

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri -Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Microbiologie



N° d'ordre :26/D3C/2017

N° de série :02/Micro/2017

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle
En Biotechnologies, Biologie et Environnement/Option: Bioprocédés et Biotechnologies,
Applications Mycologiques

Par: BENHASSINE Sara

Thème

**Etude de la Laccase produite par des Mycètes isolés
à partir de Différents Ecosystèmes Algériens**

Jury d'évaluation :

Président de jury: Mr. HAMIDECHI M A.

Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine.

Directeur de thèse: Mr. KACEM CHAOUICHE N.

Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine.

Examineurs: Mr. DEHIMAT L.

Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine.

Mr. RIBA A.

Prof. Univ. M'Hamed Bougara-Boumerdès.

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

*En premier lieu, je remercie **Dieu** tout puissant de m'avoir donnée la force et le courage durant toute cette période afin que je puisse arriver à ce stade...*

*Mes remerciements particuliers à mon Directeur de thèse, Professeur **Kacem Chaouche Noreddine**, à qui j'exprime ma gratitude et ma reconnaissance. Monsieur Kacem Chaouche m'a toujours soutenu et poussé pour réussir. Les conseils qu'il m'a prodigués durant toutes ces années, ainsi que l'autonomie qu'il m'a laissée, m'ont permis d'accomplir cette thèse dans les meilleures conditions. Merci Monsieur d'avoir tout fait pour que cette thèse soit une réussite.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur, **Hamidechi M.A**, Professeur à l'université des Frères Mentouri (Constantine), pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.*

*Je tiens à remercier vivement les membres du jury, Monsieur **Dehimat L**, Doyen de la faculté SNV et Professeur à l'université des Frères Mentouri (Constantine) ainsi que Monsieur **Riba A**, Professeur à l'université de M'Hamed Bougara (Boumerdès) qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail et de l'évaluer.*

Je tiens à remercier particulièrement Docteur Kara Ali Mounira pour son aide, qui a participé à l'aboutissement de ce travail et qui m'a toujours soutenu. Merci chère amie pour tout ce que tu as fait....

Je remercie également Monsieur Khelifi D et Docteur Bellil I (Laboratoire de Biochimie Génétique et Biotechnologies Végétales « GBBV), pour l'aide précieuse qui m'ont accordée.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité microbienne (LaMyBAM) : Asma, Hadjer, Insaf, Mounia, Radia et Imène et surtout à Hamida pour son aide, Merci les filles pour tout ce que vous avez fait pour moi...

Merci également à toute l'équipe du Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) (Belgique), qui m'a assuré toutes les conditions agréables pour la réalisation d'une bonne partie de ma thèse.

J'exprime mes plus profonds remerciements et ma reconnaissance à mes parents qui m'ont toujours soutenu pendant les moments difficiles. Je remercie mon adorable maman qui m'a

toujours poussé pour travailler dur et qui fait tout pour mon aise. Un grand merci à mon cher Papa, pour les heures passées dans sa voiture à m'attendre devant le laboratoire, pour le confort qu'il m'a offert afin de travailler dans les meilleures conditions. Maman, Papa merci pour votre patience, votre affection et votre gentillesse sans limite. C'est grâce à vous que j'ai pu avancer dans ma vie...

Je remercie également ma petite sœur Anfel, qui m'a beaucoup aidé pour l'accomplissement de ce travail. Merci pour ton aide, tes encouragements et ta gentillesse chère soeurette.

Je remercie profondément mon mari Lamine, pour sa patience, pour ses encouragements sans cesse. Merci d'avoir cru en moi, merci pour ton soutien qui m'a aidé à supporter les moments difficiles...

Enfin, un grand merci à ma belle-famille, pour le soutien et les encouragements.

Dédicace

A ma fille, mon rayon de soleil...

A mes chers parents...

A mon mari bien aimé...

Et à ma sœurette bien adorée

Table des matières

1- Introduction.....	1
2- Synthèse Bibliographique.....	3
2.1- Mycètes : Source d'enzymes oxydatives.....	3
2.1.1- Généralités sur les Mycètes.....	3
2.1.2- Mycètes dégradant la matière lignocellulosique.....	4
2.1.2.1-Généralités sur la lignine.....	4
2.1.2.2- Mycètes: Production d'enzymes lignocellulolytiques.....	6
2.1.3- Généralité sur le genre <i>Trametes</i>	6
2.1.4- Généralité sur le genre <i>Chaetomium</i>	7
2.2- Laccases.....	9
2.2.1- Source de laccase.....	9
2.2.2- Rôle physiologique de laccase.....	10
2.2.3- Structure et propriétés moléculaires de laccase.....	10
2.2.4- Mode d'action de laccase.....	13
2.2.5- Système Laccase-Médiateur.....	14
2.2.6- Production de laccase.....	16
2.2.6.1- Spécificité du substrat.....	16
2.2.6.2- Influence de la température.....	16
2.2.6.3- Influence du pH.....	17
2.2.7- Induction de laccase.....	17
2.2.8- Production en scale-up.....	17
2.2.9- Production de laccase sur milieu à base de déchets agroalimentaires.....	18
2.2.10- Applications des laccases.....	19
2.2.10.1-Industrie alimentaire.....	19
2.2.10.2-Industrie pharmaceutique.....	20
2.2.10.3-Nanobiotechnologies et Biocapteurs.....	20

2.2.10.4- Industrie du papetier.....	21
2.2.10.5-Bioremediation et traitement des eaux usées.....	21
2.2.10.6-Dégradation des colorants synthétiques.....	22
2.2.10.7-Autres applications.....	22
2.3- Dégradation des colorants du textile.....	22
2.3.1- Historique des colorants.....	22
2.3.2- Colorants du textile.....	23
2.3.2.1- Colorants azoïques.....	23
2.3.2.2- Colorants triphénylméthanes.....	24
2.3.3- Toxicité des colorants et leurs effets sur l'environnement.....	24
2.3.4- Méthodes de traitement des colorants.....	25
3- Matériel et méthodes.....	27
3.1- Echantillonnage.....	27
3.2- Isolement des mycètes.....	28
3.3- Purification et conservation des isolats.....	28
3.4- Sélection des isolats producteurs de laccase.....	29
3.5- Identification des isolats sélectionnés.....	29
3.5.1- Etude morphologique des isolats.....	29
3.5.2- Etude moléculaire des isolats sélectionnés.....	30
3.5.2.1- Extraction d'ADN.....	30
3.5.2.2- Amplification de la région ITS par PCR.....	31
3.5.2.3- Electrophorèse des acides nucléiques.....	32
3.5.2.4- Analyse bio-informatique des séquences nucléotidiques.....	32
3.6- Production de laccase sur milieu submergé.....	33
3.6.1- Production de laccase sur différents milieux.....	33
3.6.2- Production de laccase en Erlenmeyer (500 ml).....	33
3.7- Production de laccase en fermenteur de 20L.....	34

3.8-	Semi- purification de laccase.....	35
3.9-	Caractérisation partielle de la laccase	35
3.9.1-	Electrophorèse Native Page	35
3.9.2-	Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique.....	35
3.9.2.1-	<i>Effet du pH sur la laccase</i>	<i>35</i>
3.9.2.2-	<i>Effet de la température sur la laccase</i>	<i>36</i>
3.10-	Applications biotechnologiques.....	36
3.10.1-	Production de laccase sur milieux composés de déchets	36
3.10.2-	Production de laccase sur milieux composés de déchets de citrouille.....	36
3.10.2.1-	<i>Test de développement des souches fongiques sur milieux solides à base de déchets de citrouille</i>	<i>36</i>
3.10.2.2-	<i>Test de production de laccase sur milieux solides à base de déchets de citrouille</i>	<i>37</i>
3.10.2.3-	<i>Production de laccase sur milieu submergé à base de déchets de citrouille..</i>	<i>37</i>
3.10.3-	Dégradation des colorants synthétiques par la laccase.....	37
3.10.3.1-	<i>Etude de la dégradation des colorants.....</i>	<i>38</i>
3.10.3.2-	<i>Analyse de la dégradation des colorants.....</i>	<i>38</i>
3.10.3.3-	<i>Dégradation directe des colorants par la laccase</i>	<i>39</i>
4-	Résultats	40
4.1-	Isolement des mycètes	40
4.2-	Sélection des isolats producteurs de laccase	40
4.3-	Identification des isolats sélectionnés.....	41
4.3.1-	Identification morphologique des isolats.....	41
4.3.2-	Identification moléculaire des isolats sélectionnés.....	43
4.4-	Production de laccase sur milieu submergé.....	43
4.4.1-	Production de laccase sur différents milieux.....	43
4.4.2-	Cinétique de production de laccase en Erlenmeyer (500 ml).....	44
4.5-	Production de la laccase en fermenteur de 20L.....	45

4.6-	Semi-purification de laccase.....	46
4.7-	Caractérisation partielle de la laccase	47
4.7.1-	Electrophorèse Native page.....	47
4.7.2-	Effet du pH et de la température sur l'activité laccasique	48
4.7.2.1-	<i>Effet du pH sur la laccase</i>	<i>48</i>
4.7.2.2-	<i>Effet de la température sur la laccase</i>	<i>49</i>
4.8-	Applications Biotechnologiques	50
4.8.1-	Production de laccase sur milieux composés de déchets	50
4.8.2-	Production de laccase sur milieux composés de déchets de citrouille.....	51
4.8.2.1-	<i>Test de développement des souches fongiques sur milieux solides à base de déchets de citrouille</i>	<i>52</i>
4.8.2.2-	<i>Test de production de laccase sur milieux solides à base de déchets de citrouille... ..</i>	<i>53</i>
4.8.2.3-	<i>Production de laccase sur milieu submergé à base de déchets de citrouille .</i>	<i>55</i>
4.8.3-	Dégradation des colorants synthétiques par la laccase	56
4.8.3.1-	<i>Etude de la dégradation des colorants</i>	<i>56</i>
4.8.3.2-	<i>Analyses de la dégradation des colorants.....</i>	<i>60</i>
4.8.3.3-	<i>Dégradation directe des colorants par la laccase.....</i>	<i>64</i>
5-	Discussion	65
6-	Conclusion et Perspectives	77
	Références	79

