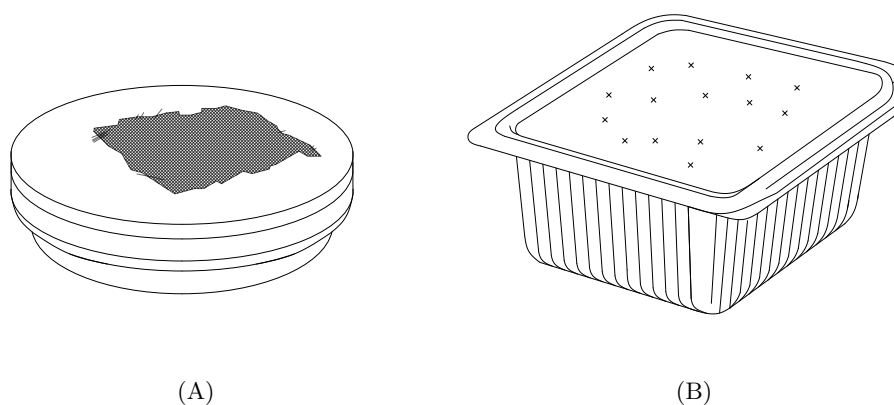


FIGURE 18 – Évolution du dispositif expérimental avant (A) et après (B) le test préliminaire (Rousseau 2022)

2.2 Dispositif expérimental et suivi de l'expérience pour *Tenebrio molitor*

Le type de plastique utilisé dans le cadre de cette expérience a été de la mousse de polyuréthane. Deux formes de PU ont été intégrées : la mousse de PU solide et la mousse de PU broyée. Pour ce faire, un panneau d'isolation en PU (*Rooftop Isolation SPRL*, à Gembloux) a été découpé puis broyé. Un broyeur à rotor, de la marque *Brabander*© (Laboratoire BEAGx), a permis de générer des grains de 2 mm de diamètre.

Au total, six régimes alimentaires ont été établis : deux régimes de contrôle (100% plastique, contrôle positif et 100% diète, contrôle négatif), deux régimes à base de PU broyé et deux régimes composés de PU solide. Les taux d'incorporation faible et moyen ont respectivement été fixés à 33% de plastique pour 67% de diète, et 50% de chaque. Ce qui correspond à des masses allant de 1 à 2 g de PU pour 2 g de diète. Ces choix ont été opérés sur base des travaux similaires (Bulak et al., 2021 ; Yang et al., 2017). Ont été isolées individuellement les larves, mesurant toutes entre 1,5 et 2 cm (stades L4-L6), de sorte à étudier la quantité de plastique précise consommée par individu ainsi que l'évolution du poids en découlant (Peng et al., 2020 ; Wang et al., 2022). L'effet de chaque régime a été étudié sur 10 larves, pour un total de 60 individus par expérience (Figure 19). Le choix de la quantité de nourriture à intégrer par boîte a été établi de sorte que chaque larve soit nourrie *ad libitum* pendant toute la durée de l'expérience (31 jours). Ces valeurs ont été fixées sur base d'une étude similaire, mettant en avant les quantités de plastique et de son consommées par une larve (Jiang et al., 2021).

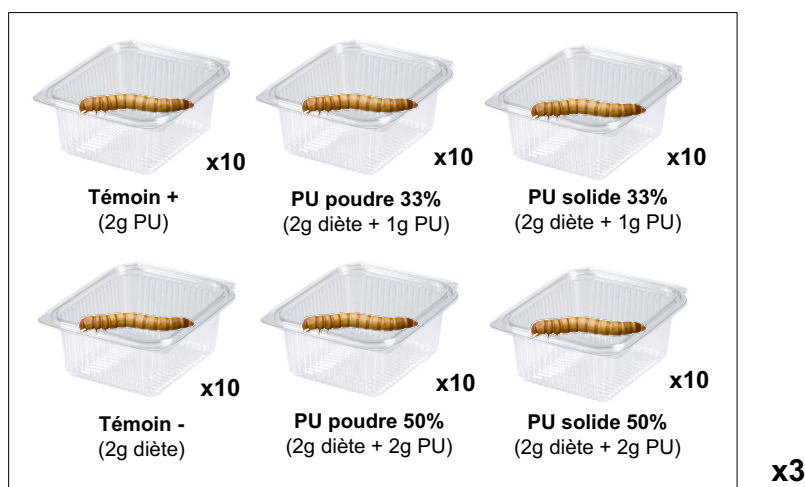


FIGURE 19 – Différentes modalités de diètes testées pour *Tenebrio molitor* (PU : polyuréthane, diète : 1/3 de son pour 2/3 de farine de blé, x10 : chaque régime étudié sur 10 vers, x3 : expérience reproduite à trois reprises)

2.3 Dispositif expérimental et suivi de l'expérience pour *Galleria mellonella*

Les tests appliqués aux larves de *G. mellonella* ont été conduits, non plus avec du PU, mais avec de la poudre de polyéthylène basse densité (500 microns). Ce choix a été fait de sorte à étudier l'influence de la forme de plastique sur sa consommation. Le dispositif expérimental se rapproche de celui établi pour les larves de *T. molitor* mais diffère sur certains aspects (protocole en Annexe 2). Tout d'abord, quatre régimes seulement sont étudiés : deux régimes de contrôle reposant exclusivement sur de la diète ou du PE en poudre, un régime à faible taux d'incorporation de PE en poudre (33%) et un régime à taux d'incorporation moyen (50%). Chaque traitement a été appliqué à 10 individus (10 répétitions/traitement, 40 individus au total), et l'expérience reproduite à trois reprises (Figure 20).

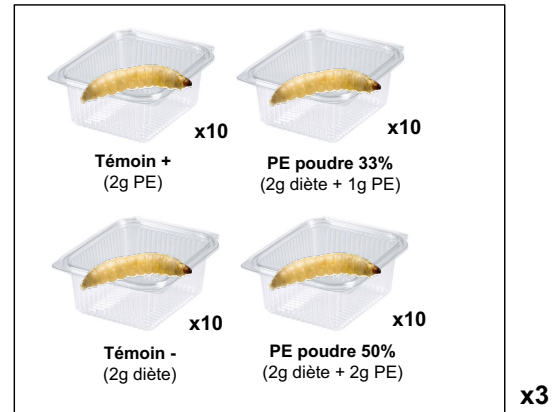


FIGURE 20 – Différentes modalités de diètes testées pour *Galleria mellonella* (PE : polyéthylène, diète : recette (Metwally et al., 2012), x10 : chaque régime étudié sur 10 vers, x3 : expérience reproduite à trois reprises)

Des larves mesurant entre 1 et 2 cm (stades 4 et 5) ont été sélectionnées (Kwadha et al., 2017). De même que pour *T. molitor*, les masses de diètes et de plastiques administrées aux larves de fausse teigne ont été établies sur base des consommations hebdomadaires mises en avant dans la littérature (Jiang et al., 2021 ; Peydaei et al., 2021 ; Réjasse et al., 2021). Le jeûne de 24h préalablement au début de l'expérience n'a pas été respecté au vu de l'état de faiblesse des larves après ce dernier.

3 Préparation des échantillons

Une fois l'expérience achevée, les larves encore en vie ont été disséquées afin d'en extraire le tube digestif (Figure 21). Le protocole suivi est similaire pour les deux espèces d'insectes, s'inspirant de la littérature (Shao et al., 2013).



FIGURE 21 – Tube digestif (bouche : haut à droite) de la larve de (A) *Galleria mellonella* (Photographie : Latour 2018) et (B) *Tenebrio molitor* (Photographie : Rousseau 2022) positionnée sur la face ventrale, au stéréomicroscope

Dans un premier temps, les outils de dissection sont nettoyés et désinfectés à l'éthanol 70%. Les larves sont rincées une première fois superficiellement à l'eau distillée afin d'ôter les impuretés les plus conséquentes. Par la suite, elles sont placées sur glace pendant 30 minutes dans le but de les anesthésier, puis conservées 30 minutes dans un congélateur à -20°C . Les larves mortes sont par après plongées une minute dans de l'éthanol 70%, permettant ainsi une bonne désinfection. La dissection est opérée par la suite sous un stéréomicroscope NexiusZoom (Euromex©), le corps de la larve étant constamment

immérgé dans du phosphate-buffered saline (PBS) stérile (tampon phosphate salin : NaCl 137 mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 10mM et KH_2PO_4 2mM ; potentiel hydrogène (pH) :7,4). Une épingle permet d'assurer le positionnement de la larve en face ventrale. La première étape, réalisée à l'aide d'une paire de micro ciseaux (*STALEKS EXPERT SE-90/1*), consiste à ôter la tête de l'individu puis à découper la cuticule sans toucher le tube digestif. La cuticule est ensuite fixée de part et d'autre de l'insecte et les tubules de Malpighi ainsi que le gras du corps sont enlevés avec une pince molle et évacués par rinçage. Finalement, le tube digestif est sectionné au niveau du proventricule et transféré dans un tube stérile de 1,5 millilitres (mL). Ce dernier est alors immédiatement immergé dans de l'azote liquide afin d'interrompre toute potentielle dégradation des tissus. Une fois toutes les dissections achevées, les tubes digestifs sont stockés à $-80^{\circ}C$ jusqu'à utilisation.

4 Extractions génomique et protéomique

L'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) totale et des protéines totales de 50% des tubes digestifs est par après réalisée sur base d'une méthodologie (Figure 22) adaptée du kit AllPrep (Qiagen, 2020) et de Latour (2018). Cette étape précède le séquençage du gène de l'ADNr 16S qui permettra des caractériser les taxons bactériens des échantillons. Les protéines seront également analysées et identifiées par LC-MS/MS.

4.1 Désintégration cellulaire et homogénéisation

Les tubes sont tout d'abord extraits du congélateur et maintenus sur glace pour empêcher le dégel. Une bille en acier inoxydable de 5 mm de diamètre est ajoutée à chaque tube avec 600 μL de buffer RLT, contenant du β -mercaptoéthanol. Ce tampon de lyse permet la désintégration cellulaire et l'activation des enzymes de dégradation. Les échantillons sont par la suite placés dans un TissueLyser MM 400 de la marque *Retsch*® pendant 2 minutes à 20 Hz ; cette opération est réalisée à nouveau après réarrangement des échantillons afin de permettre une homogénéisation.

Le lysat est ensuite centrifugé (3 minutes, 12 000 Revolution per minute (Rpm), Centrifuge 5415 D, *Eppendorf*®) afin de pouvoir pipetter. Puis, une fois le surnageant placé sur une spin colonne AllPrep DNA, les échantillons sont à nouveau centrifugés durant 30 secondes à 10 000 Rpm. La colonne est finalement insérée dans un nouveau tube collecteur et conservée à $4^{\circ}C$ pour une purification ultérieure de l'ADN. Le contenu du tube collecteur est quant lui utilisé pour la purification de l'acide ribonucléique (ARN), détaillée par après.

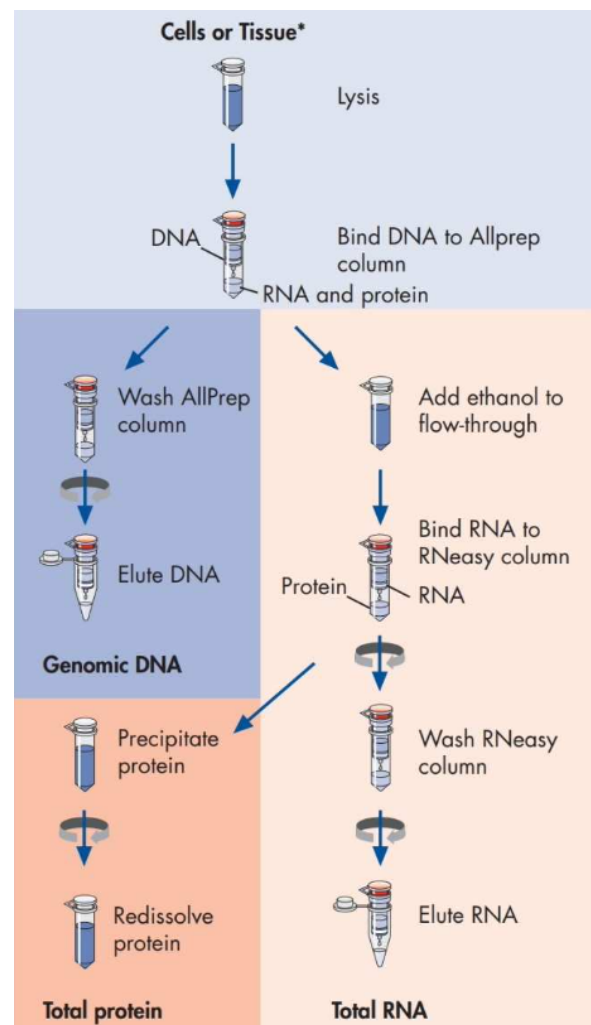


FIGURE 22 – Schéma de la méthodologie appliquée pour l'extraction de l'ADN, l'ARN et les protéines (Qiagen, 2020)

4.2 Extraction d'ARN, d'ADN et des protéines

Bien que le protocole complet permettant l'extraction d'ARN, ADN et protéines soit repris en Annexe 3, les principales étapes seront énoncées ci-après.

Pour ce qui est de la purification de l'ARN, 400 μL d'alcool 90% sont ajoutés à la colonne issue de l'étape 4.1. Après mélange, 700 μL de cette solution sont transférés sur une RNeasy spin colonne. Les échantillons sont placés à la centrifugeuse et le contenu du tube collecteur est conservé à 4°C, pour une purification ultérieure des protéines. Par la suite, la colonne RNeasy est rincée via l'ajout de tampons, suivi d'une centrifugation. Finalement, l'application d'eau RNase-free permet d'éluer l'ARN, avant de le conserver à -80°C.

La purification de l'ADN implique deux cycles de rinçage et de centrifugation à l'aide de deux solutions tampons. La colonne est par la suite éluée au moyen d'un tampon EB, préalablement chauffé à 70°C, puis centrifugée. Après avoir été incubés à température ambiante puis centrifugés, les échantillons sont conservés à -20°C.