Liste des figures

Figure 1 Structure de la lignine	5
Figure 2 Développement de <i>Trametes versicolor</i> dans la nature.....	8
Figure 3 Aspect microscopique de <i>Chaetomium sp</i>	8
Figure 4 Structure tridimensionnelle et centre actif de la laccase.....	12
Figure 5 Environnement des atomes de cuivre du site actif de la laccase.....	12
Figure 6 Différentes réactions catalysées par la laccase.....	13
Figure 7 Mécanisme d'oxydation du LMS sur la lignine.....	15
Figure 8 Principaux médiateurs utilisés.....	15
Figure 9 Présentation schématique de la catalyse de la laccase en présence de médiateur.....	15
Figure 10 Différentes applications de laccase en Biotechnologie.....	19
Figure 11 Utilisation de laccase pour dégrader et synthétiser des différents colorants.....	26
Figure 12 Localisation géographique des différentes régions d'échantillonnage.....	27
Figure 13 Evaluation de la production de laccase par les souches <i>Trametes versicolor</i> (L), <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (D) et <i>Chaetomium globosum</i> (P4) sur Olga, PDB et ME...44	44
Figure 14 Cinétique de croissance de <i>Trametes versicolor</i> et <i>Chaetomium globosum</i> et de production laccase au cours de la fermentation en Erlenmeyer sur milieu PDB.....45	45
Figure 15 Evolution de la laccase produite par <i>Trametes versicolor</i> et <i>Chaetomium globosum</i> au cours de la fermentation en fermenteur (20L).....46	46
Figure 16 Zymogramme de la laccase de <i>Trametes versicolor</i> et de <i>Chaetomium globosum</i> sur gel d'électrophorèse Native page.....48	48
Figure 17 Effet du pH sur l'activité laccasique produite par <i>Chaetomium globosum</i>49	49
Figure 18 Effet du pH sur l'activité laccasique produite par <i>Trametes versicolor</i>49	49
Figure 19 Effet de la température sur l'activité laccasique produite par <i>Chaetomium globosum</i>50	50
Figure 20 Effet de la température sur l'activité laccasique produite par <i>Trametes versicolor</i> .50	50
Figure 21 Production de laccase par <i>Chaetomium globosum</i> et <i>Trametes versicolor</i> sur différents milieux à base de déchets.....51	51
Figure 22 Evolution de l'activité laccasique de <i>Trametes versicolor</i> et de <i>Chaetomium globosum</i> sur milieux submergés à base de déchets de citrouille.....55	55

Figure 23 Virage de la couleur du milieu ME avant et après fermentation additionné de a : Vert de malachite (culture de <i>Trametes versicolor</i>) ; b : Rouge Congo (culture de <i>Chaetomium globosum</i>).....	58
Figure 24 Effet de différentes concentrations de colorants (Vert de Malachite et Rouge Congo) sur la production de laccase sécrétée par <i>Trametes versicolor</i>	59
Figure 25 Effet de différentes concentrations de colorants (Vert de Malachite et Rouge Congo) sur la production de laccase sécrétée par <i>Chaetomium globosum</i>	59
Figure 26 Spectre du Rouge Congo au spectrophotomètre.....	61
Figure 27 Spectre du Vert de Malachite au spectrophotomètre.....	61
Figure 28 Chromatogramme du Vert de malachite ($\lambda=623\text{nm}$), (VM+ <i>Chaetomium globosum</i> et VM + <i>Trametes versicolor</i>).....	62
Figure 29 Chromatogramme du Rouge Congo ($\lambda=498\text{ nm}$).....	63
Figure 30 Chromatogramme du Rouge Congo + <i>Trametes versicolor</i> ($\lambda=498$).....	63
Figure 31 Chromatogramme du Rouge Congo + <i>Chaetomium globosum</i> ($\lambda =498\text{nm}$).....	63
Figure 32 Evaluation de la décoloration des colorants Vert de Malachite et Rouge Congo par la laccase en fonction du temps.....	64

Liste des tableaux

Tableau 1 Quelques produits dérivants des mycètes.....	4
Tableau 2 Classification des colorants	23
Tableau 3 Isolement et purification des isolats fongiques isolés à partir des forêts.....	40
Tableau 4 Isolats montrant une activité laccasique et leurs aspects macroscopiques.....	41
Tableau 5 Aspects macroscopiques des isolats fongiques sélectionnés.....	42
Tableau 6 Rendement de la laccase obtenue après précipitation en sulfate d'ammonium et concentration par ultrafiltration.....	47
Tableau 7 Développement de <i>Trametes versicolor</i> et <i>Chaetomium globosum</i> sur les différents milieux de culture à base de déchets de la citrouille préparés à 2%.....	52
Tableau 8 Révélation de la présence de laccase sécrétée par <i>Chaetomium globosum</i> et <i>Trametes versicolor</i> sur différents milieux à base de déchets de citrouille.....	54
Tableau 9 Test de décoloration des colorants synthétiques.....	57

Liste des abréviations

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6- acide sulphonique)

CPB : Champignons de la pourriture blanche

CWBI : Centre Wallon de biologie industrielle

Lac: Isoenzymes de laccase

LiP: Peroxydases de lignine

MnP: Manganèse-peroxydases

MEA: Malt extract Agar

PDA : Potetose Dextrose Agar

Ppm : partie par million

SLM : Système Laccase Médiateurs

Rpm : Rotation par minute

U: Unité enzymatique ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

Introduction

1- Introduction

La biomasse lignocellulosique constitue le matériel végétal renouvelable récalcitrant le plus abondant dans la nature (Hartikainen *et al.*, 2016). Les mycètes représentent le groupe le plus important des organismes vivant qui décomposent complètement la cellulose et les hémicelluloses et surtout la lignine. En effet, la valorisation de cette action est une des pistes importantes qu'entendent explorer les chercheurs et les industriels. Le pouvoir calorifique de la lignine est plus élevé que celui de la cellulose et les hémicelluloses. Cependant, la lignine est extrêmement résistante à la dégradation, en créant une barrière empêchant l'attaque de la plupart des microorganismes, néanmoins, certains mycètes sont capables de la dégrader efficacement, en sécrétant un groupe d'enzymes appelé Ligninases (Wertz, 2010). Ce sont des enzymes oxydoréductrices extracellulaires, qui peuvent dégrader des biopolymères naturels tels que la lignine et des composés synthétiques xénobiotiques récalcitrants (Hartikainen *et al.*, 2016).

Parmi ces enzymes, la laccase, qui se distingue par sa capacité d'oxydation élevée. Cependant, son application dans de nombreux domaines a été ignorée en raison de son indisponibilité dans le domaine commercial (Upadhyay *et al.*, 2016). La laccase est une enzyme importante d'un point de vue biotechnologique, en raison de sa propriété de détoxification d'une gamme de polluants, ce qui a encouragé son utilisation dans diverses applications industrielles (Kuhar *et al.*, 2015). Récemment, des études ont révélé que cette enzyme peut avoir des applications en nanobiotechnologie, et elle peut même être utilisée pour la conception de biocapteurs (Upadhyay *et al.*, 2016). En effet, des chercheurs d'Oxford ont démontré que la laccase produite par les mycètes offre des performances égales à celles de platine lorsque, elle est utilisée pour accélérer les réactions chimiques des électrodes de piles à combustible (Wertz, 2010).

Par conséquent, la recherche de laccases fongiques ayant des propriétés de nouvelles applications est, encore, en cours, et pourquoi pas, une production à bon marché en valorisant les déchets agroalimentaires, plus précisément ceux de l'industrie. Surtout que l'Algérie, actuellement, fait des efforts considérables pour gérer les déchets. En effet, la politique de gestion des déchets s'est inscrite dans la *Stratégie nationale environnementale* (SNE), ainsi que dans le *Plan national d'actions environnementales et du développement durable* (PNAE-DD) qui s'est concrétisée par la promulgation de la loi 01-19 du 12 décembre 2001 relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets, traitant des aspects inhérents à la prise en charge des déchets (Anonyme3). D'ailleurs, l'agence Nationale des

déchets (AND) a placé une initiative très prometteuse, celle de la bourse des déchets industriels qui a été pensée pour accélérer la mise en réseau des acteurs industriels impliqués dans la valorisation des déchets industriels.

La présente thèse décrit de nouvelles sources de laccase fongique ainsi que de nouvelles applications potentielles de cette enzyme. De ce fait, son objectif est l'étude et la production à grande échelle de laccase d'origine fongique; d'un autre point, le faire à moindre coût et ce, en valorisant des déchets agroalimentaires et enfin l'application de cette enzyme dans le domaine de la dégradation des colorants du textile.

Pour ce faire, la thèse comporte une synthèse bibliographique approfondie contenant des informations sur la description des mycètes, de leurs applications ainsi que de leur capacité à produire des enzymes lignocellulosiques ; pour ensuite, évoquer la laccase en essayant de discerner sa distribution, sa structure, son mécanisme d'action et ses différentes applications, pour enfin, se focaliser sur la dégradation des colorants du textile et les dangers potentiels qui peuvent causer. Quant à la partie expérimentale, elle repose sur trois grandes parties: l'isolement et la sélection de souches fongiques sécrétant de la laccase; la production de laccase à grande échelle, enfin la recherche de l'application biotechnologique de la laccase en valorisant les déchets agroalimentaires et en étudiant sa capacité à décomposer des colorants synthétiques. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une discussion approfondie afin de comparer nos résultats à ceux, déjà, développés par des travaux antérieurs. La thèse se termine par une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

Synthèse Bibliographique

2- Synthèse Bibliographique

2.1- Mycètes : Source d'enzymes oxydatives

2.1.1- Généralités sur les Mycètes

Les champignons, encore appelés Mycètes ou Fungi, constituent un règne comprenant des organismes tous des Eucaryotes, tels que les levures et les moisissures. Les mycètes sont dépourvus de Chlorophylles, ce qui les condamne à une hétérotrophie totale (Bouchet *et al.*, 2005). Leur structure primordiale est un thalle dépourvu de pigment assimilateur, dénommé «Mycélium» (Rispaïl, 2008). Leur principale caractéristique est la présence de la paroi cellulaire contenant essentiellement des glucanes et de la chitine. Cette dernière est souvent associée aux chitosanes (=polymères de N-glucosamine) (Bouchet *et al.*, 2005).