Les étapes concernant la purification des protéines impliquent une précipitation et une re-dissolution de celles-ci. Dans un premier temps, un tampon est ajouté aux échantillons qui sont incubés à température ambiante durant 10 minutes pour permettre la précipitation. Le mélange est par après centrifugé et le surnageant ôté. De l'alcool 70% est ajouté au culot puis l'échantillon est centrifugé à nouveau et de la même façon, le surnageant est jeté. Le culot est alors séché à l'air libre durant 10 minutes. Comme pour l'ADN, les tubes contenant les protéines sont stockés à -20°C.

4.3 Analyse des résultats du séquençage

Concernant l'analyse de la partie génomique et protéomique de l'échantillon, il n'a pas été possible de les intégrer dans ce travail en raison du temps de traitement des échantillons fournis au GIGA et de la date de soumission de l'étude. Les analyses LC-MS/MS seront réalisées sur un Acquity M-Class UPLC (Waters©) en combinaison avec un Q Exactive Plus (Thermo Scientific©), en mode nano-électrospray à ions positifs au GIGA (ULiège). La colonne piège est une Symmetry C18 5 μL (180 μL x 20 mm) et la colonne analytique une HSS T3 C18 1,8 μL (75 μL x 250 mm) (Waters©). Les échantillons sont chargés à 20 μLmin^{-1} sur la colonne piège dans 98% de solvant A (0,1% d'acide formique dans l'eau) pendant 3 min puis séparés sur la colonne analytique à un débit de 600 nLmin^{-1} . Le gradient linéaire est le suivant : conditions initiales 2% de solvant B (0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile) ; 5 min 7% B ; 135 min 30% B, 150 min 40% B ; 154 min 90% B jusqu'à 158 min, puis retour aux conditions initiales à 162 min jusqu'à 177 min. La durée totale de l'analyse est de 180 min.

5 Caractérisation des communautés bactériennes du tube digestif

5.1 Mise en culture sur milieu solide

Afin de fournir de premières observations sur les communautés bactériennes présentes au sein des tubes digestifs, les échantillons n'ayant pas été soumis à l'extraction sont mis en culture sur milieu LB (12g Agar bactériologique (VWR©), 5g LB Broth (Sigma-Aldrich©) pour 1L d'eau distillée). Parallèlement à cela, du PBS stérile est préparé (NaCl 137 millimoles (mM), KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 10mM et KH_2PO_4 2mM ; pH : 7,4).

Les échantillons contenant les tubes digestifs sont retirés du congélateur, où ils étaient conservés à une température de -80°C. Dans chaque tube Eppendorf, 10 μL de PBS stérile sont ajoutés sous hotte ; les échantillons sont par la suite vortexés pendant quelques secondes. Sous hotte, chaque tube digestif est extrait au moyen d'une pipette de 20 μL puis transféré sur du LB préalablement préparé. L'incubation de la plaque inversée est réalisée à 29°C, durant 72h, dans un incubateur réfrigéré (IPP260plus, memmert©).

5.2 Coloration de Gram

Dans le but d'approfondir l'identification morphologique des colonies bactériennes un test de coloration Gram est appliqué. Le protocole a été adapté de celui de Smith et Hussey (2005) selon les instructions du fournisseur du kit, *Sigma-Aldrich*©.

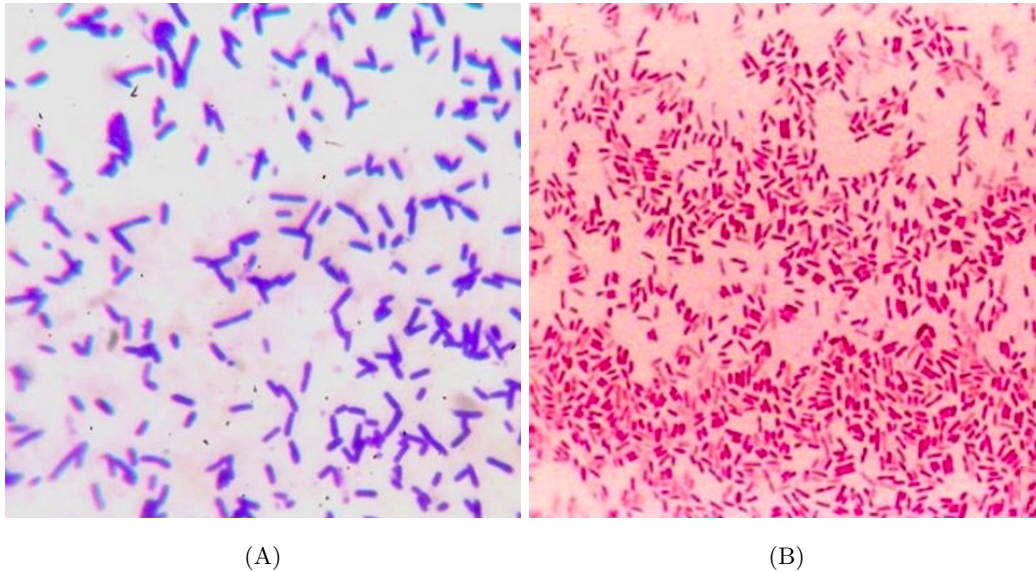


FIGURE 23 – Bactéries Gram positives (A) et Gram négatives (B) après une coloration de Gram

Les colonies bactériennes d'intérêt ont dans un premier temps été isolées sur le même milieu LB à partir des boîtes de Petri incubées. La sélection des colonies s'est opérée de la manière suivante : pré-test, expérience 1 et expérience 3 ont été observés, les colonies présentes sur deux tiers des mises en culture ont été associées au traitement concerné. Après 72h d'incubation à 29°C, un frottis bactérien est réalisé sur lame de microscope à partir d'une colonie isolée de chacune des boîtes de Petri. Le frottis est ensuite séché sous la flamme d'un bec Bunsen. Les deux premiers colorants (violet cristallisé en solution et solution de Lugol) sont ensuite appliqués selon la même procédure : laissés agir par immersion des lames pendant respectivement 1 minute 30 et 3 minutes, puis rincés dans un mince filet indirect d'eau distillée (30 secondes). Par après, l'agent décolorant est appliqué, toujours par immersion de la lame, durant 5 à 10 secondes, puis rincé. Finalement, la lame est inondée 1 minute avec le contre colorant (la safranine) puis rincée après 1 minute, jusqu'à ce qu'aucune couleur n'apparaisse dans l'effluent. Enfin, l'endos de la lame est asséché avec du papier absorbant. Les bactéries Gram négatifs apparaissent alors au microscope en rose et les Gram positifs, en mauve foncé (Figure 23).

6 Analyses statistiques

Les différents graphiques et traitements statistiques des tests de croissance ont tous été produits à l'aide du logiciel RStudio (version 4.1.0). Le temps a donc été considéré comme un facteur fixe (pesées à intervalles réguliers) et la date comme un facteur aléatoire. De plus, pour établir les graphiques de différences de poids cumulées, les insectes qui sont morts ou qui se sont métamorphosés au cours de l'expérience n'ont pas été pris en compte. Uniquement les valeurs de poids des larves ayant achevé l'expérience ont été considérées.

La lecture des jeu de données, provenant de classeurs Excel, s'est effectuée au moyen des packages *dplyr* (R. François 2022, version 1.0.9) et *xlsx* (A. Dragulescu 2022, version 0.6.5). Au préalable, des tests de normalité de Shapiro-Wilk (package *stats*, R Core Team 2022, version 4.1.0) et des tests d'homogénéité des variances de Levene (package *car*, J. Fox 2022, version 3.0-13) ont été appliqués au jeu de données de sorte à vérifier les conditions d'application d'une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur.

Par rapport à la mortalité et au nombre de métamorphoses recensées au cours de l'expérience, des analyses des variances ont été menées. En ce qui concerne les valeurs de poids des larves, les données ne suivant pas une distribution normale, l'ANOVA ne pouvait pas être appliquée et une alternative non paramétrique a été employée. Les médianes ont donc été comparées via un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (package *stats*, R Core Team 2022, version 4.1.0), aussi appelé ANOVA unidirectionnelle sur rangs. Ce dernier nécessite les packages *tidyverse* (H. Wickham 2022, version 1.3.1), *ggpubr* (A. Kassambara 2022, version 0.4.0) et *rstatix* (A. Kassambara 2022, version 0.7.0). Par après, au vu des résultats significatifs, un test post-hoc de Tukey (package *rstatix*, A. Kassambara 2022, version 0.7.0) a été utilisé afin d'observer toutes les paires de moyennes possibles via une loi des étendues studentisées. Pour la réalisation des graphiques, plusieurs outils ont été nécessaires. Tout d'abord, *ggplot2* (H. Wickham 2022, version 3.3.6), qui est une extension du *tidyverse* produisant des graphiques munis d'une syntaxe cohérente et puissante (Villanueva et Chen, 2019). Ce système permet ainsi de créer des graphiques de manière déclarative au moyen d'un jeu de données.

Cinquième partie

Résultats

1 Tests de croissance

1.1 *Tenebrio molitor*

1.1.1 Effet du traitement sur la mortalité et le nombre de métamorphoses

La mortalité au cours de l'expérience ne se révèle pas dépendre du régime administré (Figure 24). Aucune p-valeur n'a, par ailleurs, pu être obtenue : l'écart type entre les données était de 0, rendant impossible l'analyse des variances de l'échantillon. Les six régimes atteignent globalement tous le même taux de mortalité, mais pas au même moment de l'expérience. Le traitement témoin négatif (2), exclusivement composé de diète, et celui contenant 33% de PU en poudre (3) maintiennent un nombre de larves mortes nul jusqu'aux 27^{ème} et 31^{ème} jours de l'expérience. Le traitement 3, ainsi que le 5 (PU solide 33%) fournissent par ailleurs les taux de mortalité les plus importants, avec 4 individus morts sur un total de 30 larves. Les quatre autres traitements ne s'en éloignent néanmoins que de peu, avec un nombre total de 3 morts sur les 31 jours d'expérimentation.



FIGURE 24 – Nombre de larves mortes et métamorphosées de *Tenebrio molitor* au cours de l'expérience pour chaque traitement (1 : PU 100%, 2 : diète 100%, 3 : PU poudre 33%, 4 : PU poudre 50%, 5 : PU solide 33%, 6 : PU solide 50%)

Sur cette même figure est également mis en avant le nombre de larves ayant entamé le processus de métamorphose au cours de l'expérience (qui se sont donc transformées en nymphes). Les traitements 5 (PU solide 33%) et 6 (PU solide 50%) démontrent les nombres de nymphes les plus hauts, respectivement de 9 et 7. En revanche, les traitements 2 à 4 ne présentent que 3 à 5 larves métamorphosées pour 0 dans le cas du traitement uniquement composé de plastique (1). En revanche, au niveau de la régularité des métamorphoses, il est possible de souligner que dans les traitements 2 (100% diète) et 3

(PU poudre 33%), des nymphes sont dénombrées dès le 4^{ème} jour de l'expérience alors que le processus a été plus tardif pour les autres traitements (autour du 17^{ème} jour).

1.1.2 Effet du traitement sur la prise de poids

Les tests de croissance ont permis de récolter les données de masses individuelles enregistrées au cours d'une période de 31 jours. Pour un souci de clarté, les prises de poids individuelles au cours du temps ont été représentées via les masses moyennes cumulées au cours du temps, pour chaque traitement (Figure 25).

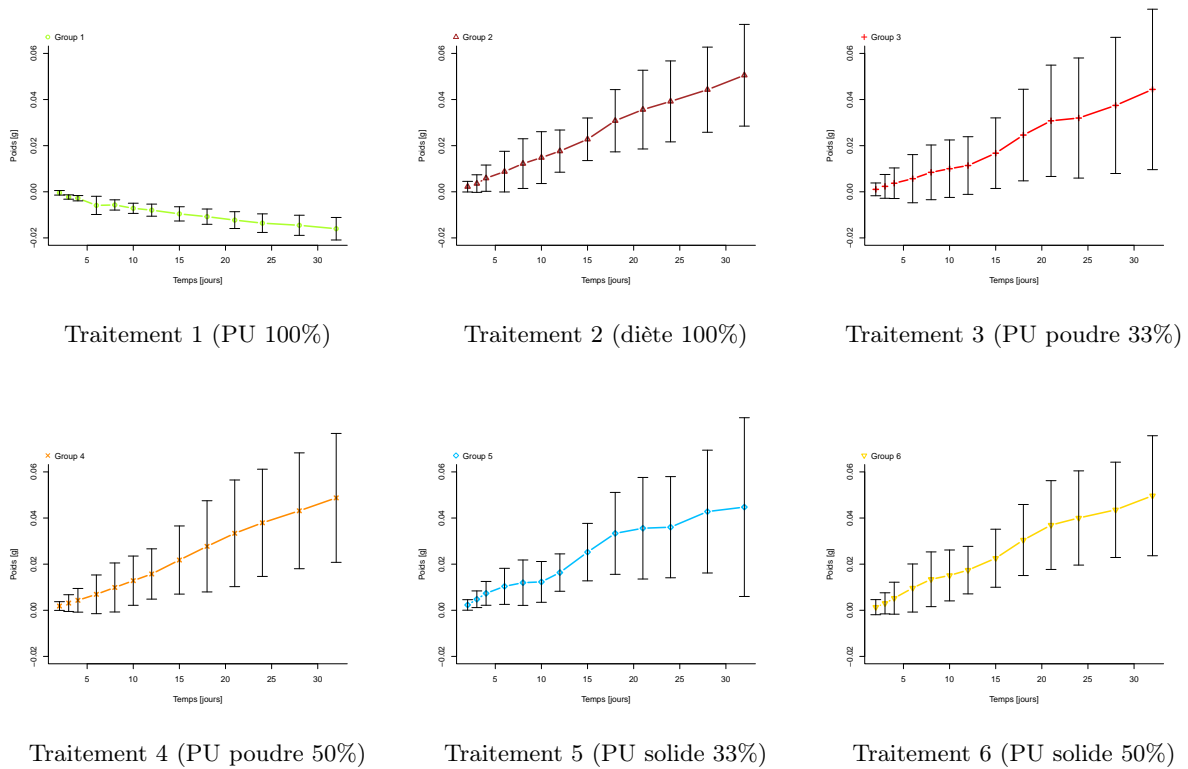


FIGURE 25 – Moyennes des différences de poids cumulées [g] des larves de *Tenebrio molitor* au cours du temps pour chaque traitement

Le choix d'utiliser des différences cumulées a été opéré de sorte à fournir le gain massique moyen au cours du temps, selon la quantité de plastique ingérée. Les larves soumises à un régime uniquement composé de plastique (traitement 1) révèlent une courbe à tendance décroissante; le poids des larves diminue au fur et à mesure de l'expérience. *A contrario*, les 5 autres traitements présentent des courbes ascendantes, qui traduisent un gain de poids plutôt qu'une perte.

Par ailleurs, l'observation de ces graphiques (Figure 25) a mis en avant d'importants écarts types pour les traitements de 2 à 6, symbolisant ainsi des données largement dispersées autour de la moyenne. Ces écarts types s'intensifient au fur et à mesure de l'expérience, témoignant de différences moyennes de poids toujours plus étalées.

1.1.3 Influence du poids initial sur la prise de masse

Certains vers ont débuté l'expérience étant plus légers que d'autres pour parfois une même taille. La Figure 26 met en avant la relation entre le poids initial (au jour 0) et le poids final (au jour 31) de chaque ver selon le régime. Hormis pour le régime 1, aucun nuage de point ne correspond à la droite de régression linéaire (Figure 26, A).

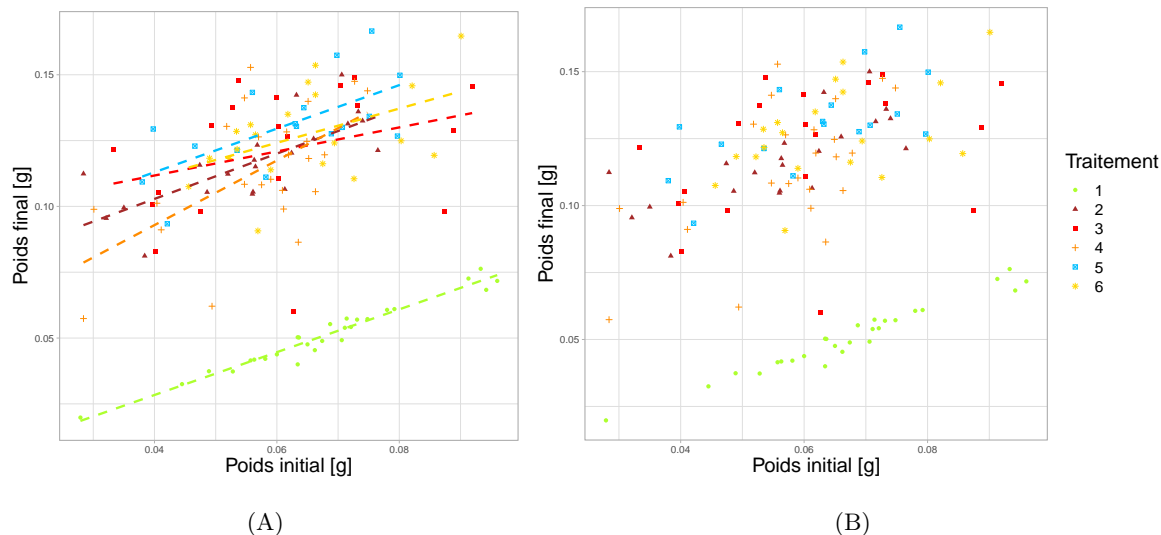


FIGURE 26 – Relation entre le poids initial [g] (jour 0) et le poids final [g] (jour 31) pour chaque individu de *Tenebrio molitor* selon le traitement, avec (A) ou sans (B) droite de régression linéaire

1.1.4 Comparaison des moyennes

De manière plus synthétique, les courbes des différences de poids cumulées des 6 traitements, remises à la même échelle sont présentées en Figure 27. Pour des raisons de lisibilité de la figure, les écarts types, représentés en Figure 25 ne sont pas repris dans ce graphique.

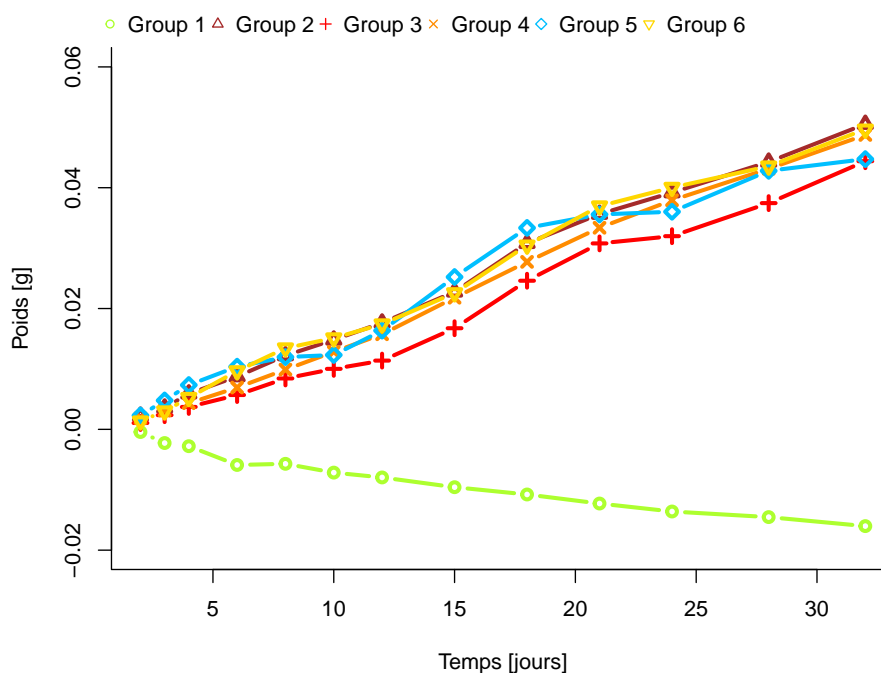


FIGURE 27 – Comparaison des moyennes des différences de poids cumulées de *Tenebrio molitor* au cours du temps entre les traitements

Des différences significatives de moyenne entre le traitement 1 et les cinq autres ont été supposées et il a été envisagé de les confirmer au moyen d'une analyse de la variance (ANOVA) lors du premier et du dernier jour de l'expérience. En ce qui concerne les conditions d'application de l'ANOVA, il s'est avéré que les échantillons étaient tous aléatoires, simples et indépendants entre eux. Bien que les variances des populations soient égales (p-valeur de 0,066 au jour 31 pour 0,681 au jour 0), le test de Shapiro et Wilk a démontré une distribution non normale des populations pour le dernier jour de l'expérience (p-valeurs de 0,660 au jour 0 et de 0,037 au jour 31). Le test non paramétrique de

Kruskall-Wallis a donc été appliqué. Il permet de comparer les médianes des populations en posant comme hypothèse nulle que les échantillons proviennent d'une même population. Cette alternative à l'ANOVA unidirectionnelle a révélé au premier jour de l'expérience que la différence des médianes était non significative (p -valeur = 0,095). En revanche, au 31^{ème} jour, la p -valeur était inférieure à 0,001. L'hypothèse nulle, d'une absence de relation entre les variables, est alors rejetée à l'issue de l'expérience.

Cette tendance peut se confirmer par observation de la Figure 28 ci-dessous, illustrant les différences de poids des larves entre le premier et le dernier jour de l'expérience. Par la suite, un test (post-hoc) des étendues de Tukey a été réalisé de sorte à comparer les traitements un à un et à investiguer de potentielles différences significatives de moyennes dans les échantillons 2 à 6. Ce test de comparaison multiple n'a cependant mis en avant aucune différence significative entre les quatre autres régimes (Annexe 4).

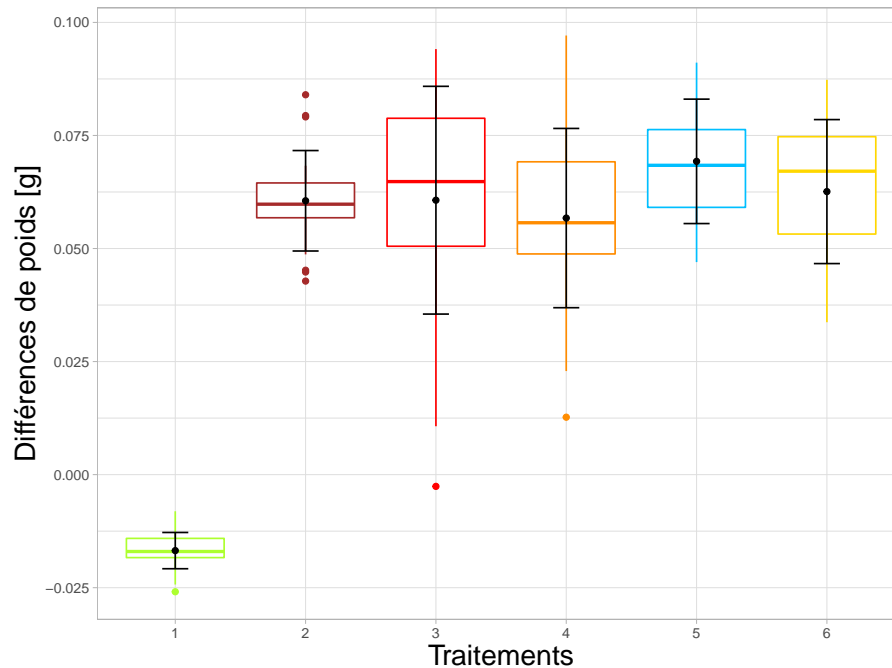


FIGURE 28 – Évolution du poids [g] des larves de *Tenebrio molitor* après 31 jours d'expérience selon le traitement

1.2 *Galleria mellonella*

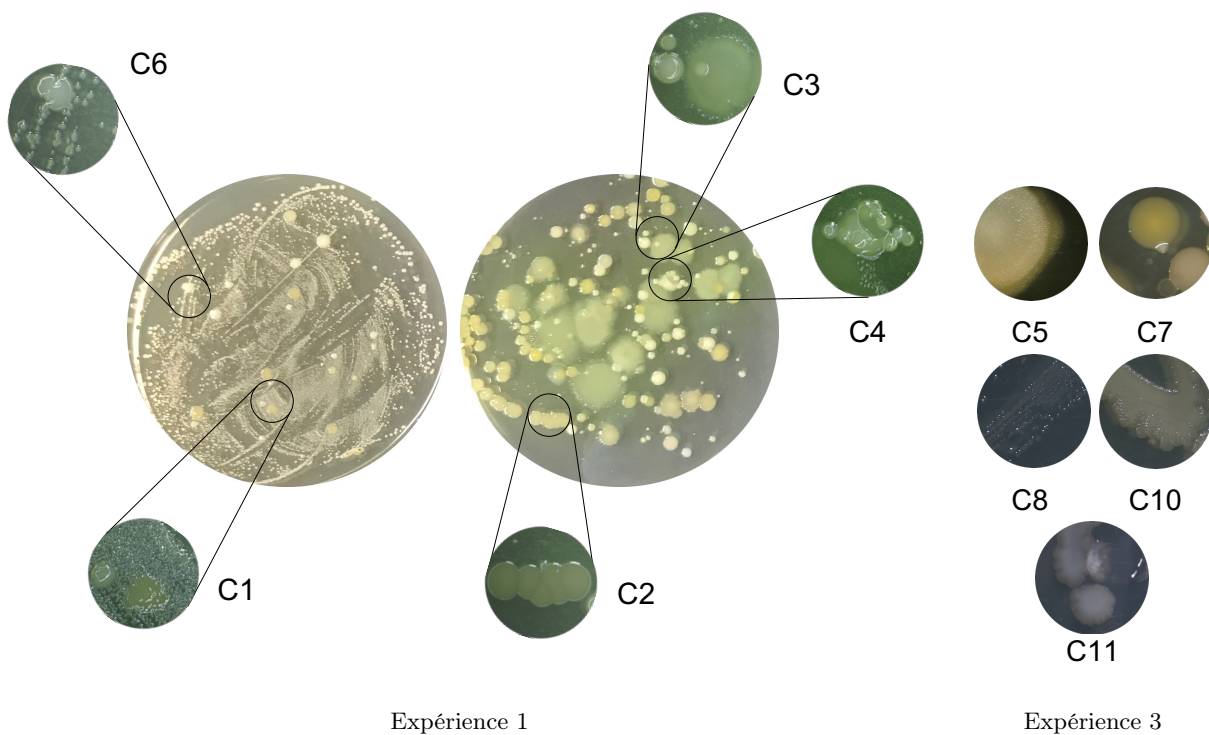
L'expérimentation menée sur les larves de *G. mellonella* n'a pas pu fournir de données valables. En effet, les larves des deux premières répétitions, soit 80 individus, sont toutes mortes ou se sont métamorphosées au cours de l'expérience. Pour le dernier essai, sur 40 larves, 3 ont pu être pesées. En raison du manque d'effectifs, les gains de poids n'ont pas été analysés statistiquement.