Les mycètes tiennent leur énergie de la dégradation des composés organiques, en décomposant des polymères par le biais d'un arsenal d'enzymes extracellulaires qui effectuent la prédigestion menant à des monomères considérés comme source d'énergie et de carbone (Barr, 1992). Ces enzymes peuvent être liées à la paroi cellulaire ou bien être diffusées à l'extérieur dans l'environnement (Walker et White, 2011). C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées. Selon l'IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology), les enzymes se répartissent en six classes : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases (Cosnier, 2000).

Les applications industrielles des mycètes sont très nombreux touchant pratiquement tous les secteurs de l'industrie, notamment l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire (Bouchet *et al.*, 2005). L'importance économique de la biotechnologie fongique ne peut être sous-estimée. En effet, les mycètes ont été exploités pour produire une grande gamme de produits dont certains se sont avérés très utiles et indispensables à l'humanité. Depuis l'époque des pharaons, les champignons ont été utilisés dans l'alimentation, toutefois, leur biotechnologie a connu un grand développement durant le siècle dernier et ce, par la production des antibiotiques, des vitamines, des régulateurs de croissance pour les plantes, des enzymes, des hormones, des protéines, etc. (Tableau 1) (Horgan et Murphy, 2011).

Tableau 1 Quelques produits dérivants des mycètes (Horgan et Murphy, 2011)

Class of product	Typical example	Industrial/commercial application	Common production organism
Enzymes	Amylase	Starch processing Fermentation application	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oryzae</i> .
	Cellulase	Animal feed industry Brewing	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
	Protease	Meat/leather industry Cheese manufacture	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Rhizopus oligosporus</i>
Organic acid	Citric acid	Soft drinks industry	<i>Aspergillus niger</i>
	Itaconic acid	Chemical industry	<i>Candida/Rhodoturula</i>
	Malic acid	Beverage/food industry	<i>Candida</i>
	Fumaric acid	Food industry	<i>Candida</i>
Vitamins	Riboflavin	Health industry	<i>Candida</i>
	Pyridoxine	Health industry	<i>Pichia</i>
	D-Erythro-ascorbic acid	Health industry	<i>Candida</i>
Antibiotics	Penicillin	Human/animal health	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	Cephalosporin	Human/animal health	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Fatty acids	Stearic	Food industry	<i>Cryptococcus</i>
	Dicarboxylic	Chemical industry	<i>Candida</i>
Alcohol	Industrial alcohol	Fuel industry	<i>Saccharomyces</i>
	Beverage alcohol	Beverage industry	<i>Saccharomyces</i>
Pharmaceuticals	Lovastatin	Human health	<i>Monascus ruber</i>
	Cyclosporin	Human health	<i>Tolyposcladium inflatum</i>
Amino acids	Lysine	Health industry	<i>Saccharomyces</i>
	Tryptophan	Health industry	<i>Hansenula</i>
	Phenylalanine	Health industry	<i>Rhodoturula</i>
Recombinant proteins	Insulin	Treatment of diabetes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Phytase	Phosphate liberation	<i>Aspergillus niger</i>
	Hepatitis B surface antigen	Vaccine preparation	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

2.1.2- Mycètes dégradant la matière lignocellulosique

2.1.2.1-Généralités sur la lignine

Dans le bois, la cellulose et les hémicelluloses sont noyées dans un hétéro-polymère en trois dimensions, dénommé la lignine, formant un matériel lignocellulolytique complexe qui joue le

rôle d'une barrière en empêchant la pénétration des enzymes lignocellulosiques au sein de la structure.

La lignine (figure 1) est le terme générique d'un vaste groupe de polymères aromatiques. Elle constitue 25% de la biomasse terrestre. C'est le polymère le plus abondant dans la nature après la cellulose en contribuant à la rigidité des parois cellulaires (Gaudry, 2010). La lignine est issue de la polymérisation des alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylique, qui sont des monolignols, ou 4-hydroxyphénylpropanoïdes, dérivés de la phénylalanine. La polymérisation s'effectue par une radicalisation oxydative des monolignols suivie d'un couplage radicalaire combinatoire. La complexité des lignines provient de l'association des trois monolignols par différentes liaisons chimiques d'une façon anarchique afin de former un polymère amorphe et hydrophobe (Wertz, 2010).

Seuls certains Basidiomycètes et Ascomycètes sont capables de dégrader la lignine, connus comme pourriture blanche en raison de la coloration résultante du bois délignifié (Walker et White, 2011). Ces mycètes emploient un cocktail d'enzymes, entre autres la laccase, pour couper les liaisons entre les différentes unités formant la lignine (Madhavi, 2009).

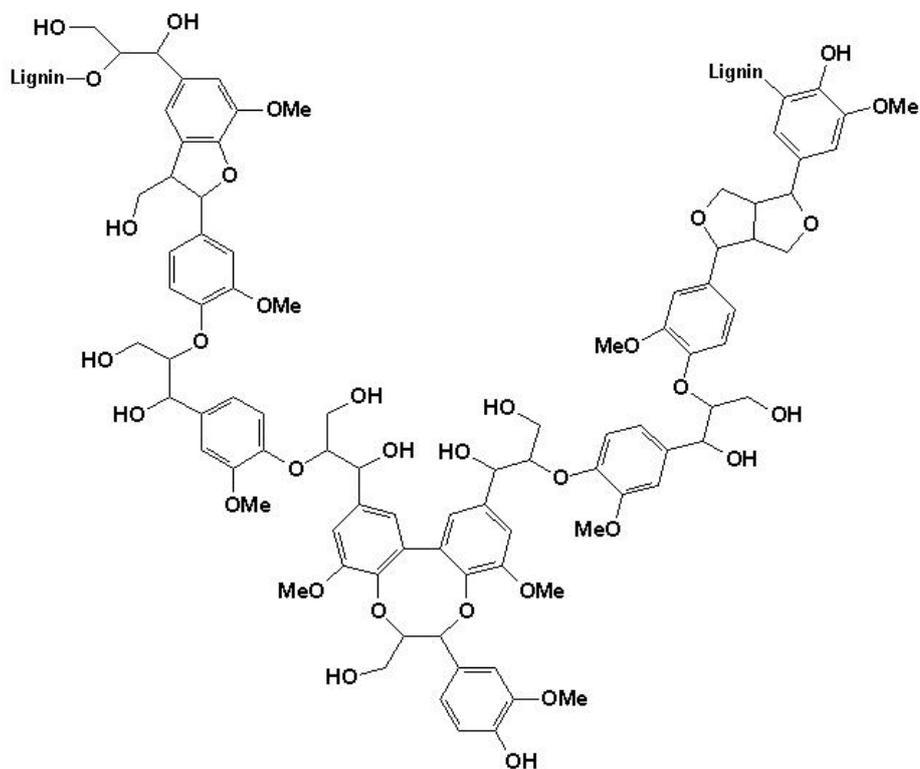


Figure 1 Structure de la lignine (Wertz, 2010)

2.1.2.2- *Mycètes: Production d'enzymes lignocellulolytiques*

Une variété de microorganismes est impliquée dans la décomposition du bois, cependant les mycètes sont les plus pertinents et ce, par leur capacité à sécréter des cellulases, des hémicellulases et des ligninases (Wertz, 2010). Trois types de champignons filamenteux sont responsables de la dégradation du bois, ayant une préférence pour un ou plusieurs polymères composant le bois. Pour les classer, la couleur et la texture du bois résultant sont utilisées comme indice, entraînant la désignation « Blanche » ou « brune » et pourriture pour le champignon. En effet, les champignons de la pourriture blanche incluant des Basidiomycètes et des Ascomycètes, dégradent efficacement la lignine en employant un groupe d'enzymes appelé Ligninases qui sont des oxydoréductases. Les Ligninases peuvent être classées en phénol oxydases (laccases), peroxydases de lignine (LiP), manganèse-peroxydases (MnP) et peroxydases versatiles (Maldhavi, 2009; Wertz, 2010). *Phanerochaete chrysosporium* représente la souche la plus étudiée pour son système de délignification, ce mycète de la pourriture blanche sécrète LiP, MnP et la laccase (Sirinivasan *et al.*, 1995), en d'autre part, des espèces appartenant au genre *Trametes* ont été aussi étudiées pour leur capacité à produire des ligninases (*T. versicolor* ; *T. hirsuta* ; *T. ochracea*, etc.) (Tomsovsky et Homolka, 2003). Quant aux champignons de la pourriture brune, ils ont une préférence pour l'hémicellulose et la cellulose, mais dégradent, également, la lignine par déméthylation. Tandis que, les champignons de la pourriture molle qui renferment les Ascomycètes et Champignons, dits encore, Imparfaites, décomposent parfaitement, la cellulose alors que la lignine, n'est que partiellement, dégradée par leur action (Heather, 2000 ; Martinez, 2005).

2.1.3- Généralité sur le genre *Trametes*

Le genre *Trametes* compte parmi les Basidiomycètes les plus courants et les plus répandus dans les forêts tempérées et boréales (Justo, 2014). Ce Genre appartient à l'embranchement de Basidiomycota, classe des Basidiomycetes, sous-classe Agaricomycetidae, de l'ordre des Polyporales et de la famille des Polyporaceae (Faccelo et Cruz, 2009). *Trametes* représente le genre le plus largement étudié pour la production et l'application des laccases (Nyanhongo *et al.*, 2007). *Trametes versicolor* (figure 2), Connu pour être l'un des producteurs principaux de la laccase, cette espèce est un champignon de la pourriture blanche (Gonzalez *et al.*, 2003), polypores blancs de putréfaction, y compris « la queue », il est caractérisé par des basidiocarpes sessiles pileate et d'un système de hyphes trimitique (Carlson *et al.*, 2014).