2 Caractérisation des communautés bactériennes du tube digestif

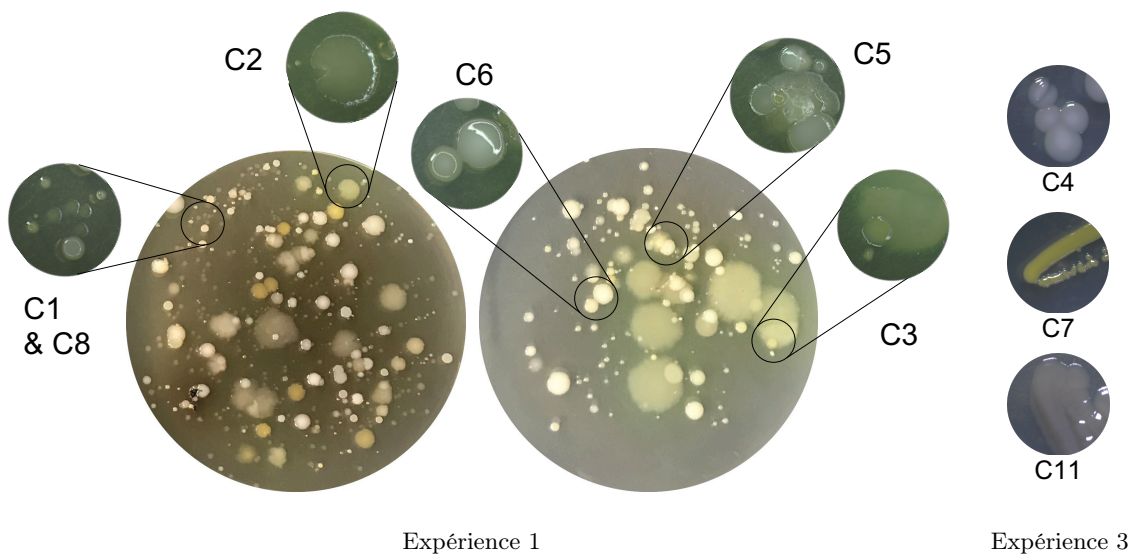
Suite à la mise en culture des tubes digestifs issus des expériences menées sur *T. molitor*, de premières analyses des communautés microbiennes ont pu être réalisées via une caractérisation morphologique ainsi que des colorations de Gram, comme déjà entrepris dans le cadre d'expériences similaires (Machona et al., 2021 ; Saikia et al., 2022). La clé ayant permis d'établir les tableaux présentés ci-après se trouve en Annexe 5. Les bactéries de la seconde répétition de l'expérience n'ont pas pu être exploitées suite à une contamination, probablement issue des manipulations. Une procédure Gram a été appliquée et les résultats sont repris en Table 4 ci-dessous. Il a été envisagé d'identifier au microscope la forme des bactéries afin de parfaire la classification. Cependant, cela a été compromis par le nombre trop important de bactéries sur la lame.

2.1 Identification morphologique

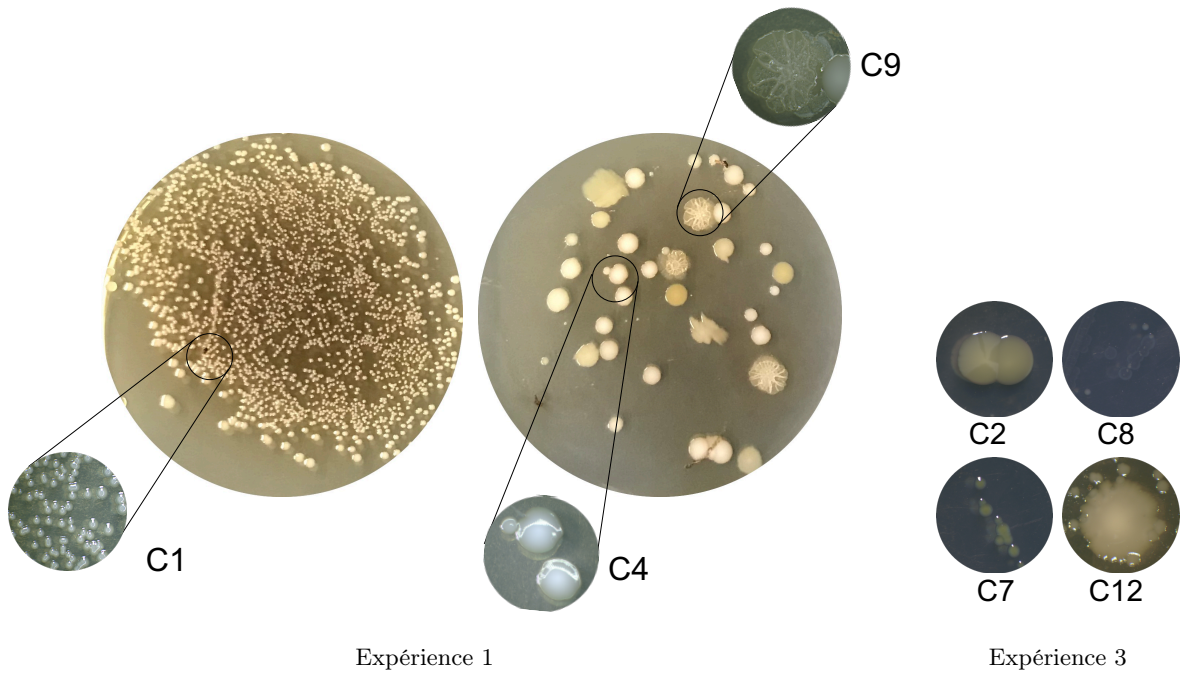
Traitement 1



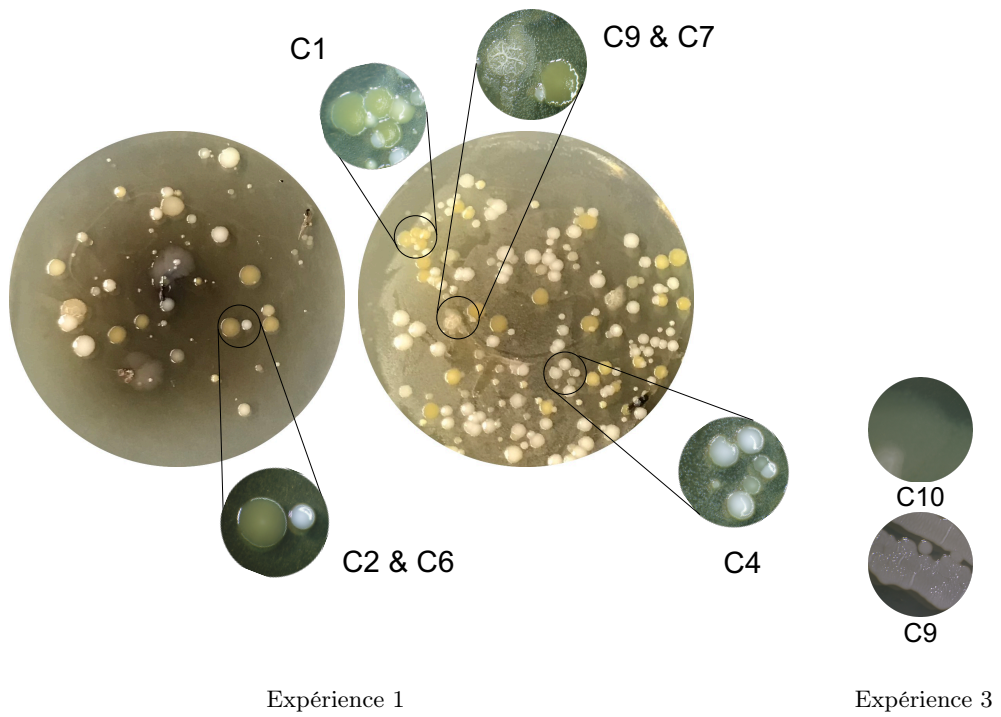
Traitement 2



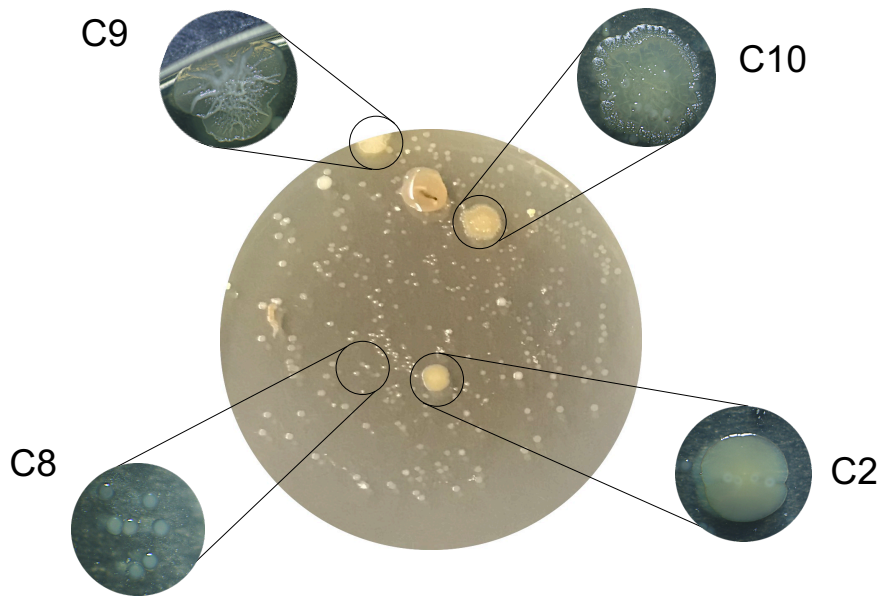
Traitement 3



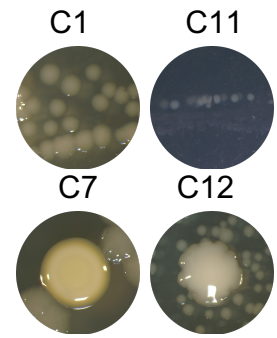
Traitement 4



Traitement 5

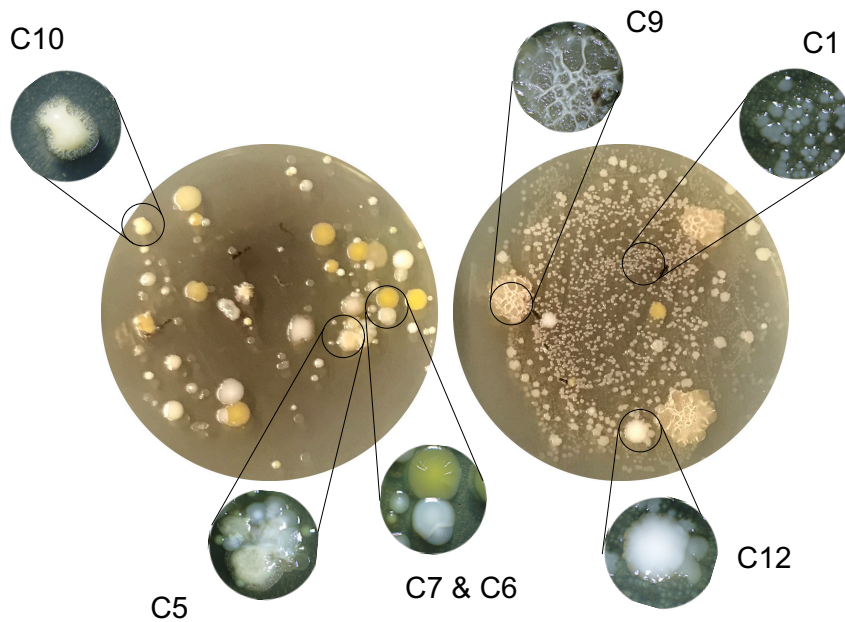


Expérience 1

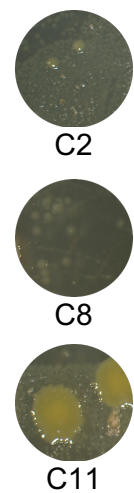


Expérience 3

Traitement 6



Expérience 1



Expérience 3

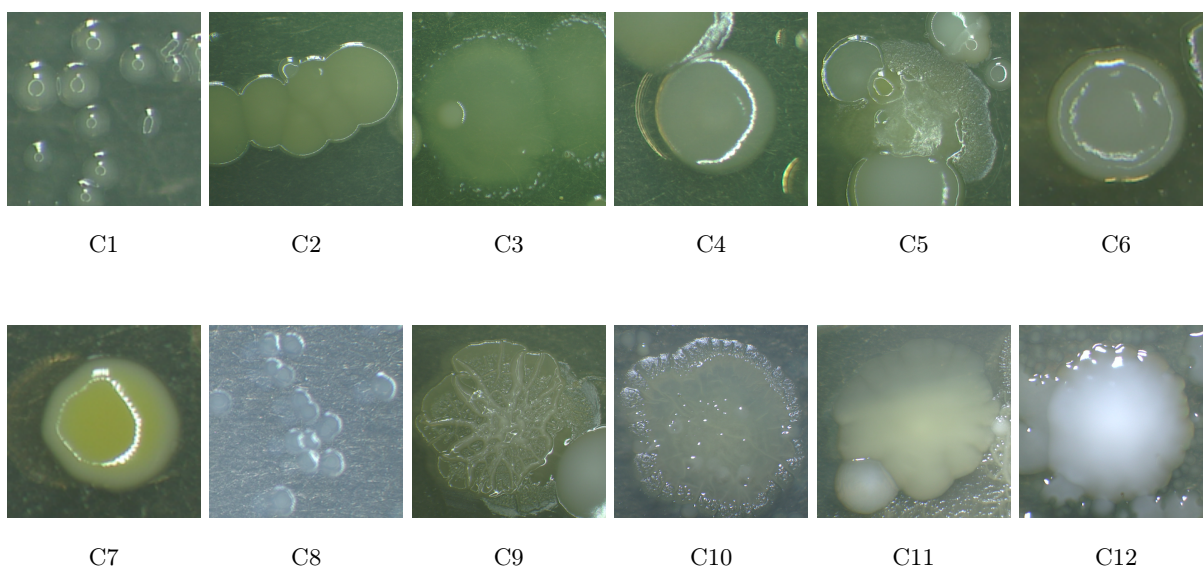
2.2 Récapitulatifs

TABLE 3 – Tableau récapitulatif de l'identification morphologique des colonies bactériennes

Code	Identification morphologique				
	Forme	Couleur	Marge	Élévation	Surface
C1	Punctiforme	Blanc	Entière	Élevée	Humide/lisse
C2	Circulaire	Brun clair/beige	Entière	Plane	Lisse
C3	Irrégulière	« Fluo »	« Curled »	Élevée	Humide/lisse
C4	Circulaire	Blanc	Entière	Convexe/élevée	Lisse
C5	Circulaire	Blanc/beige	« Curled »	Élevée	Rugueuse
C6	Circulaire	Blanc	Entière	Plane	Lisse
C7	Circulaire	Jaune	Entière	Élevée	Lisse
C8	Punctiforme	Transparente	Entière	Élevée	Humide/Lisse
C9	Circulaire	Brun clair/beige	Ondulé	« Umbonate »	Rugueuse/rhizoïdale
C10	Circulaire	Blanc	« Curled »	Élevée	Lisse/rugueuse
C11	Irrégulière	Brun clair/beige	« Scalloped »	Élevée	Lisse
C12	Irrégulière	Blanc	« Scalloped »	Élevée	Lisse

TABLE 4 – Tableau récapitulatif de la présence des colonies dans les traitements et des résultats du test Gram

Isolat/Code	Traitement						Coloration Gram
	1	2	3	4	5	6	
C1	■	■	■	■	■	■	- négative
C2	■	■	■	■	■	■	- négative
C3	■	■	■	■	■	■	- négative
C4	■	■	■	■	■	■	+ positive
C5	■	■	■	■	■	■	- négative
C6	■	■	■	■	■	■	- négative
C7	■	■	■	■	■	■	- négative
C8	■	■	■	■	■	■	+ positive
C9	■	■	■	■	■	■	+ positive
C10	■	■	■	■	■	■	- négative
C11	■	■	■	■	■	■	- négative
C12	■	■	■	■	■	■	- négative



Sixième partie

Discussion

1 Gestion des élevages

1.1 *Tenebrio molitor*

Au niveau de l'élevage de *T. molitor*, il est possible d'affirmer qu'un système efficace a été mis en place. Une maintenance impliquant un tri des nymphes et un ajout régulier de matière fraîche (à raison de 2x par semaine) permettait de disposer en continu de tous les stades de développement de l'espèce. La diète établie (mélange de son et de farine de froment 100%) constituait un bon substrat de croissance ; les larves s'y développant étaient plus grosses que celles élevées sur un mélange de farine et de levure, conservées dans la même logette.

1.2 *Galleria mellonella*

Au vu des problèmes et ajustements rencontrés tout au long de ce travail, une méthodologie d'élevage a pu être établie. Avant tout, les larves sont élevées sur la diète (1x la recette pour 25 à 30 larves) durant les premières semaines de développement. En vue d'éviter le cannibalisme et de fournir de bonnes conditions de développement, le milieu est à renouveler toutes les deux semaines. Une fois que des chrysalides se forment, les cocons sont déplacés dans une nouvelle cage (tri 1 à 2x par semaine). Si le nombre d'adultes est supérieur à 20 à l'issue de l'émergence, comme conseillé dans la littérature, la population est scindée dans deux cages (Marston et al., 1975). D'autres améliorations possibles seraient : des tris réguliers des larves et un regroupement selon les stades (une cage pour les stades L1-L4 et une pour les stades L5-L7), une amélioration du système de fermeture des boîtes (joins plus étanches) et un nettoyage des toiles et cocons (Jorjão et al., 2018). Bien que le dispositif d'élevage soit encore à perfectionner, la population de *G. mellonella* se maintient correctement sur la diète sélectionnée (Metwally et al., 2012) à l'issue de ce travail, preuve que ce substrat de croissance est adapté.

2 Dispositif expérimental

En ce qui concerne *T. molitor*, le dispositif expérimental mis au point pour les tests de croissance s'est révélé adéquat et correspondant aux objectifs recherchés. Le test préparatoire a permis d'optimiser le système avant le début de l'expérience, ce qui a constitué une réelle plus-value.

En revanche, au niveau des tests de croissance de *G. mellonella*, ces derniers ne s'étant pas déroulés comme attendu, il serait pertinent d'améliorer le dispositif sur certains plans. Tout d'abord, le jeûne de 24h précédant le début de l'expérience serait idéalement à éviter afin que les larves (surtout celles des stades L3-L4) n'entament pas affaiblies l'expérience. Lou et al. (2020) avaient cependant prouvé que 36h de jeûne étaient réalisables, si toutefois les larves étaient aux derniers stades de croissance (entre 1,5 et 2,5 cm). Il serait de ce fait judicieux de sélectionner uniquement des larves de stades L5-L6, car ces dernières ont accumulé suffisamment de réserves pour poursuivre leur cycle de vie malgré le régime incluant des polymères plastiques. L'article de Réjasse et al. (2021) confirme bien cette idée en comparant l'ingestion de PE chez *G. mellonella* pour les stades L2-L3 et L5. Ensuite, la durée de l'expérience devrait possiblement être réduite au vu du cycle de vie de ces insectes. Comme mis en évidence dans la littérature, une expérience de 15 jours serait plus adéquate (Yang et al., 2015a). La poudre semble par contre être une forme d'administration appropriée, comme mis en exergue par des recherches similaires (Montazer et al., 2021 ; Wang et al., 2021). Finalement, dans le but d'éviter toute potentielle contamination, il serait préférable de conserver les boîtes individuelles dans une grande boîte étanche permettant toutefois une entrée d'air.

3 Tests de croissance

3.1 Effet du traitement sur le taux de mortalité et l'émergence

Bien qu'il n'existe pas de dépendance directe entre le régime administré et le taux de mortalité, il est constaté qu'au sein des régimes 2 et 3, les morts apparaissaient plus tardivement, lors des derniers jours de l'expérience. Si cette même tendance avait été observée dans le régime 5, l'hypothèse d'une dépendance entre le nombre de morts et les taux de plastiques inférieurs aurait pu être amenée. Néanmoins, cela ne représente pas un critère de sélection du traitement, car *in fine* le nombre de morts n'est pas significativement différent selon le régime. L'absence d'impact de la consommation de plastique sur la survie des vers a par ailleurs été confirmée dans la littérature (Brandon et al., 2018 ; Lou et al., 2020).

Au niveau des larves métamorphosées, le traitement uniquement composé de plastique n'en a pas généré. Des taux de pupation similaires au sein de régimes exclusivement constitués de plastique avaient déjà été recensés dans la littérature ; le plastique comme seconde source de carbone n'assurant pas une disponibilité suffisante en nutriments que pour permettre la croissance et la pupation des vers (Lou et al., 2020). Les traitements 2 et 3 ont dénombré des larves métamorphosées dès le début de l'expérience (aux alentours du 4^{ème} jour). *A contrario*, les 3 autres traitements (4,5,6), incluant les régimes aux quantités plus importantes de plastique administrées, n'ont obtenu des nymphes qu'à la fin de l'expérience. Or, les traitements impliquant du PU solide ont atteint les nombres les plus importants de larves métamorphosées : respectivement 9 et 7 pour les traitements 5 et 6. Étant donné que la pupaison est reconnue comme un indicateur de santé et de développement des larves, un taux de nymphose plus élevé indique que le régime ne répond pas assez aux besoins en nutriments que pour compléter le cycle de développement (Wang et al., 2022). Il est alors possible d'affirmer que le traitement a bien une influence sur le cycle de vie des larves et que de ce fait, les traitements 4 et 6 génèrent des taux de pupaison inférieurs aux 3 et 5, et seraient ainsi plus adaptés. Dans le cadre d'expériences similaires à celle-ci, Bulak et ses collègues (2021) ont démontré que des larves soumises à un régime à base de PU se métamorphosaient plus tôt (10^{ème} jour de l'expérience) que celles se nourrissant de PE ou de PS. Cette observation témoignerait d'une moins bonne habilité à la dégradation du PU que des autres polymères chez *T. molitor*.

Une manière d'aller plus loin dans l'analyse de ces effets pourrait être de disséquer les larves mortes au cours de l'expérience afin d'étudier les communautés microbiennes se développant dans leur tube digestif. Une étude comparative pourrait alors être menée sur les microbiotes des larves mortes durant l'expérience et celles ayant survécu. Des dispositions génétiques à dégrader les polymères sont peut-être à signaler au sein d'une même population de vers.

3.2 Effet du traitement sur la prise de poids

Les graphiques des différences de poids moyennes cumulées au cours du temps n'ont mis en évidence que peu de différences significatives au sein des traitements. Néanmoins, ce sont les deux régimes composés de PU 50% qui ont, à la fin de l'expérience, généré les gains de poids les plus importants. Le graphique récapitulatif de toutes les différences de poids moyennes démontre même que ces deux régimes (4 et 6) suivent une évolution de poids similaire au contrôle négatif (2, 100% diète). La comparaison statistique des moyennes n'a pourtant révélé aucune différence significative au sein des quatre régimes à base de plastique.

Une différence significative est à souligner entre les moyennes de poids des traitements 2-3-4-5-6 et le contrôle positif (1, 100% plastique). L'analyse des graphiques le confirme bien : il y a diminution du poids des larves au cours de l'expérience pour le traitement 1, et gain de poids pour les 5 autres. Au vu de la prise de poids globale de tous les régimes contenant du plastique, l'hypothèse d'une absence de consommation de polyuréthane pourrait être soulevée. Pourtant, l'observation journalière a révélé dans une dizaine de boîtes des galeries creusées par les vers de farine au sein du polyuréthane, abondant dans l'idée d'une ingestion potentielle de ce dernier.



FIGURE 29 – Galerie creusée dans le PU par une larve de *Tenebrio molitor*

Dans l'idée d'approfondir cette réflexion et d'analyser la quantité de plastique exacte consommée par les larves, l'expérience a été reproduite et, à l'issue de celle-ci, le polyuréthane sera étudié au moyen d'une technique spéciale de spectrophotométrie (Raman). Le spectre du polyuréthane fournira plus d'informations sur les galeries creusées lors de la mastication par les ténébrions. Cependant, les résultats ne seront pas obtenus dans le cadre de ce travail.

3.3 Effet du poids initial sur la prise de poids

Au niveau des importants écarts types, témoignant d'une forte dispersion des valeurs autour de la moyenne, l'effet du poids initial a été soulevé. En effet, les vers étant sélectionnés sur base d'un critère de taille (gamme de 1,5 à 2 cm), ils ne pesaient pas tous le même poids en début d'expérience et cela aurait pu jouer sur le gain de masse final. Or, l'analyse graphique n'a révélé aucune dépendance directe du poids final en fonction du poids initial, si ce n'est pour le traitement 1 (uniquement composé de PU). Le critère de taille peut ainsi continuer à être appliqué pour la sélection des vers.

Une autre hypothèse pouvant expliquer ces valeurs de poids inégales serait le fait, précédemment évoqué, que les consommations individuelles de plastique par les vers ne sont pas connues. Cela implique donc que le gain de poids ne soit pas constant d'un ver du même traitement à l'autre. Cette supposition pourrait être vérifiée lors des analyses complémentaires des tubes digestifs. De plus, le nombre de larves ayant achevé l'expérience n'était pas identique selon le traitement, impactant de ce fait la variabilité des résultats.

3.4 Choix du taux d'incorporation et de la forme

Le régime (polymère et son/farine) augmente bien la consommation de plastique et est donc un bon compromis pour favoriser la croissance des vers tout en leur faisant ingérer du PU (Peng et al., 2019). Au niveau de la forme de PU, la forme solide semble être celle qui maximise la prise de poids tout en maintenant des taux de mortalité raisonnables au vu des autres traitements. Bulak et al. (2021), ayant mené une expérience similaire à celle-ci, ont par ailleurs conclu qu'il était plus aisé pour les vers de farine de mordre et mâcher quelque chose de rigide et cassant plutôt que flexible et mou. De plus, lors des pesées régulières des vers, la forme solide du PU permettait de réduire les pertes de matières lors des manipulations et, dès lors, de diminuer les erreurs de mesure.

4 Caractérisation des communautés bactériennes du tube digestif

4.1 Mises en culture sur milieu solide

La mise en culture des tubes digestifs a révélé, comme dans la littérature, un certain nombre d'isolats bactériens, certains étant potentiellement liés au régime alimentaire administré (Saikia et al., 2022).

La technique de coloration Gram a permis de caractériser plus précisément ces isolats. De premières hypothèses peuvent être posées sur les colonies naturellement présentes peu importe le régime : la C1, C2, C7. La C8 pourrait également être représentée quel que soit le régime, bien qu'elle soit absente du traitement 4 ; des erreurs lors des manipulations pourraient l'expliquer. Ces colonies pourraient dès lors appartenir à trois phylas prédominants dans l'intestin de *T. molitor*, tous régimes confondus : Firmicutes, Tenericutes, et Proteobacteria (Lou et al., 2020 ; Urbanek et al., 2020 ; Yang et al., 2018). La colonie dominante dans les régimes aux taux de plastique les plus importants est la C10, même si cette dernière est absente du traitement 3. Au vu du plastique administré, cet isolat bactérien serait associé à la famille des entérobactéries (Bulak et al., 2021 ; Wang et al., 2022). Lorsqu'une supplémentation en son est appliquée, le microbiome intestinal des vers de farine se modifie et la présence de *Lactococcus* et de *Pediococcus* augmente (Lou et al., 2020 ; Yang et al., 2021). Ces deux bactéries lactiques sont connues pour maintenir un bon environnement au microbiome intestinal (Lou et al., 2020). Au vu de l'absence des colonies C9 et C12 dans le contrôle positif, seul traitement dépourvu de son, il pourrait s'agir d'un de ces deux genres bactériens. Inversement, les isolats C3, C4, C5 et C6 sont complètement absents des traitements de PU solide ; cela pourrait cependant être associé à des erreurs de manipulations ou au manque d'échantillons pour ces régimes.

Des précautions sont malgré tout de mise, car cette identification a essentiellement reposé sur de l'observation morphologique et qu'elle comporte donc certains biais. Afin d'éviter au maximum les erreurs, les colonies à l'aspect similaire, mais où des incertitudes demeuraient, ont été considérées comme isolats distincts. Par ailleurs, les mises en culture n'ont pas toutes abouti, et les six traitements n'étaient pas tous correctement représentés. En effet, les traitements 5 et 6, aux hauts taux de métamorphoses, ont permis de réaliser moins de mises en culture que les autres. Tous ces éléments contribuent à nuancer les résultats obtenus.

4.2 Résultats du séquençage

Bien que les résultats du séquençage de l'ADN et de l'analyse protéomique ne figureront pas dans ce travail, de premières suppositions peuvent déjà être émises quant aux résultats qui en découleront.