2.1.4- Généralité sur le genre *Chaetomium*

Chaetomium est un genre de champignon appartenant à l'embranchement des Ascomycota, classe des Ascomycètes, l'ordre des Sordariales et la famille de Chaetomiacees (Zareb, 2014). Il a été montré que certaines souches appartenant à ce genre présentent une activité antagoniste contre certains pathogènes (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006). Toutefois, les concentrations de leur spores dans l'air extérieur ne sont pas très élevées, voire rares (Khan et Wilson, 2003), ce qui empêche les chercheurs à se focaliser sur ces souches malgré leur pouvoir de délignification en sécrétant des Ligninases. Le *Chaetomium* (figure 3) se développe sur la plupart des matériaux de construction contenant de la cellulose, notamment dans les bâtiments endommagés par l'eau (Fogle et al., 2007). Il est souvent isolé du fumier, de la paille, du papier, des plumes d'oiseaux, des graines, des débris végétaux, du sol et même de l'air (Liu et Paterson, 2011).

Parmi les caractéristiques fondamentales identifiant les espèces du genre *Chaetomium* comprennent la présence d'ascocarpes plus ou moins en forme de bouteilles, avec un ostide par lequel les spores sont expulsées, de plus, ces ascocarpes sont recouverts de poils (Botton et al., 1990; Liu et Paterson, 2011).



Figure 2 Développement de *Trametes versicolor* dans la nature (Justo, 2014)

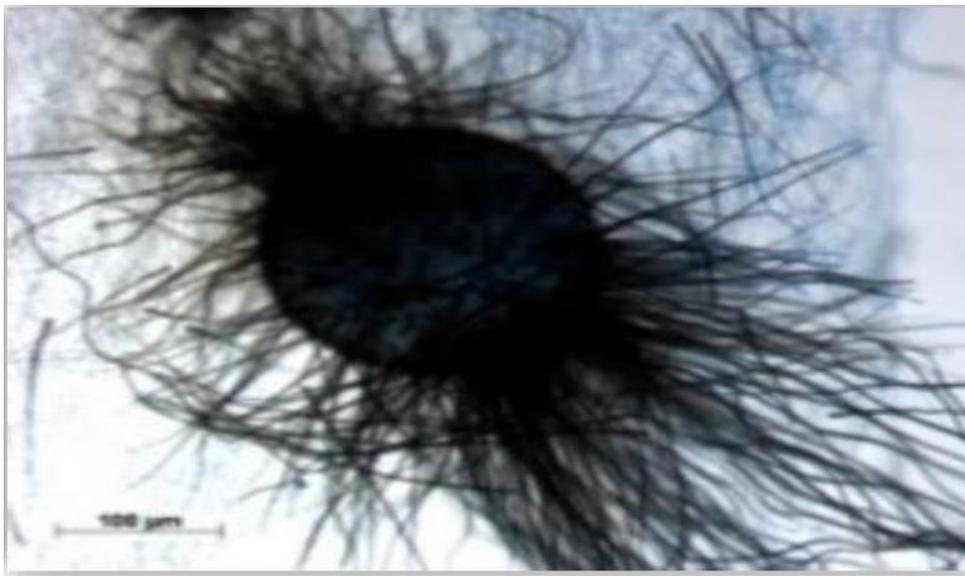


Figure3 Aspect microscopique de *Chaetomium sp.* (Dromer *et al.*, 2013)

2.2- Laccases

2.2.1- Source de laccase

La laccase a été découverte et décrite pour la première fois en 1883 par Yoshida quand il a extrait les exsudats d'un arbre japonais des laques *Rhus vernicifera*, d'où son appellation « Laccase », et que ces exsudats se durcissent quand ils sont exposés à l'air (Levine, 1965; Heather, 2000 ; Thurston, 1994 *in* Kunamneni *et al.*, 2007). Cependant, la laccase n'a été désignée en tant que phénol-oxydase et acceptée comme agent de délignification des plantes qu'en 1962 (Benfield *et al.*, 1964; O'Malley *et al.*, 1993).

La laccase est très répandue dans la nature, elle est présente chez les plantes et les mycètes (Shraddha *et al.*, 2011), comme elle a, aussi, été aperçue chez les insectes tels que *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cuprina*, *Sarcophago bullata* (Barrett, 1987; Miessner *et al.*, 1991). Par ailleurs, il a été constaté que certaines bactéries arrivent aussi à sécréter la laccase, telles que *Streptomyces lavendulae*, *S. cyaneus*, et *Marinomonas mediterranea* (Thakker *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 2003) et depuis quelques années, la laccase a été extraite à partir de la microflore d'un rumen bovin (Beloqui *et al.*, 2006).

➤ Chez les végétaux

La présence de laccase chez les plantes supérieures semble moins importante que chez les champignons. En effet, la laccase a été aperçue chez quelques arbres et quelques végétaux, dont : les choux, les navets, la betterave, les asperges, la pomme de terre, la poire et la pomme (Shraddha *et al.*, 2011). Toutes les laccases caractérisées jusqu'à présent sont des glycoprotéines, notamment celle de *Rhus vernicifera* qui est la plus étudiée. D'ailleurs, Huttermann *et al.* (2001) ont démontré la présence de laccase dans toute la famille des Anacardiaceae. Cette dernière semble contenir cette enzyme dans ces canaux de résine.

En général, la laccase joue un rôle important chez la plante en faisant partie de son système réparateur en cas d'une atteinte et de son système de défense auprès des conditions externes. (Dwivedi *et al.*, 2011). En outre, les informations restent limitées en ce qui concerne la présence et la caractérisation de laccases chez d'autres espèces. Généralement, la détection des activités laccasiques chez les plantes est beaucoup plus difficile que chez les mycètes (Mayer et Staples, 2002).

➤ *Chez les mycètes*

La laccase a été isolée à partir des Deutéromycètes, des Ascomycètes et surtout des Basidiomycètes qui dégradent efficacement la lignine (Assavanig *et al.*, 1992). En effet, l'activité laccasique a été déjà détectée chez 60 souches fongiques appartenant aux Basidiomycètes, la majorité de ces souches sont de la pourriture blanche (Faccelo et Cruz, 2009) et des champignons saprophytes (Morozova *et al.*, 2007). *Trametes versicolor*, et *Pleurotus eryngii* (Pleurote du panicaut) sont les producteurs les plus connus de la laccase. Cependant, la laccase a été caractérisée pour la première fois à partir d'un Ascomycète en l'occurrence, *Monocillium indicum* (Thakker *et al.*, 1997) et depuis, il a été signalé que certaines espèces de *Trichoderma*, comme *T. harzianum* ont la capacité de produire les polyphénol oxydases (Kiiskinen *et al.*, 2004; Sadhasivam *et al.*, 2008). La Laccase a, également, été produite par un grand nombre de champignons comestibles dont le pleurote *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* et *Agaricus bisporus*, etc. (Morozova *et al.*, 2007).

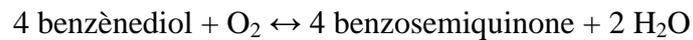
2.2.2- Rôle physiologique de laccase

Le rôle primordial de laccase est la dégradation de la lignine, cependant ce mécanisme n'est pas parfaitement clarifié, le rôle effectif de la laccase dans la ligninolyse reste à déterminer. L'action classique de la laccase entraîne la polymérisation des phénols par oxydation en contribuant à la lignification des tissus des plantes, ou la dépolymérisation en entraînant la délignification (Thurston, 1994). En d'autre part, il a été montré que les laccases interviennent dans la pigmentation des plantes (Heather, 2000). Par ailleurs, Mayer et Staples (2002) ont montré que ces enzymes peuvent être un facteur important de virulence dans la détection des phytopathogénécités causées par les champignons. Selon (Gianfreda, 1999), la laccase joue un rôle important dans la synthèse de l'humus du sol. En effet, elle peut transformer les polyphénols en quinones. De nombreux composés tels que des composés aminés vont réagir avec les quinones pour produire des substances humiques de plus en plus complexes (Heather, 2000).

2.2.3- Structure et propriétés moléculaires de laccase

La laccase désignée généralement sous le code *p*-diphénol : Oxydoréductase (EC : 1.10.3.2), appartient à la famille d'enzymes appelées « Bleu multicopper oxydases » (Issa, 2009). Les laccases sont des oxydoréductases glycosylées à cuivre qui oxydent divers composés aromatiques et non aromatiques, en utilisant l'oxygène, à travers un mécanisme réactionnel catalysé par des radicaux (Wetz, 2010).

Ces enzymes catalysent la réaction suivante:



Ces enzymes ont une masse moléculaire allant de 50 à 130 kDa et souvent elles sont glycosylées à 15-20% (Thurston, 1994). Les laccases d'origine fongiques se produisent souvent sous forme d'isoenzymes qui oligomérisent pour former des complexes multimères (Claus, 2004). Leur poids moléculaire est inférieur à celui de laccases issues de plantes. Généralement, les laccases sont des glycoprotéines dimériques ou tétramériques contenant dans leur site actif quatre atomes de cuivre qui se diffèrent par la nature de leur ligands (Issa, 2009). On distingue trois sites : T1, T2 et T3.

- Le T1 est le site responsable de la couleur bleu de l'enzyme, il contient un atome de cuivre (Cu^+) et il associe une cystéine;
- Le T2 contient le cuivre non bleu (Cu^{2+}) et il forme avec l'azote des histidines et avec l'oxygène un complexe tétraédrique;
- Le T3 contient deux atomes de cuivre qui sont fortement liés (Cu_{3a} et Cu_{3b}) où chacun d'eux est lié à trois histidines.

Selon Gasparetti, (2012), la structure globale des laccases se compose de trois domaines de type cupredoxine (A, B et C), chaque domaine ayant sa propre structure. Le site mononucléaire T1 est localisé dans le domaine C. Le site putatif de liaison substrat est situé entre les domaines B et C. alors que le groupe T2 / T3 est situé à l'interface entre les domaines A et C qui fournissent les résidus nécessaires pour la coordination des ions de cuivre (figure 4 et figure 5).