4.2.1 *Tenebrio molitor*

Avant tout, il est important de rappeler que la plupart des microbes intestinaux de *T. molitor* appartiennent à trois phylas prédominants, quelles que soient les conditions d'alimentation : Firmicutes, Tenericutes, et Proteobacteria. Des études ont révélé que *Spiroplasma*, *Lactococcus*, et *Enterococcus* étaient des genres prédominants pour tous les régimes (Lou et al., 2020 ; Yang et al., 2018). Le PU étant moins sensible à la biodégradation que le PE et le PS, la majorité des recherches se focalisent sur l'étude de l'incorporation de ces polymères au régime des *T. molitor* (Bulak et al., 2021). Néanmoins, il a été mis en avant que la communauté microbienne des vers nourris au PU contenait davantage d'*Enterobacteriaceae* et d'*Hafnia* non classifiés, familles fortement associées à un régime de PU (Wang et al., 2022). *A contrario*, la population de *Spiroplasma* est moins abondante en cas de régime PU, preuve d'une non-implication dans la dégradation de ces composés (Wang et al., 2022).

4.2.2 *Galleria mellonella*

Bien que peu d'échantillons de tube digestif de *G. mellonella* seront analysés par séquençage, de premières hypothèses peuvent toutefois être avancées. Le microbiote de ce lépidoptère, composé principalement de Firmicutes (*Enterococcus*) et d'une quantité plus faible de Cyanobactéries et de Protéobactéries (Réjasse et al., 2021) se modifie lorsque le régime contient du plastique. Lorsque les larves sont nourries au PE, la diversité de communautés se réduit et la population dominante est affiliée à *Serratia* sp. et *Enterococcus* sp. (Lou et al., 2020). En 2018, Samuel Latour qui réalisait un travail de fin d'études sur une thématique similaire, avait identifié les genres *Citrobacter* et *Corynebacterium* comme associés à une diète à base de polyéthylène.

Septième partie

Conclusions

À l'issue de ce travail, deux élevages d'insectes aux capacités dégradatives de plastique ont été initiés. Bien que le dispositif soit encore à améliorer pour *G. mellonella*, il est possible d'affirmer que le système mis au point pour *T. molitor* est adéquat. Tous les stades de développement des deux espèces sont cependant disponibles en permanence et les populations se maintiennent.

Les tests de croissance ont fourni une meilleure connaissance de l'impact de la consommation de polymères sur les larves de *T. molitor*. En effet, ces tests ont révélé une indépendance du régime sur le taux de mortalité, mais une influence de ce dernier sur la métamorphose. Par ailleurs, le poids des individus en début d'expérience n'influence pas la prise de poids, les gammes de tailles choisies (1,5 à 2 cm) constituent donc un bon critère de sélection des vers. L'absence de différences significatives des moyennes journalières de poids entre les traitements 2 à 6 peut être à nuancer au regard de la consommation de plastique par les larves. De fait, n'ont pas été évaluées avec précision les proportions de diète et de PU ingérées. Relever quotidiennement la masse du plastique solide serait une voie d'amélioration, en veillant à ôter minutieusement chaque particule de diète du fragment ; ce qui n'avait pas été fait dans le cadre de cette expérience. De plus, de futures analyses des tubes digestifs des *T. molitor* seront réalisées dans le cadre du projet *PLASTINSECT*, dont ce travail constitue un des premiers maillons. En outre, la mousse de PU en fin d'expérience sera étudiée au moyen d'une technique spéciale de spectrophotométrie (analyse Raman). Ces perspectives d'approfondissement fourniront plus d'informations sur la quantité exacte de plastique consommée par les vers et sur de potentielles nouvelles fonctions chimiques en découlant. À ce stade de l'étude, il est toutefois possible d'établir pour *T. molitor* un choix de diète standardisée à base de plastique comme substrat de croissance : le PU 50%, à savoir des proportions égales de diète et de PU. Avant d'entamer un élevage uniquement sur ce substrat, il pourrait être judicieux d'évaluer la réponse d'un plus grand nombre de larves à cet environnement (10 à 20 individus).

Ce régime à base de polymère permettra à terme une identification des bactéries intestinales, impliquées ou non dans la dégradation, en vue de sélectionner une population de *T. molitor* dont la microflore est adaptée à ce régime. L'utilisation des insectes comme alternative aux méthodes de dégradation traditionnelles de plastique n'est tout de même pas envisageable. Cette biodégradation est à questionner au vu des taux de dégradation faibles, qui nécessiteraient des systèmes de gestion non réalisables (Billen et al., 2020). De plus, la présence élevée de microplastiques dans les fèces des larves pourrait poser problème car encore moins aisés à dégrader que les grosses particules (Réjasse et al., 2021). L'analyse des fèces avait été entamée dans ce travail, via la pesée de chaque élément du dispositif expérimental, mais abrogée de par les imprécisions de mesures générées. Seules les valeurs de poids des vers, suffisamment précises, ont été retenues. Des recherches ultérieures seraient donc à envisager, incluant l'étude du microbiome et des fèces de ces insectes (Bulak et al., 2021).

Une première étude des communautés présentes dans le tube digestif de *T. molitor* et *G. mellonella* a été amorcée dans le présent travail. La caractérisation morphologique de ces colonies bactériennes mises en culture a révélé une dépendance du régime sur la présence ou non de certains isolats. L'analyse par séquençage de l'ADN et des protéines permettra d'associer les isolats à des genres bactériens, et de parfaire cette caractérisation. Des hypothèses peuvent d'ores et déjà être émises : la famille des *Enterobacteriaceae* serait dominante, avec une abondance d'*Hafnia* non classifiés, dans le tube digestif des *T. molitor* nourris au PU. Concernant *G. mellonella*, les familles des *Serratia* et des *Enterobacteriaceae*, ainsi que les genre *Citrobacter* et *Corynebacterium* seraient associés à un régime à base de PE. Or, de nombreuses pistes restent à explorer. Le processus d'ingestion en tant que tel du plastique est encore méconnu, ainsi que la nature de la dégradation. Les résultats obtenus ont malgré tout ouvert des perspectives de recherche pour répondre à l'objectif global de développement de nouveaux modes de dégradation des déchets plastiques.

Bibliographie

- Akindoyo, J. O., Beg, M. D. H., Ghazali, S., Islam, M. R., Jeyaratnam, N. & Yuvaraj, A. R. (2016). Polyurethane types, synthesis and applications – a review. *RSC Advances*, 6(115), 114453-114482. <https://doi.org/10.1039/C6RA14525F>
- Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., Pollard, B. C., Dominick, G., Duman, R., El Omari, K., Mykhaylyk, V., Wagner, A., Michener, W. E., Amore, A., Skaf, M. S., Crowley, M. F., Thorne, A. W., Johnson, C. W., Woodcock, H. L., ... Beckham, G. T. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.1718804115>
- Bhardwaj, H., Gupta, R. & Tiwari, A. (2012). Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 575-579. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0456-z>
- Billen, P., Khalifa, L., Van Gerven, F., Tavernier, S. & Spatari, S. (2020). Technological application potential of polyethylene and polystyrene biodegradation by macro-organisms such as mealworms and wax moth larvae. *Science of The Total Environment*, 735, 139521. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139521>
- Bombelli, P., Howe, C. J. & Bertocchini, F. (2017). Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology*, 27(8), R292-R293. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.060>
- Bożek, M., Hanus-Lorenz, B. & Rybak, J. (2017). The studies on waste biodegradation by *Tenebrio molitor* (B. Kaźmierczak, M. Kutylowska, K. Piekarska & A. Trusz-Zdybek, Éd.). *E3S Web of Conferences*, 17, 00011. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20171700011>
- Brandon, A. M., Gao, S.-H., Tian, R., Ning, D., Yang, S.-S., Zhou, J., Wu, W.-M. & Criddle, C. S. (2018). Biodegradation of Polyethylene and Plastic Mixtures in Mealworms (Larvae of *Tenebrio molitor*) and Effects on the Gut Microbiome. *Environmental Science & Technology*, 52(11), 6526-6533. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02301>
- Bulak, P., Proc, K., Pytlak, A., Puszka, A., Gawdzik, B. & Bieganowski, A. (2021). Biodegradation of Different Types of Plastics by *Tenebrio molitor* Insect. *Polymers*, 13(20), 3508. <https://doi.org/10.3390/polym13203508>
- Carmen, S. (2021). Microbial capability for the degradation of chemical additives present in petroleum-based plastic products : A review on current status and perspectives. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123534. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123534>
- Cassone, B. J., Grove, H. C., Kurchaba, N., Geronimo, P. & LeMoine, C. M. (2021). Fat on plastic : Metabolic consequences of an LDPE diet in the fat body of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Hazardous Materials*, 425, 127862. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127862>
- Celik, G., Kennedy, R. M., Hackler, R. A., Ferrandon, M., Tennakoon, A., Patnaik, S., LaPointe, A. M., Ammal, S. C., Heyden, A., Perras, F. A., Pruski, M., Scott, S. L., Poepelmeier, K. R., Sadow, A. D. & Delferro, M. (2019). Upcycling Single-Use Polyethylene into High-Quality Liquid Products. *ACS Central Science*, 5(11), 1795-1803. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00722>
- Cotton, R. T. (1927). Notes on the Biology of the Meal Worms, *Tenebrio Molitor* Linne and *T. Obscurus* Fab. *Annals of the Entomological Society of America*, 20(1), 81-86. <https://doi.org/10.1093/aesa/20.1.81>
- Cotton, R. T. & Saint George, R. A. (1929). The Meal Worms. *U.S. Department of Agriculture. Technical Bulletin*, (95).
- Daggy, T. (1946). Notes on the ecology and taxonomy of certain pupae of the family Tenebrionidae (Coleoptera). *Proc. Indiana Acad. Sci.*, (56), 253-260.

- Desai, A., Siddhapara, M., Patel, P. & Prajapati, A. (2019). Biology of Greater Wax Moth, *Galleria Mellonella* L. on Artificial Diet. *J. Exp. Zool. India*, 22(2), 1267-1272.
- Eriksen, M., Christiansen, J., Daugaard, A. & Astrup, T. (2019). Closing the loop for PET, PE and PP waste from households : Influence of material properties and product design for plastic recycling. *Waste Management*, 96, 75-85. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.07.005>
- Eriksson, T., Andere, A., Kelstrup, H., Emery, V. & Picard, C. (2020). The yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) genome : a resource for the emerging insects as food and feed industry. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(5), 445-455. <https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0057>
- Faravelli, T., Pincioli, M., Pisano, F., Bozzano, G., Dente, M. & Ranzi, E. (2001). Thermal degradation of polystyrene. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, (60), 103-121.
- Genta, F. A., Dillon, R. J., Terra, W. R. & Ferreira, C. (2006). Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 52(6), 593-601. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.02.007>
- Geyer, R., Jambeck, J. R. & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Gorghiu, L., Jipa, S., Zaharescu, T., Setnescu, R. & Mihalcea, I. (2004). The effect of metals on thermal degradation of polyethylenes. *Polymer Degradation and Stability*, 84(1), 7-11. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00265-9](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00265-9)
- Guillet, J. E., Regulski, T. W. & McAneney, T. B. (1974). Biodegradability of Photodegraded Polymers. *Environmental Science & Technology*, 8(10), 923-925. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/es60095a011>
- Hansen, L. L., Ramløv, H. & Westh, P. (2004). Metabolic activity and water vapour absorption in the mealworm *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae) : real-time measurements by two-channel microcalorimetry. *Journal of Experimental Biology*, 207(3), 545-552. <https://doi.org/10.1242/jeb.00762>
- Ho, B. T., Roberts, T. K. & Lucas, S. (2018). An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene : the microbial approach. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 308-320. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1355293>
- Howard, R. S. (1955). The Biology of the Grain Beetle *Tenebrio molitor* with Particular Reference to Its Behavior. *Ecology*, 36(2), 262-269. <https://doi.org/10.2307/1933231>
- Jiang, S., Su, T., Zhao, J. & Wang, Z. (2021). Biodegradation of Polystyrene by *Tenebrio molitor*, *Galleria mellonella*, and *Zophobas atratus* Larvae and Comparison of Their Degradation Effects. *Polymers*, 13(20), 3539. <https://doi.org/10.3390/polym13203539>
- Johansen, M. R., Christensen, T. B., Ramos, T. M. & Syberg, K. (2022). A review of the plastic value chain from a circular economy perspective. *Journal of Environmental Management*, 302, 113975. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113975>
- Jorjão, A. L., Oliveira, L. D., Scorzoni, L., Figueiredo-Godoi, L. M. A., Prata, M. C., Jorge, A. O. C. & Junqueira, J. C. (2018). From moths to caterpillars : Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence*, 9(1), 383-389. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1397871>
- Jung, J., Heo, A., Park, Y. W., Kim, Y. J., Koh, H. & Park, W. (2014). Gut Microbiota of *Tenebrio molitor* and Their Response to Environmental Change. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 888-897. <https://doi.org/10.4014/jmb.1405.05016>
- Kim, S. Y., Kim, H. G., Yoon, H. J., Lee, K. Y. & Kim, N. J. (2017). Nutritional analysis of alternative feed ingredients and their effects on the larval growth of *Tenebrio molitor* (Coleoptera : Tenebrionidae) :

Alternative feeds for *Tenebrio molitor*. *Entomological Research*, 47(3), 194-202. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12236>