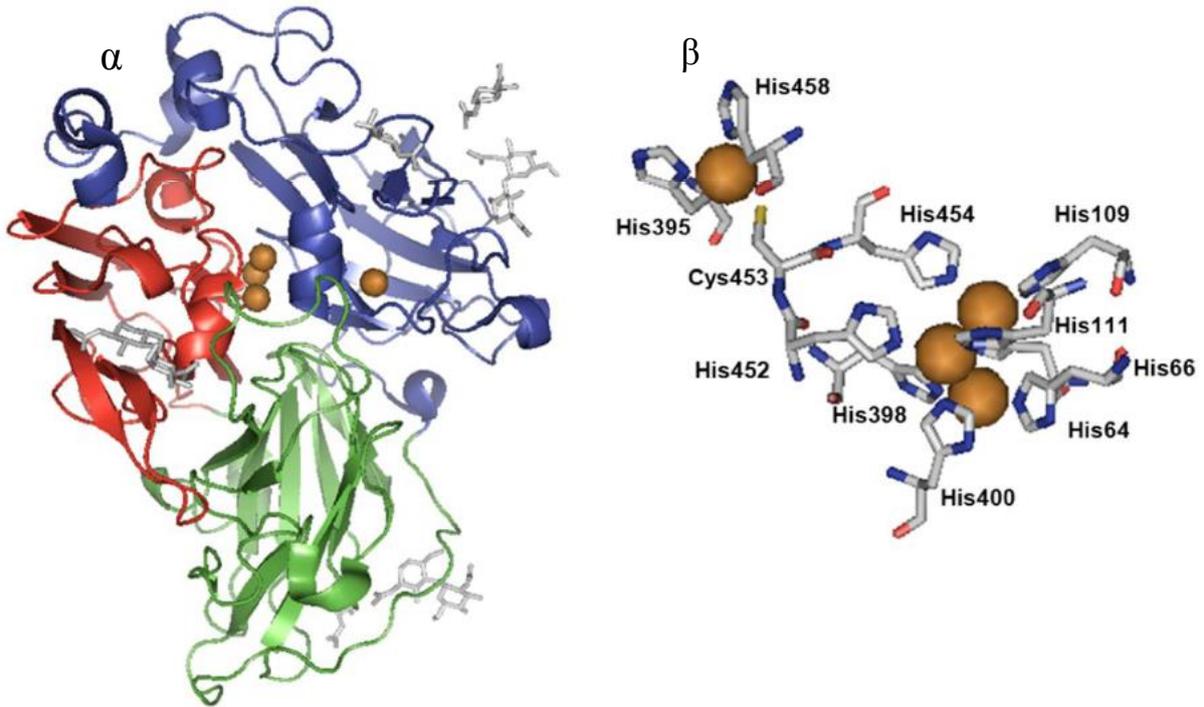


Figure 4 α : Structure tridimensionnelle de la laccase sécrétée par *Trametes versicolor*. β : Centre actif de la laccase sécrétée par *Trametes versicolor*. Domaine A est représenté par la couleur rouge; domaine B par le vert et domaine C par le bleu. Les ions de cuivre sont représentés par des sphères marron (Gasparetti, 2012)

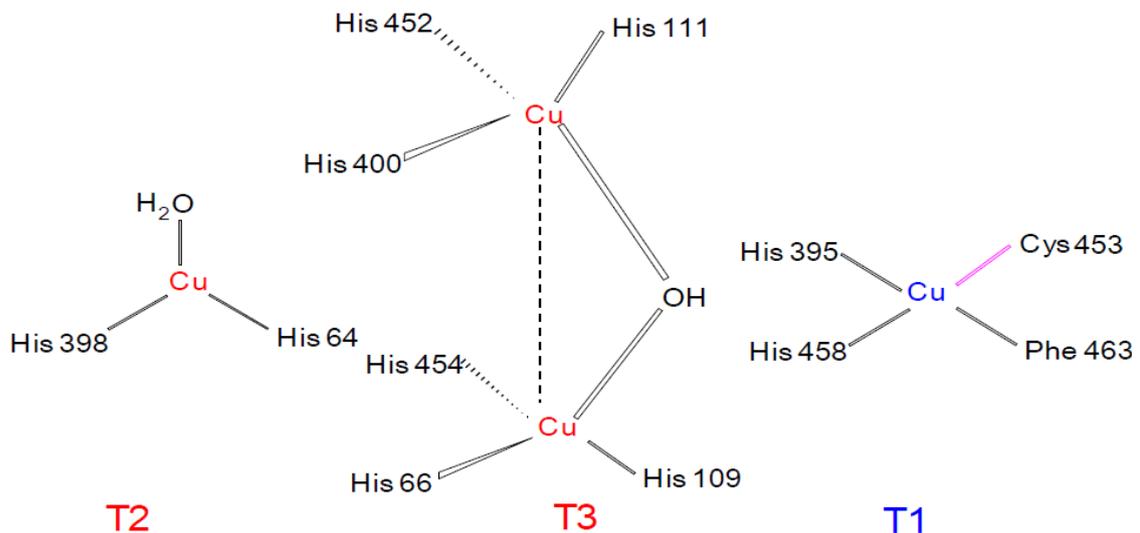


Figure 5 Environnement des 4 atomes de cuivre du site actif de la laccase de *Trametes versicolor* (Piontek *et al.*, 2002)

2.2.4- Mode d'action de laccase

Le cycle catalytique des laccases met en jeu la réduction d'une molécule d'oxygène en deux molécules d'eau et l'oxydation simultanée de quatre molécules de substrats produisant des radicaux libres. Ces derniers peuvent ensuite, produire des dimères, des oligomères et des polymères. De plus, les laccases sont capables d'oxyder une large gamme de composés aromatiques comprenant des monophénols et des polyphénols (Khushal *et al.*, 2010). Pour fonctionner, la laccase dépend des atomes de Cu répartis entre les trois différents sites de liaison. Les atomes de Cu jouent un rôle essentiel dans le mécanisme catalyseur. Selon (Gianfreda, 1999) et (Upadhyay *et al.*, 2016), la catalyse de laccase comprend les étapes suivantes:

- 1- La réduction du substrat par la laccase, le cuivre de T1 est réduit par un substrat réducteur, qui lui-même oxydé.
- 2- Le transfert interne d'électrons du Cu⁺ du type 1. Les électrons sont alors Transférés au « cluster trinuécléaire » qui contient Cu²⁺ de T2 et de T3.
- 3- La réduction de l'oxygène en molécule d'eau par les atomes de cuivre de T2 et T3 en perdant les électrons.

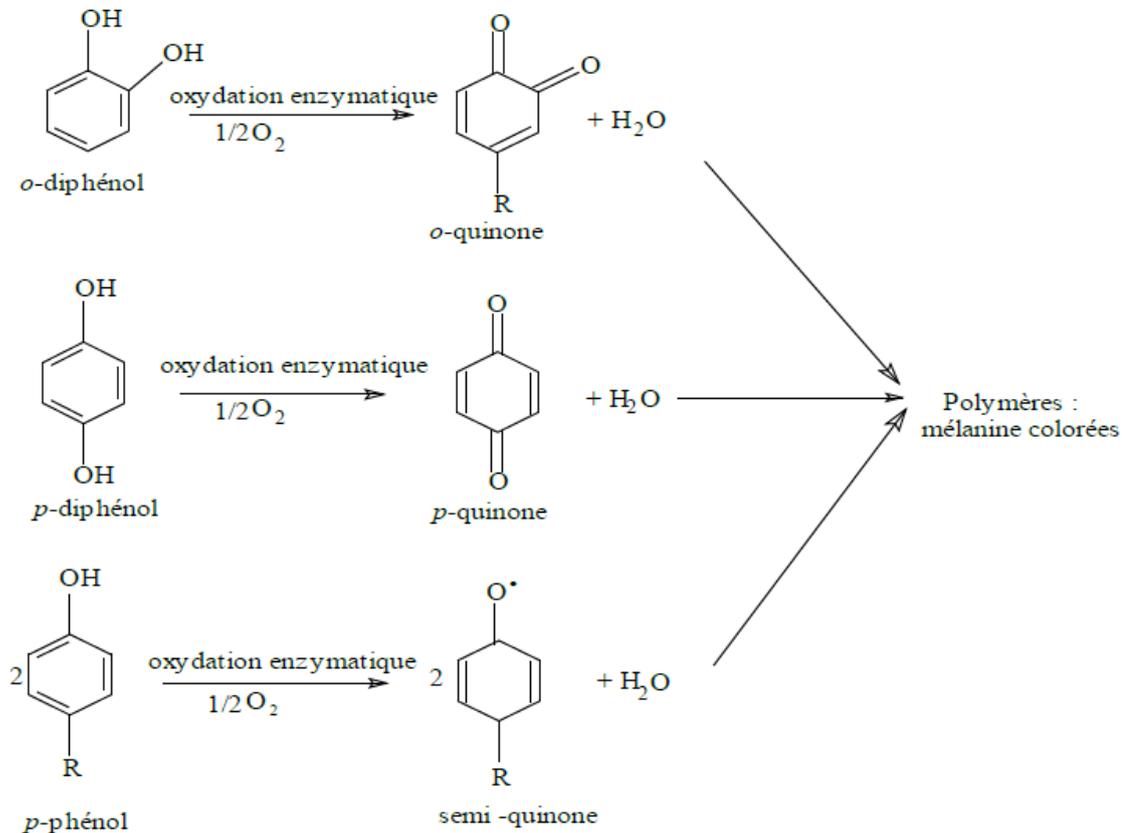


Figure 6 Différentes réactions catalysées par la Laccase (Issa, 2009)

2.2.5- Système Laccase-Médiateur

La laccase joue un rôle important dans la biodégradation de la lignine, néanmoins, L'oxydation laccasique de certains substrats non phénoliques ou phénoliques ne peut pas toujours être réalisée directement, soit parce qu'ils ne peuvent pas pénétrer jusqu'au site actif de l'enzyme, soit parce qu'ils possèdent un potentiel redox trop élevé par rapport à la laccase. (Madhavi et Lele, 2009). Cependant, ces substrats peuvent être oxydés indirectement en présence de produits appelés « médiateurs », Ces derniers agissent comme des substrats intermédiaires pour les laccases. En effet, la laccase oxyde le médiateur en radical, qui à son tour, réagit avec le substrat. Le médiateur a en fait un rôle de transporteur d'électrons entre le substrat et l'enzyme (Burton, 2003).

De nombreuses applications biotechnologiques sont désormais possibles, impliquant l'oxydation de composés non phénoliques (Khambhaty et coll, 2015). En outre, le potentiel redox de l'enzyme peut être augmenté si l'enzyme est couplée avec un médiateur à bas poids moléculaire, ce qui permet d'oxyder également des composés non phénoliques. On nomme ce couplage le système laccase-médiateur (LMS). Les médiateurs ayant une action plus efficace sont le 2,2' -anizobis-3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS), N-hydroxyphthalimide (NHPI) et le 1-hydroxybenzotriazole (HBT) (Roche, 2010; Khunshal *et al.*, 2010). Le système médiateur de laccase (LMS) a été d'abord décrit Par Bourbonnais et Paice (1995) en utilisant d'ABTS comme étant le premier médiateur testé. Il a été développé à l'origine pour résoudre les problèmes de blanchiment du papier et la délignification du bois. L'ABTS a été le premier Médiateur jugé efficace dans la délignification du papier kraft (Upadhyay *et al.*, 2016). L'application du LMS sur la pâte kraft se traduit par une déméthylation, une dépolymérisation de la lignine de kraft et une réduction du nombre kappa (Archibald *et al.*, 1997). Certaines autres applications de LMS impliquent l'oxydation des groupes méthyle aromatiques, des alcools benzyliques et des hydrocarbures polycycliques aromatiques (Roch, 2010; Upadhyay *et al.*, 2016). L'activité du système médiateur/laccase avec les substrats dépend du potentiel d'oxydation de l'enzyme, de sa stabilité et de la réactivité du radical formé au cours de l'oxydation du médiateur (Issa, 2009).

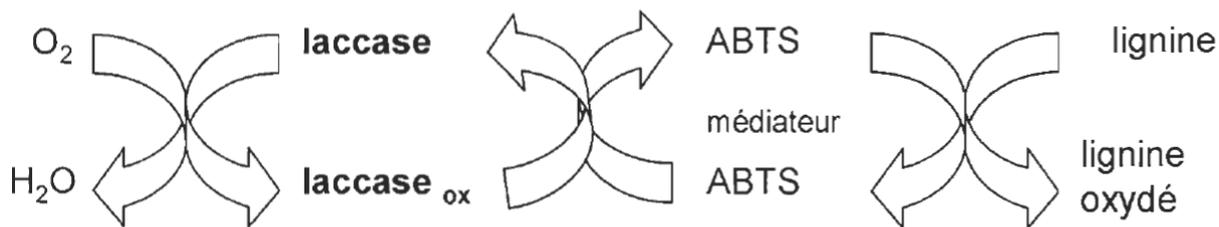


Figure 7 Mécanisme d'oxydation du LMS sur la lignine (Roch, 2010)

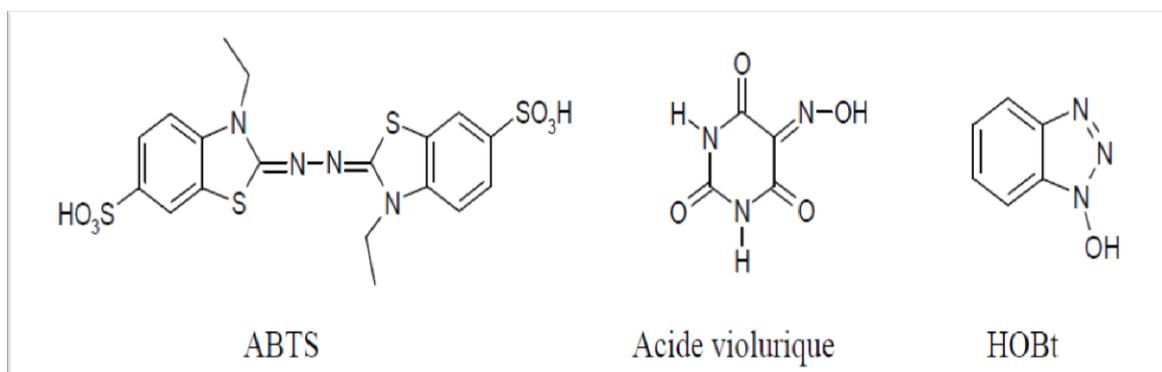


Figure 8 Principaux médiateurs utilisés (Barbat, 2009)

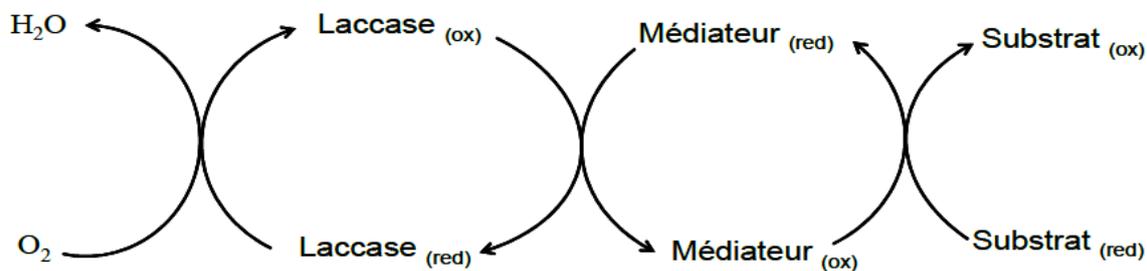


Figure 9 Présentation schématique de la catalyse de la laccase en présence de médiateur chimique (Issa, 2009)

2.2.6- Production de laccase

Les laccases sont des enzymes extracellulaires sécrétées dans le milieu par les mycètes filamenteux. Ces enzymes sont généralement produites durant le métabolisme secondaire (Khushal *et al.*, 2010). Plusieurs facteurs peuvent influencer leur production, y compris le type de culture sur milieu submergé ou sur milieu solide. Néanmoins l'utilisation de cette dernière rend le contrôle de température, de l'aération et de l'humidité difficile, c'est pourquoi les cultures submergées sont préférables, elles sont mieux adaptées aux différents paramètres de contrôle et réduisent le risque de contamination. De plus ce type de culture s'apprête mieux aux opérations d'exploitations et d'optimisation nécessaires pour le passage du petit volume en erlenmeyer ou en fiole au fermenteur (Scriban, 1998).

D'autres facteurs peuvent influencer la production de laccase tels que la composition du milieu, la présence de nutriments comme le fer, le cuivre et le manganèse, des facteurs comme le pH, la température, l'eau, le taux d'aération, la présence d'azote, de glucose ...etc. (Couto et Herrera, 2006).

2.2.6.1- Spécificité du substrat

Les laccases peuvent oxyder une très large gamme de substrats. Elles sont capables d'oxyder les composés phénoliques et non phénoliques, elles rentrent dans la polymérisation et la dépolymérisation la lignine et il a été montré que ces enzymes oxydent les hydrocarbures aromatiques polycycliques qui sont souvent transformés à l'aide de médiateurs chimiques comme l'ABTS, le gaïacol et la syringaldazine (Faccelo et Cruz, 2008). Selon Gienfreda *et al.* (1999), la préférence catalytique de la laccase dépend essentiellement de l'origine de l'enzyme, de la nature et de la position des substituants par rapport à la fonction phénol.

2.2.6.2- Influence de la température

La température est un paramètre essentiel pour les réactions enzymatiques. Son augmentation devrait activer l'enzyme, cependant, des valeurs élevées peuvent inhiber la protéine enzymatique en la dénaturant, et peuvent aussi diminuer la solubilité de l'oxygène dans le milieu réactionnel (Issa, 2009). Par ailleurs, la température optimale de la laccase peut varier considérablement d'une souche à l'autre. En général, les mycètes sont cultivés à des températures entre 25°C et 30°C pour la production de laccase (Vasconcelos *et al.*, 2000). D'autre part, la température optimale pour la plupart des laccases est comprise entre 50°C et 70°C (Issa, 2009).

2.2.6.3- Influence du pH

La valeur de pH permettant une activité laccasique maximale dépend de l'origine de la laccase. En effet, l'oxydation des phénols par la laccase dépend du pH du milieu, car cela implique la perte de proton. De ce fait, le pH d'activité enzymatique optimale dépend généralement du type d'enzyme et du type de substrat (Xu *et al.*, 1996). D'après la littérature, la majorité des champignons filamenteux de pourriture blanche se développent de façon optimale à pH acide (Knapp *et al.*, 2001). Par ailleurs, nombreux chercheurs ont suggéré qu'un milieu à pH variant entre 4,5 et 6,0 est généralement approprié pour la production de la laccase (Khushal *et al.*, 2010).

2.2.7- Induction de laccase

La production de laccase peut être considérablement augmentée par l'ajout de divers suppléments aux milieux de culture (Lee *et al.*, 1999). Lorsqu'un inducteur est inclus, plusieurs facteurs pouvant influencer la production de laccase doivent être pris en considération: la nature du produit chimique, la quantité et le temps d'addition de l'inducteur. Certains peuvent agir pour augmenter la production de laccase, alors que d'autres n'ont aucun effet ou peuvent même contribuer à la diminuer. Un des inducteurs les plus courants est la 2,5-xylydine: il a stimulé la formation de la laccase par les mycètes tels que *Trametes versicolor*, cependant l'activité enzymatique de *Botrytis cinerea* est restée inchangée et la production de laccase par *Podospora anserina* a été fortement inhibée (Gianfreda *et al.*, 1999). L'addition de composés xénobiotiques tels que la lignine et l'alcool veratrylique induit l'activité de la laccase (Xavier *et al.*, 2001). Dans une étude menée par Lu *et al.* (1996), ils ont observé que l'addition de cellobiose peut induire l'activité laccasique de façon considérable chez certaines espèces de *Trametes*. Par ailleurs, l'ajout d'une faible concentration de cuivre au milieu de culture a un effet induisant sur l'activité de la laccase (Palmieri *et al.*, 1997).

2.2.8- Production en scale-up

Le bioréacteur est conçu en fonction du type de processus qui doit s'y dérouler. Quel que soit le type de microorganisme, le bioréacteur doit permettre un contact aussi bon que possible entre les deux phases: biotique et abiotique du système (Scriban, 1993). Le plus grand avantage que la production en bioréacteur peut offrir est le contrôle des paramètres environnementaux, tels que le pH et la température, etc., qui sont difficiles à surveiller et ajuster en erlenmeyer (Jones, 1998). Ces paramètres peuvent être optimisés dans un fermenteur selon le type du produit recherché ou/et la croissance de la souche. En effet, les fermenteurs utilisés sont dotés d'une couronne d'aération classique, la plupart des

fermentations d'enzymes présentent une forte demande en oxygène, des équipements de mesure et de contrôle sur le fermenteur permettant de suivre et de réguler les différents paramètres de culture. Des conditions d'asepsie rigoureuses sont nécessaires, d'une part, pour obtenir un bon rendement et d'autre part, pour ne pas risquer la sécrétion de substances toxiques par des contaminants (Scriban, 1998).