- Kim, S.-Y., Park, J. B., Lee, Y.-B., Hyung, J. Y., Lee, K.-Y. & Kim, N.-J. (2015). Growth characteristics of mealworm *Tenebrio molitor*. *Journal of Sericultural and Entomological Science*, 53(1), 1-5. <https://doi.org/10.7852/JSES.2015.53.1.1>
- Kumar, G. & Khan, M. (2018). Study of the life cycle of greater wax moth (*Galleria mellonella*) under storage conditions in relation to different weather conditions. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 444-447.
- Kundungal, H., Gangarapu, M., Sarangapani, S., Patchaiyappan, A. & Devipriya, S. P. (2019). Role of pretreatment and evidence for the enhanced biodegradation and mineralization of low-density polyethylene films by greater waxworm. *Environmental Technology*, 42(5), 717-730. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1643925>
- Kwadha, C. A., Ong'amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K. & Fombong, A. T. (2017). The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8(2), 61. <https://doi.org/10.3390/insects8020061>
- Leclercq, J. (1948a). Enquête biogéographique sur le genre *Tenebrio* (Linné, 1758) (Coleoptera Tenebrionidae). *Bulletin du Musée royal d'Histoire naturelle de Belgique*, 14(9).
- Leclercq, J. (1948b). Enquête parasitologique sur le ver de farine *Tenebrio Molitor* L. *Lambillionea*, 48(5/6-7/8), 43-47/52-58.
- Leclercq, J. (1953). Mise en évidence de préférences alimentaires chez *Tenebrio Molitor* L. (Coléoptère Tenebrionidae) (Première note). *Archives Internationales de Physiologie*, 61(3), 358-386.
- Leclercq, J. (1956). Élevage de deux races de *Tenebrio molitor* L. (Insecte Coléoptère Tenebrionidae) dans une série de farines de céréales. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, (9).
- Leclercq, J. (1965). Premiers essais d'utilisation des larves de *Tenebrio Molitor* pour comparer la valeur nutritive des protéines. *Annales de la nutrition et de l'alimentation*, 19, 47-58.
- Li, X., Chen, L., Mei, Q., Dong, B., Dai, X., Ding, G. & Zeng, E. Y. (2018). Microplastics in sewage sludge from the wastewater treatment plants in China. *Water Research*, 142, 75-85. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.034>
- Liu, C., Masri, J., Perez, V., Maya, C. & Zhao, J. (2020). Growth Performance and Nutrient Composition of Mealworms (*Tenebrio Molitor*) Fed on Fresh Plant Materials-Supplemented Diets. *Foods*, 9(2), 151. <https://doi.org/10.3390/foods9020151>
- Lou, Y., Ekaterina, P., Yang, S.-S., Lu, B., Liu, B., Ren, N., Corvini, P. F.-X. & Xing, D. (2020). Biodegradation of Polyethylene and Polystyrene by Greater Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella* L.) and the Effect of Co-diet Supplementation on the Core Gut Microbiome. *Environmental Science & Technology*, 54(5), 2821-2831. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07044>
- Lou, Y., Li, Y., Lu, B., Liu, Q., Yang, S.-S., Liu, B., Ren, N., Wu, W.-M. & Xing, D. (2021). Response of the yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) gut microbiome to diet shifts during polystyrene and polyethylene biodegradation. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 126222. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126222>
- Ludwig, D. & Fiore, C. (1960). Further Studies on the Relationship between Parental Age and the Life Cycle of the Mealworm, *Tenebrio Molitor*. *Annals of the Entomological Society of America*, 53(5), 595-600. <https://doi.org/10.1093/aesa/53.5.595>
- Machona, O., Chidzwindo, F. & Mangoyi, R. (2021). *Tenebrio molitor* : possible source of polystyrene-degrading bacteria. *BMC Biotechnology*, 22(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00733-3>

- Marston, N., Campbell, B. & Boldt, P. (1975). Mass Producing Eggs of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (L.) *Technical bulletin (United States. Dept. of Agriculture)*, (1510). <https://doi.org/10.22004/ag.econ.158120>
- Marston, N. & Campbell, B. (1973). Comparison of Nine Diets for Rearing *Galleria mellonella*. *Annals of the Entomological Society of America*, 66(1), 132-136. <https://doi.org/10.1093/aesa/66.1.132>
- Mathur, G. & Prasad, R. (2012). Degradation of Polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) Isolated from Soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(6), 1595-1602. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9572-4>
- Maul, J., Frushour, B. G., Kontoff, J. R., Eichenauer, H., Ott, K.-H. & Schade, C. (2007). Polystyrene and Styrene Copolymers. In Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Éd.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (p. 475-485). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. https://doi.org/10.1002/14356007.a21_615.pub2
- McConnell, M. W. & Judge, K. A. (2018). Body size and lifespan are condition dependent in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*, but not sexually selected traits. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 72(3), 32. <https://doi.org/10.1007/s00265-018-2444-3>
- Metwally, H. M. S., Hafez, G. A., Hussein, M. A., Hussein, M. A., Salem, H. A. & Saleh, M. M. E. (2012). Low Cost Artificial Diet for Rearing the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera : Pyralidae) as a Host for Entomopathogenic Nematodes. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 22(1), 15-17.
- Mierzwa-Hersztek, M., Gondek, K. & Kopeć, M. (2019). Degradation of Polyethylene and Biocomponent-Derived Polymer Materials : An Overview. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(3), 600-611. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01368-4>
- Montazer, Z., Habibi Najafi, M. B. & Levin, D. B. (2021). *In vitro* degradation of low-density polyethylene by new bacteria from larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Canadian Journal of Microbiology*, 67(3), 249-258. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0208>
- Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Onuma, F. & Nakahara, T. (1999). Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(2), 134-140. <https://doi.org/10.1007/s002530051373>
- Nielsen, R. A. & Brister, C. D. (1979). Greater Wax Moth : Behavior of Larvae. *Annals of the Entomological Society of America*, 72(6), 811-815. <https://doi.org/10.1093/aesa/72.6.811>
- Ong, S. Y., Kho, H.-P., Riedel, S. L., Kim, S.-W., Gan, C.-Y., Taylor, T. D. & Sudesh, K. (2018). An integrative study on biologically recovered polyhydroxyalkanoates (PHAs) and simultaneous assessment of gut microbiome in yellow mealworm. *Journal of Biotechnology*, 265, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.10.017>
- Paddock, F. (1918). The Beemoth or Waxworm. *Texas Agricultural Experiment Station*, (231), 38.
- Park, H., Jung, B. H., Han, T., Lee, Y.-B., Kim, S. H. & Kim, N.-J. (2013). Taxonomy of introduced commercial insect, *Zophobas atratus* (Coleoptera : Tenebrionidae) and a comparison of DNA barcoding with similar tenebrionids, *Promethis valgipes* and *Tenebrio molitor* in Korea. *Journal of Sericultural and Entomological Science*, 51(2), 185-190. <https://doi.org/10.7852/JSES.2013.51.2.185>
- Park, J. B., Choi, W. H., Kim, S. H., Jin, H. J., Han, Y. S., Yong, s. L. & Kim, N. J. (2014). Developmental characteristics of *Tenebrio molitor* larvae (Coleoptera : Tenebrionidae) in different instars. *International Journal of Industrial Entomology*, 28(1), 5-9. <https://doi.org/10.7852/IJIE.2014.28.1.5>
- Peacock, A. (2000). *Handbook of Polyethylene* (Marcel Dekker, Inc.).

- Peng, B.-Y., Chen, Z., Chen, J., Yu, H., Zhou, X., Criddle, C. S., Wu, W.-M. & Zhang, Y. (2020). Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera : Tenebrionidae) larvae. *Environment International*, 145, 106106. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106106>
- Peng, B.-Y., Su, Y., Chen, Z., Chen, J., Zhou, X., Benbow, M. E., Criddle, C. S., Wu, W.-M. & Zhang, Y. (2019). Biodegradation of Polystyrene by Dark (*Tenebrio obscurus*) and Yellow (*Tenebrio molitor*) Mealworms (Coleoptera : Tenebrionidae). *Environmental Science & Technology*, 53(9), 5256-5265. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06963>
- Petersen, N. (1986). Dissection on a Micro Scale. *The Science Teacher*, 53(8), 19-21.
- Peydaei, A., Bagheri, H., Gurevich, L., de Jonge, N. & Nielsen, J. L. (2021). Mastication of polyolefins alters the microbial composition in *Galleria mellonella*. *Environmental Pollution*, 280, 116877. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116877>
- PlasticsEurope. (2019). *Enabling a sustainable future*. Récupérée 23 juillet 2022, à partir de <https://plasticseurope.org/>
- Réjasse, A., Waeytens, J., Deniset-Besseau, A., Crapart, N., Nielsen-Leroux, C. & Sandt, C. (2021). Plastic biodegradation : Do *Galleria mellonella* Larvae Bioassimilate Polyethylene? A Spectral Histology Approach Using Isotopic Labeling and Infrared Microspectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 56(1), 525-534. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03417>
- Ren, L., Men, L., Zhang, Z., Guan, F., Tian, J., Wang, B., Wang, J., Zhang, Y. & Zhang, W. (2019). Biodegradation of Polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the Guts of Wax Moth *Galleria mellonella*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11), 1941. <https://doi.org/10.3390/ijerph16111941>
- Ribeiro, N., Abelho, M. & Costa, R. (2018). A Review of the Scientific Literature for Optimal Conditions for Mass Rearing *Tenebrio molitor* (Coleoptera : Tenebrionidae). *Journal of Entomological Science*, 53(4), 434-454. <https://doi.org/10.18474/JES17-67.1>
- Riudavets, J., Salas, I. & Pons, M. (2007). Damage characteristics produced by insect pests in packaging film. *Journal of Stored Products Research*, 43(4), 564-570. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2007.03.006>
- Ronca, S. (2017). Polyethylene. *Brydson's Plastics Materials* (p. 247-278). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35824-8.00010-4>
- Rovai, D., Ortgies, M., Amin, S., Kuwahara, S., Schwartz, G., Lesniauskas, R., Garza, J. & Lammert, A. (2021). Utilization of Carrot Pomace to Grow Mealworm Larvae (*Tenebrio molitor*). *Sustainability*, 13(16), 9341. <https://doi.org/10.3390/su13169341>
- Roy, D. N. (1937). On the nutrition of larvae of bee-wax moth, *Galleria mellonella*. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 24(5), 638-643. <https://doi.org/10.1007/BF00592301>
- Rumbos, C. I., Karapanagiotidis, I. T., Mente, E., Psofakis, P. & Athanassiou, C. G. (2020). Evaluation of various commodities for the development of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*. *Scientific Reports*, 10(1), 11224. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67363-1>
- Saikia, S. S., Borah, B. K., Baruah, G., Rokozeno & Deka, M. K. (2022). Characterization of the gut microbes of greater wax moth (*Galleria mellonella* Linnaeus) shows presence of potential polymer degraders. *Folia Microbiologica*, 67(1), 133-141. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00925-6>
- Samways, D. (2022). Population and Sustainability : Reviewing the Relationship Between Population Growth and Environmental Change. *The Journal of Population and Sustainability*. <https://doi.org/10.3197/JPS.63772239426891>

- Scheirs, J., Priddy, D. B. & Scheirs, J. (Éd.). (2003). *Modern Styrenic Polymers : Polystyrenes and Styrenic Copolymers*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470867213>
- Schmidt, J., Wei, R., Oeser, T., Dedavid e Silva, L., Breite, D., Schulze, A. & Zimmermann, W. (2017). Degradation of Polyester Polyurethane by Bacterial Polyester Hydrolases. *Polymers*, *9*(12), 65. <https://doi.org/10.3390/polym9020065>
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics : A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, *26*(3), 246-265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shao, Y., Arias-Cordero, E. M. & Boland, W. (2013). Identification of Metabolically Active Bacteria in the Gut of the Generalist *Spodoptera littoralis* via DNA Stable Isotope Probing Using ¹³C-Glucose. *Journal of Visualized Experiments*, (81), 50734. <https://doi.org/10.3791/50734>
- Shimanuki, H. (1981). Controlling the Greater Wax Moth : A pest of Honeycombs. *Farmers' Bulletin - U.S. Dept. of Agriculture (USA)*, (2217), 14.
- Singh, P. (1975). Yellow mealworm, *Tenebrio molitor* Linnaeus, life-cycle. *DSIR Information Series*, (105/13).
- Singkum, P., Suwanmanee, S., Pumeesat, P. & Luplertlop, N. (2019). A powerful *in vivo* alternative model in scientific research : *Galleria mellonella*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, *66*(1), 31-55. <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.001>
- Smith, T. L. (1965). External Morphology of the Larva, Pupa, and Adult of the Wax Moth, *Galleria mellonella* L. *Journal of the Kansas Entomological Society*, *38*(3), 287-310.
- Sohail, M., Aqueel, M. A., Ellis, J. D., Raza, A. M. & Ullah, S. (2020). Consumption, digestion, and utilization of beeswax by greater wax moths (*Galleria mellonella* L.) *Journal of Apicultural Research*, *59*(5), 876-882. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1765482>
- Somarathna, H., Raman, S., Mohotti, D., Mutalib, A. & Badri, K. (2018). The use of polyurethane for structural and infrastructural engineering applications : A state-of-the-art review. *Construction and Building Materials*, *190*, 995-1014. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.09.166>
- Spangler, H. G. (1988). Sound and the Moths That Infest Beehives. *The Florida Entomologist*, *71*(4), 467-477.
- Szycher, M. (2013). *Szycher's Handbook of Polyurethanes* (Taylor & Francis Group, LLC).
- Talaro, K. P. & Chess, B. (2018). *Foundations in microbiology* (Tenth edition). McGraw-Hill Education.
- Tokiwa, Y., Calabia, B., Ugwu, C. & Aiba, S. (2009). Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*(9), 3722-3742. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>
- Urbanek, A. K., Rybak, J., Wróbel, M., Leluk, K. & Mirończuk, A. M. (2020). A comprehensive assessment of microbiome diversity in *Tenebrio molitor* fed with polystyrene waste. *Environmental Pollution*, *262*, 114281. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114281>
- Uwo, M., Ui-Tei, K., Park, P. & Takeda, M. (2002). Replacement of midgut epithelium in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during larval-pupal moult. *Cell and Tissue Research*, *308*(2), 319-331. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0515-1>
- Villanueva, R. A. M. & Chen, Z. J. (2019). ggplot2 : Elegant Graphics for Data Analysis (2nd ed.) *Measurement : Interdisciplinary Research and Perspectives*, *17*(3), 160-167. <https://doi.org/10.1080/15366367.2019.1565254>
- Wang, S., Shi, W., Huang, Z., Zhou, N., Xie, Y., Tang, Y., Hu, F., Liu, G. & Zheng, H. (2021). Complete digestion/biodegradation of polystyrene microplastics by greater wax moth (*Galleria mellonella*) larvae :

Direct *in vivo* evidence, gut microbiota independence, and potential metabolic pathways. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127213. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127213>