Par ailleurs, afin d'assurer le bon déroulement du processus, des essais préliminaires effectués dans des flacons sous agitation doivent être employés, cela peut fournir des informations nécessaires, tel que les caractéristiques de croissance de l'organisme étudié. Cependant, un inconvénient majeur de la production à grand échelle dans un fermenteur est la viscosité, dépendant généralement des caractéristiques physiques de la croissance fongique, qui est souvent mycélienne et de la sensibilité des cellules par rapport aux forces de cisaillement causées par l'agitation, ce qui peut engendrer un manque d'oxygène gênant la croissance microbienne (Heather, 2000). Néanmoins, une façon de réduire la viscosité est de faire pousser le champignon sous forme de pellettes, cela permet une bonne oxygénation et une bonne croissance de la biomasse (Jones, 1998).

Il existe de nombreux modèles de fermenteurs disponibles, cependant, le réacteur à réservoir agité est le modèle le plus courant utilisé pour la production à grande échelle, car il offre une meilleure flexibilité pour la production de la plupart des cellules, y compris les bactéries, les champignons et algues (Jones, 1998).

2.2.9- Production de laccase sur milieu à base de déchets agroalimentaires

De nombreux chercheurs ont essayé de produire des laccases en utilisant des milieux de culture à base de déchets agroalimentaires. En effet, il a été montré que la production en milieu solide ou en milieu submergé est plus importante en utilisant le son de riz par rapport à d'autres substrats (Shraddha *et al.*, 2011). La capacité inductive de ce substrat est basée sur les composés phénoliques tels que l'acide ferulique et l'acide vanillique qui induisent la production de la laccase (Munoz *et al.*, 1997). Différents déchets agricoles ont été testés afin de produire la laccase, comme les graines et les pépins de raisin, le son d'orge (Lorenzo *et al.*, 2002), les tiges de coton, les déchets de mélasse (Kahraman et Gurdal, 2002) et le son de blé (souza *et al.*, 2002). Cependant, une culture prolongée est nécessaire afin d'atteindre une activité enzymatique maximale (Shraddha *et al.*, 2011).

2.2.10- Applications des laccases

De nombreux chercheurs ont répertorié toutes les différentes applications des laccases dans des domaines aussi variés, précisément en industrie, tels que l'industrie boulangère, papeterie, la synthèse organique, l'environnement, l'alimentation et la nano-biotechnologie (Kunamneni *et al.*, 2007). Le pouvoir oxydant des laccases a permis leur application dans l'industrie du textile, l'industrie de la transformation du bois, l'industrie pharmaceutique et elles ont même été utilisées comme un puissant catalyseur (Shradha *et al.*, 2011). Des études toxicologiques ont montré que les laccases de *Myceliophthora thermophila* et *Polyporus pinsitus* pouvaient être utilisées sans crainte dans les domaines cosmétique et alimentaire (Brinch et Pedersen, 2002).

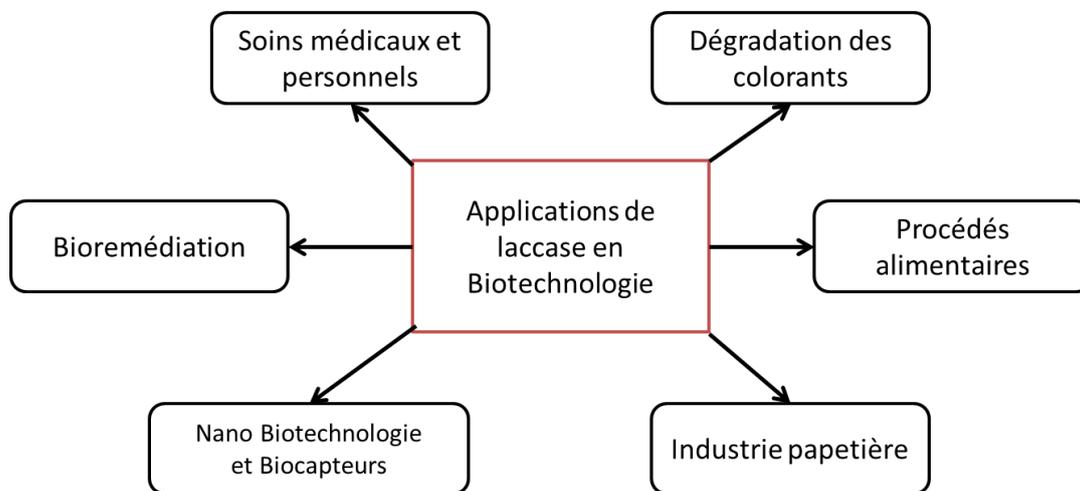


Figure 10 Différentes applications de laccase en Biotechnologie (Upadhyay *et al.*, 2016).

2.2.10.1- Industrie alimentaire

Les laccases peuvent être utilisées dans certains procédés alimentaires afin d'améliorer l'apparence de la couleur de la nourriture et des boissons ainsi pour traiter les composés phénoliques des effluents industriels. Par exemple, ces enzymes sont utilisées dans l'élimination de composés phénoliques indésirables, responsables du brunissement et de la turbidité dans certains jus de fruits (Mathiasen, 1996; Mayer et Staples, 2002; Georis *et al.*, 2003). De nombreux substrats de laccase, tels que les glucides, les acides gras insaturés, les phénols et les protéines contenant un thiol, sont des composants importants de divers aliments et des boissons. Leur modification par la laccase peut conduire à de nouvelles fonctionnalités, pouvant améliorer la qualité et réduire le coût de production (Kirk *et al.*, 2002). En effet, (Minussi *et al.*, 2002) ont montré que la laccase améliore la qualité des jus de fruits par élimination sélective des dérivés phénoliques et peut augmenter la durée de conservation.

Les laccases sont aussi utilisées dans la cuisson de certains aliments pour l'élimination des composés phénoliques indésirables et la bioremédiation d'eaux usées (Selinheimo *et al.*, 2006 ; Couto and Herrera, 2006). Elles peuvent être appliquées pour la stabilisation de certains périssable produits contenant des huiles végétales (Morozova *et al.*, 2007). Les laccases pourraient aussi être intéressantes pour l'industrie des pâtes car comme l'a montré Selinheimo *et al.*, (2006), la laccase de *Trametes hirsuta* est capable d'une part d'augmenter la résistance d'une pâte de farine avec gluten et d'autre part de contribuer à diminuer son extensibilité.

2.2.10.2- Industrie pharmaceutique

Les laccases ont été utilisées pour la synthèse de plusieurs produits de l'industrie pharmaceutique (Arora et Sharma, 2010). En effet, selon Upadhyay *et al.* (2016), grâce à leur spécificité et leur nature biologique, les laccases peuvent générer de nombreux produits à usage paramédical comme les antimicrobiens ou les détoxifiants et même être utilisées dans la synthèse de composés complexes à usage médical comme les anesthésiants, les anti-inflammatoires, des Sédatifs, des antibiotiques...etc., y compris triazolo (benzo) cycloalkyl thiadiazines, la vinblastine, la mitomycine, le dimère de pénicilline X, les céphalosporines, et la vindoline dimérisée. Par ailleurs, des chercheurs ont montré que les laccases peuvent intervenir dans la préparation de certains médicaments importants, comme les anticancéreux ou bien pour réduire la toxicité de certains produits cosmétiques (Couto et Herrera, 2006). En d'autre part, Nicotra *et al.*, (2004) et Intra *et al.*,(2005) ont décrit la laccase comme une enzyme possédant des applications dans la synthèse des dérivés des hormones et elle a même été utilisée dans des préparations dermatologiques contenant des protéines afin d'éclaircir la couleur de la peau

2.2.10.3- Nanobiotechnologies et Biocapteurs

Les nanobiotechnologies sont l'ensemble des technologies se déroulant à l'échelle du nanomètre. Elles consistent à mettre en œuvre des procédés miniaturisés permettant la production ou l'analyse de divers produits (Aljawish, 2013). Une des utilisations intéressantes des laccases en nanobiotechnologie est le développement de cellules électrochimiques (mini cellule) pour la production d'énergie (Chen *et al.*, 2001). La laccase connue comme un catalyseur permettant l'oxydation de divers composés aromatiques, en particulier les phénols, qui sont considérés comme des polluants organiques, présents dans les eaux usées. Cette fonction spécifique, permet à cette enzyme d'avoir un grand impact sur le développement de

biocapteurs, tant pour les polluants environnementaux que pour les métabolites cliniquement pertinents (Upadhyay *et al.*, 2016). Les laccases sont capables de catalyser des réactions de transfert d'électrons sans cofacteurs supplémentaires. Dans la technologie du biocapteur, l'utilisation de la laccase est surtout attribuée à sa large gamme de substrats permettant la détection de composés phénoliques, d'oxygène ou d'azotures; Cela ne permet toutefois pas de détecter des constituants spécifiques (Fogel et Limson, 2013). Plusieurs chercheurs ont utilisé la laccase comme biomolécule dans les biocapteurs pour déterminer l'efficacité de la micro-encapsulation et pour modéliser son comportement dans des microréacteurs enzymatiques (Gusetu, 2010). Les biocapteurs qui utilisent la laccase comprennent une électrode permettant la détection des phénols, comme les catéchols dans le thé (Palmore et Kim 1999), dans des échantillons d'eau (Li *et al.*, 2014), la lignine et les phénols dans les eaux usées (Upadhyay *et al.*, 2016).

2.2.10.4- Industrie du papetier

Le chlore et l'oxygène sont utilisés comme oxydants chimiques afin d'assurer la séparation et la dégradation de la lignine lors de la préparation de la pâte à papier au niveau industriel (Shraddha *et al.*, 2011). Cependant, certains problèmes tels que le recyclage, la toxicité et le coût demeurent non résolus. Toutefois, il a été montré que les SLM jouent un rôle important dans les processus de blanchiment, en permettant un remplacement partiel du dioxyde de chlore lors de l'extraction de la pulpe de bois (Srebotnik et Hammel, 2000).