- Wang, Y., Luo, L., Li, X., Wang, J., Wang, H., Chen, C., Guo, H., Han, T., Zhou, A. & Zhao, X. (2022). Different plastics ingestion preferences and efficiencies of superworm (Fab.) and yellow mealworm (*Tenebrio molitor* Linn.) associated with distinct gut microbiome changes. *Science of The Total Environment*, 837, 155719. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155719>
- Warren, L. O. & Huddleston, P. (1962). Life History of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L., in Arkansas. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 35(1), 212-216.
- Wojda, I., Staniec, B., Sulek, M. & Kordaczuk, J. (2020). The greater wax moth *Galleria mellonella* : biology and use in immune studies. *Pathogens and Disease*, 78(9), ftaa057. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa057>
- Yang, S.-S., Brandon, A. M., Andrew Flanagan, J. C., Yang, J., Ning, D., Cai, S.-Y., Fan, H.-Q., Wang, Z.-Y., Ren, J., Benbow, E., Ren, N.-Q., Waymouth, R. M., Zhou, J., Criddle, C. S. & Wu, W.-M. (2017). Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus) : Factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle. *Chemosphere*, 191, 979-989. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.117>
- Yang, S.-S., Ding, M.-Q., Zhang, Z.-R., Ding, J., Bai, S.-W., Cao, G.-L., Zhao, L., Pang, J.-W., Xing, D.-F., Ren, N.-Q. & Wu, W.-M. (2021). Confirmation of biodegradation of low-density polyethylene in dark- versus yellow- mealworms (larvae of *Tenebrio obscurus* versus *Tenebrio molitor*) via. gut microbe-independent depolymerization. *Science of The Total Environment*, 789, 147915. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147915>
- Yang, S.-S., Wu, W.-M., Brandon, A. M., Fan, H.-Q., Receveur, J. P., Li, Y., Wang, Z.-Y., Fan, R., McClellan, R. L., Gao, S.-H., Ning, D., Phillips, D. H., Peng, B.-Y., Wang, H., Cai, S.-Y., Li, P., Cai, W.-W., Ding, L.-Y., Yang, J., . . . Criddle, C. S. (2018). Ubiquity of polystyrene digestion and biodegradation within yellow mealworms, larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera : Tenebrionidae). *Chemosphere*, 212, 262-271. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.078>
- Yang, Y., Yang, J., Wu, W.-M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R. & Jiang, L. (2015a). Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms : Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests. *Environmental Science & Technology*, 49(20), 12080-12086. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02661>
- Yang, Y., Yang, J., Wu, W.-M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R. & Jiang, L. (2015b). Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms : Part 2. Role of Gut Microorganisms. *Environmental Science & Technology*, 49(20), 12087-12093. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02663>
- Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Y., Li, L., Lin, H., Bi, Q. & Zhao, Y. (2019). Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of The Total Environment*, 704, 135931. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135931>
- Zhu, P., Pan, X., Li, X., Liu, X., Liu, Q., Zhou, J., Dai, X. & Qian, G. (2021). Biodegradation of plastics from waste electrical and electronic equipment by greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Cleaner Production*, 310, 127346. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127346>

Annexes

1. Photographies des élevages et des dispositifs expérimentaux



Élevage de *Galleria mellonella*



Dispositif d'élevage de *Tenebrio molitor*



Dispositif expérimental et pesées journalières



Logette où se sont déroulées les expériences et la gestion des élevages

2. Protocoles expérimentaux de la conduite de l'expérience

Tenebrio molitor

Matériel

- | | |
|---|-----------------------|
| 1. 60 larves | 5. PU foam (150g) |
| 2. 60 boîtes en plastique trouées et numérotées | 6. Latte |
| 3. Diète standardisée (farine intégrale et son) | 7. Pince molle |
| 4. PU foam mixée (150g) | 8. Balance analytique |

Protocole

1. 24h avant le début de l'expérience, affamer 60 larves qui mesurent entre 1,5 et 2 cm
2. Jour de l'expérience : préparer le matériel

3. Placer 2g de diète dans 50 boites
4. Placer la poudre PU à raison de 1g par boite dans 10 boites (30%) et à raison de 2g par boite dans 10 boites (50%); Bien homogénéiser les mélanges (diète-PU)
5. Placer le PU solide à raison de 1g par boite dans 10 boites (30%) et à raison de 2g par boite dans 10 boites (50%); Bien homogénéiser les mélanges (diète-PU)
6. Mettre uniquement 2g de poudre de PU dans 10 boites
7. Ajouter une larve préalablement pesée et mesurée dans chaque boite
8. Peser chaque boite avec le mélange
9. J + 24h (J2) : pesage individuel des larves et des boites
10. J + 48h (J2) : pesage individuel des larves et des boites
11. J + 72h (J2) : pesage individuel des larves et des boites
12. J + 96h (J2) : pesage individuel des larves et des boites
13. Répéter selon le calendrier
14. Fin de l'expérience après 32 jours

Galleria mellonella

Matériel

- | | |
|---|-----------------------|
| 1. 40 larves | 4. PE en poudre |
| 2. 40 boites en plastique trouées et numérotées | 5. Latte |
| 3. Diète standardisée | 6. Balance analytique |

Protocole

1. Jour de l'expérience : préparer le matériel
2. Placer 2g de diète dans 30 boites
3. Placer la poudre PE à raison de 1g par boite dans 10 boites (30%) et à raison de 2g par boite dans 10 boites (50%); Bien homogénéiser les mélanges (diète-PU)
4. Mettre uniquement 2g de poudre de PE dans 10 boites
5. Ajouter une larve préalablement pesée et mesurée dans chaque boite
6. Peser chaque boite avec le mélange
7. J + 15 jours : pesage individuel des larves et des boites
8. Fin de l'expérience après 30 jours

3. Protocole du kit AllPrep (Qiagen)

3b. Disruption and homogenization using the TissueLyser System : Place the tissues in 2 ml microcentrifuge tubes containing 1 stainless steel bead (5 mm mean diameter). If handling fresh or frozen tissue samples, keep the tubes on dry ice. Place the tubes at room temperature. Immediately add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 7) per tube. Place the tubes in the TissueLyser Adapter Set 2 x 24. Operate the TissueLyser II for 2 min at 20 Hz. The time depends on the tissue being processed and can be extended until the tissue is completely homogenized. Rearrange the collection tubes so that the outermost tubes are innermost and the innermost tubes are outermost. Operate the TissueLyser II for another 2 min at 20 Hz. Rearranging the tubes allows even homogenization. Proceed to step 4. Do not reuse the stainless steel beads.

4. Centrifuge the lysate for 3 min at full speed. Carefully remove the supernatant by pipetting, and transfer it to an AllPrep DNA spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 30 s at 8000 x g (10,000 rpm). In some preparations, very small amounts of insoluble material will be present after the 3-min centrifugation, making the pellet invisible. **Note** : Make sure that no liquid remains on the column membrane after centrifugation. If necessary, repeat the centrifugation until all liquid has passed through the membrane.

5. Place the AllPrep DNA spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and store at room temperature (15–25°C) or at 4°C for later DNA purification in steps 21–24. Use the flow-through for RNA purification in steps 6–13. **Note** : Do not store the AllPrep DNA spin column at room temperature or at 4°C for long periods. Do not freeze the column.

Total RNA purification

6. To the flow-through from step 5, add 96–100% ethanol : either 250 l (if 350 l Buffer RLT was used) or 400 l (if 600 l Buffer RLT was used). Mix well by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 7. If some lysate was lost during homogenization and DNA binding to the AllPrep DNA spin column, adjust the volume of ethanol accordingly. **Note** : When purifying RNA from certain cell lines, precipitates may be visible after addition of ethanol. This does not affect the procedure.

7. Transfer up to 700 l of the sample, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at 8000 x g (10,000 rpm). Transfer the flow-through* to a 2 ml tube (supplied) for protein purification in steps 14–20. Reuse the collection tube in step 8. If the sample volume exceeds 700 l, centrifuge successive aliquots in the same RNeasy spin column. Transfer the flow-through after each centrifugation to the 2 ml tube.

8. Add 700 l Buffer RW1 to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at 8000 x g (10,000 rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through. Reuse the collection tube in step 9. **Note** : After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.

Optional : If purifying RNA from tissues with high DNA content and if the RNA will be used in sensitive downstream applications, we recommend performing DNase digestion by following steps E1–E4 (Appendix E, page 58) instead of step 8.

9. Add 500 l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at 8000 x g (10,000 rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through. Reuse the collection tube in step 10. **Note** : Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see “Things to do before starting”).

10. Add 500 l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at 8000 x g (10,000 rpm) to wash the spin column membrane. The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions. **Note** : After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

11. *Optional* : Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Centrifuge at full speed for 1 min. Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE or if residual flow-through remains on the outside of the RNeasy spin column after step 10.

12. Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 l RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at 8000 x g (10,000 rpm) to elute the RNA.

13. If the expected RNA yield is >30 g, repeat step 12 using another 30–50 l of RNase-free water or using the eluate from step 12 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 12. If using the eluate from step 12, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

Total protein purification

14. Add 1 volume (usually 600 or 1000 l) of Buffer APP to the flow-through from step 7. Mix vigorously and incubate at room temperature for 10 min to precipitate protein.

15. Centrifuge at full speed for 10 min, and carefully decant the supernatant.

16. Add 500 l of 70% ethanol to the protein pellet. Centrifuge at full speed for 1 min, and remove the supernatant by using a pipet or by decanting as much liquid as possible. It is not necessary to resuspend or incubate the pellet. **17.** Dry the protein pellet for 5–10 min at room temperature. **Note** : Incomplete drying may cause problems when loading the protein onto a gel due to residual ethanol.

Genomic RNA purification

21. Add 500 l Buffer AW1 to the AllPrep DNA spin column from step 5. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at 8000 x g (10,000 rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through. Reuse the spin column in step 22. **Note** : Buffer AW1 is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer AW1 before use (see “Things to do before starting”)

22. Add 500 l Buffer AW2 to the AllPrep DNA spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at full speed to wash the spin column membrane. **Note** : Buffer AW2 is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer AW2 before use (see “Things to do before starting”). The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during DNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions. **Note** : After centrifugation, carefully remove the AllPrep DNA spin column from the collection tube. If the column contacts the flow-through, empty the collection tube and centrifuge the spin column again for 1 min at full speed.

23. Place the AllPrep DNA spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 100 l Buffer EB (preheated to 70°C) directly to the spin column membrane and close the lid. Incubate at room temperature (15–25°C) for 2 min, and then centrifuge for 1 min at 8000 x g (10,000 rpm) to elute the DNA.

24. Repeat step 23 to elute further DNA. To prevent dilution of the first DNA eluate, use a new 1.5 ml collection tube (not supplied) to collect the second DNA eluate. To combine the first and second DNA eluates, reuse the collection tube from step 23. **Note** : To achieve a higher DNA concentration, elute with 2 x 50 l Buffer EB. The final DNA yield, however, may be reduced.

4. Détails des analyses statistiques réalisées

Tests préliminaires

Test de Shapiro-Wilk

	W	P
Jour 0	0,991	0,660
Jour 32	0,978	0,037

Test de Levene

	Df	F	P
Jour 0	5	0,62	0,065
Jour 31	5	2,13	0,681

Test de Kruskal-Wallis

	n	statistic	Df	P
Jour 0	128	67,5	5	<0,001
Jour 31	128	9,36	5	0,095

Test de comparaison multiples de Tukey

Test de Tukey appliqué au jour 0

Groupe 1	Groupe 2	Estimation	Limite inférieure de l'intervalle de confiance	Limite supérieure de l'intervalle de confiance	P-valeur ajustée
1	2	-0,0113571	-0,0233652	0,00065091	0,075
1	3	-0,0073351	-0,0196935	0,00502336	0,522
1	4	-0,0107667	-0,0223449	0,00081153	0,084
1	5	-0,0062196	-0,0189976	0,00655841	0,721
1	6	-0,0032167	-0,0153924	0,00895908	0,973
2	3	0,00402206	-0,0090453	0,01708939	0,948
2	4	0,00059048	-0,0117416	0,0129225	1,000
2	5	0,00513754	-0,0083273	0,01860238	0,879
2	6	0,00814048	-0,0047542	0,02103516	0,452
3	4	-0,0034316	-0,016105	0,00924188	0,970
3	5	0,00111548	-0,0126628	0,01489371	1,000
3	6	0,00411842	-0,0091032	0,01734002	0,945
4	5	0,00454706	-0,0085359	0,01763	0,915
4	6	0,00755	-0,0049454	0,02004537	0,502
5	6	0,00300294	-0,0106117	0,01661754	0,988

Test de Tukey appliqué au jour 31

Groupe 1	Groupe 2	Estimation	Limite inférieure de l'intervalle de confiance	Limite supérieure de l'intervalle de confiance	P-valeur ajustée
1	2	0,066	0,04980389	0,08219611	<0,001
1	3	0,07014912	0,05348042	0,08681782	<0,001
1	4	0,06276667	0,04715033	0,078383	<0,001
1	5	0,07985686	0,06262225	0,09709147	<0,001
1	6	0,07617333	0,05975105	0,09259562	<0,001
2	3	0,00414912	-0,0134757	0,02177396	0,984
2	4	-0,0032333	-0,0198664	0,01339974	0,993
2	5	0,01385686	-0,0043041	0,03201784	0,241
2	6	0,01017333	-0,0072186	0,0275653	0,539
3	4	-0,0073825	-0,024476	0,00971113	0,811
3	5	0,00970774	-0,0088759	0,02829141	0,657
3	6	0,00602421	-0,0118087	0,02385711	0,924
4	5	0,0170902	-0,0005557	0,03473608	0,063
4	6	0,01340667	-0,0034467	0,03026005	0,201
5	6	-0,0036835	-0,0220465	0,01467944	0,992

5. Morphologie des colonies de bactéries

1. Texture

Dry

Moist

Vicid

Brittle/friable
(dry, breaks apart)

Mucoid
(sticky, mucus-like)

2. Form



Punctiform



Circular



Filamentous



Irregular



Rhizoid



Spindle (lens)

3. Elevation



Flat

Raised

Convex

Pulvinate

Umbonate

4. Margin



Entire
(even)



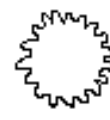
Undulate
(wavy)



Filamentous



Lobate
(lobe)



Erose
(serrated)



Curled

(Talaro et Chess, 2018)