2.2.10.5- Bioremédiation et traitement des eaux usées

L'un des problèmes majeurs qui affligent le monde est la contamination de l'air, du sol et de l'eau par des produits chimiques susceptibles d'avoir un impact catastrophique sur la santé humaine et l'environnement. En effet, la pollution de l'environnement est devenue un problème sérieux avec l'industrialisation et l'utilisation immense de pesticides dans l'agriculture. Des réglementations rigoureuses ont été imposées aux industries pour traiter leurs effluents résiduels avant leur décharge. Plusieurs techniques d'assainissement ont été signalées au cours des deux dernières décennies, mais peu sont appliquées par les industries. Certains composés périlleux sont persistants dans l'environnement, tels que les pentachlorophénols (PCP), les polychlorés Les biphényles (PCB), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophényl) éthane (DDT), le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et le xylène. Cependant, les processus biologiques de bioremédiation ont été retenus comme une alternative afin de minimiser l'utilisation des

méthodes physicochimiques (Upadhyay *et al.*, 2016). Il a été montré que l'utilisation de laccase mobilisée sur le polyéthersulfone permet une diminution considérable de la concentration en phénols des eaux usées (Lante *et al.*, 2000), par ailleurs, Crecchio *et al.* (1995) ont approuvé que lorsque la laccase est immobilisée sur un support d'organogel, elle élimine les composés aromatiques et xénobiotiques des suspensions aqueuses. Yague *et al.* (2000) ont indiqué que les eaux usées contenant des tannins élevés ont été dégradées par une laccase produite par *Coriolopsis Gallica*. Les polymères insolubles sont ensuite éliminés par filtration ou sédimentation (Torres *et al.*, 2003).

2.2.10.6- Dégradation des colorants synthétiques

Les colorants synthétiques sont largement utilisés dans les textiles, les aliments et le papier. Ils ont des structures chimiques complexes, les rendant résistants à la lumière, à l'eau et même aux microorganismes (Saratale *et al.*, 2011). Cette persistance est dangereuse pour l'environnement et rend l'élimination de ces colorants difficile et coûteuse (Hartikainen *et al.*, 2016). La laccase permet une décoloration de certains colorants azoïques sans clivage direct par un mécanisme touchant des radicaux libres, en évitant ainsi la formation d'amines aromatiques toxiques (Kalme *et al.*, 2009). L'utilisation de la biomasse fongique pour décolorer les effluents industriels est un objectif que de nombreux chercheurs essaient de le concrétiser, néanmoins, le traitement des colorants à base de laccase fournit un bon début pour le développement des processus biotechnologiques de décoloration et de l'élimination des effluents à grande échelle dans l'industrie (Kuhar *et al.*, 2015; Upadhyay *et al.*, 2016).

2.2.10.7- Autres applications

Récemment, les laccases de *Trametes hirsuta* ont été utilisées pour la réalisation de biopiles en fonction de leur site actif (Tingry *et al.*, 2013). Elles semblent aussi être impliquées dans les processus de production de biomasse mycélienne (Mansur *et al.*, 2003) et d'inhibition du développement des moisissures (Velazquez-Cedeño *et al.*, 2008). Kobayashia et Higashimurab, (2003) décrivent la synthèse d'un plastique thermostable (poly phénylène éther) par l'action de la laccase et ce par polymérisation oxydative de 2,6-diméthoxyphénol.

2.3- Dégradation des colorants du textile

2.3.1- Historique des colorants

Les êtres humains ont depuis toujours utilisé les colorants. Jusqu'à la moitié du 19^{ème} siècle, ils étaient d'origine naturelle. Des pigments inorganiques étaient utilisés tels que l'hématite et l'ancre. Par ailleurs, des colorants naturels organiques ont été appliqués, surtout dans

l'industrie du textile. Ces colorants sont tous des composés aromatiques qui proviennent essentiellement des plantes, tel que l'alizarine et l'indigo. L'industrie des colorants synthétiques est née en 1856 quand le chimiste anglais Perkin, dans une tentative de synthèse de la quinine artificielle pour soigner la malaria, a obtenu le premier colorant synthétique qu'il appela «mauve» (aniline, colorant basique). De nouveaux colorants synthétiques commencent à paraître sur le marché (Hammami *et al.*, 2008). Finalement, les colorants naturels sont presque complètement remplacés par les colorants synthétiques dès le début du 20^{ème} siècle (Welham, 2000). On dénombre environ 8000 colorants synthétiques différents, répertoriés dans le « Colour Index » sous 40000 dénominations commerciales. Chaque colorant y est classé sous un nom de code indiquant sa classe, sa nuance ainsi qu'un numéro d'ordre (Hammami *et al.*, 2008).

2.3.2- Colorants du textile

Les colorants textiles sont des contaminants cruciaux et répandus dans les eaux usées. Ils sont évacués dans les effluents dans le cadre du processus de l'industrie du Textile (Mendoza, 2011). Une fois déchargés, ils peuvent conférer des propriétés toxiques et cancérogènes à l'eau et peuvent modifier la charge organique totale (Dos Santos *et al.*, 2004; Cristovao *et al.*, 2009). De plus, la coloration de l'eau affectera l'absorption normale de la lumière solaire pour de nombreux organismes aquatiques (Cristovao *et al.*, 2009).

Structurellement, une molécule de colorant se compose de deux parties: le chromophore et l'auxochrome. Le premier est responsable de la couleur et le second permet la solubilité dans l'eau et l'affinité à s'attacher aux fibres textiles (Gupta et Suhas 2009). La classification des colorants peut être faite selon leur constitution chimique (colorants azoïques, anthraquinoniques, indigoïdes, etc.) appelée classification chimique ou selon leur domaine d'application, appelée classification Tinctoriale (Chenini, 2012).

2.3.2.1- Colorants azoïques

Les colorants azoïques sont les colorants les plus utilisés en industrie des textiles (Martins *et al.*, 2001, Steffan *et al.*, 2005). Il a été estimé qu'ils représentent 65 à 70% de la quantité totale de colorants produits, ils constituent ainsi les colorants les plus prédominants dans les eaux usées (Gupta and Suhas, 2009).

Structurellement, les colorants "azoïques" sont caractérisés par le groupe fonctionnel azo (-N=N-) unissant deux groupements alkyles ou aryles identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique). Ces structures qui reposent généralement sur le squelette de l'azobenzène,

sont des systèmes aromatiques ou pseudoaromatiques liés par un groupe chromophore azo (Hammami *et al.*, 2008).

Les colorants azoïques sont classés comme monoazodyes anioniques, colorants acides, colorants dispersés, des colorants cationiques, des colorants directs et des colorants réactifs, et chacun est utilisé dans différents procédés de teinture (Mendoza, 2011).

Les eaux usées qui contiennent ces colorants sont généralement résistants au traitement dû à la présence de la liaison N = N et / ou sulfonate (SO₃H) (Steffan *et al.*, 2005). En outre, la plupart de ces colorants azoïques sont considérés toxiques, car ils peuvent former des amines aromatiques (Anilines) considérés comme cancérigènes (Yag *et al.*, 2000). Les effets néfastes des colorants azoïques ne sont pas un sujet d'actualité, en effet, dès 1895, l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile, est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques. Depuis, les travaux effectués sur ces colorants ont démontré que ces composés chimiques présentaient des effets cancérigènes sur l'homme et l'animal (Chenini, 2012).

2.3.2.2- Colorants triphénylméthanés

Les colorants triphénylméthanés sont largement utilisés dans l'industrie textile (Ayed *et al.*, 2009) pour la coloration des teintures du coton, de la laine, de la soie, du nylon, etc. (Ayed *et al.*, 2009; Hamza *et al.*, 2009). Ils sont également employés dans l'industrie du papier, le cuir, le plastique, les vernis, les graisses et les cires, ainsi que dans les analyses médicales (Casas *et al.*, 2009), d'où leur présence importante dans les eaux usées industrielles colorées. Les colorants de triphénylméthane sont très récalcitrants à la dégradation chimique ou biologique et leur présence dans les eaux provoque une perturbation de la vie aquatique (Ayed *et al.*, 2009) ainsi que des problèmes graves de santé à l'homme et aux animaux tels que les lésions oculaires, l'irritation et la douleur par ingestion (Hamza *et al.*, 2009).

2.3.3- Toxicité des colorants et leurs effets sur l'environnement

La toxicité des colorants vient de l'ignorance de leurs structures chimiques qui diffèrent d'un type à un autre, ainsi que de leur mode d'utilisation. Plusieurs études ont démontré les effets toxiques et carcinogènes des colorants, cela implique le traitement des effluents contenant ces colorants avant d'être rejetés à l'environnement. Leur toxicité est en fait due à la teneur en groupements cancérigènes tels que les groupements aromatiques, phtalogènes, cyanurés, sel de barium et de plomb. Ces groupements cancérigènes (sous forme électrophile ou radicalaire) attaquent les bases pyrimidiques de l'ADN et de l'ARN et causent par

conséquent, une altération du code génétique avec mutation et risque de cancer (Oubagha, 2011).

2.3.4- Méthodes de traitement des colorants

Le traitement des rejets textiles pollués par les colorants, compte tenu de leur hétérogénéité de composition, conduira toujours à la conception d'une chaîne de traitement assurant l'élimination des différents polluants par des étapes successives (Chenini, 2012).

Le traitement peut être physique, cela implique les différentes méthodes de précipitation (coagulation, floculation, sédimentation), l'adsorption (sur charbon actif), l'osmose inverse, la filtration et l'incinération. En revanche, le traitement chimique s'effectue par oxydation (oxygène, ozone, oxydants tels que NaOCl, H₂O₂) et réduction (Na₂S₂O₄) (Chenini, 2012). Bien que la plupart de ces méthodes de traitement soient efficaces, leur coût élevé et la formation de dérivés dangereux posent des problèmes (Mendoza, 2011). De ce fait, l'utilisation d'un traitement biologique présente une bonne solution.

En effet, un traitement des colorants azoïques peut être réalisé par des bactéries aérobies ou anaérobies (Gopinath *et al.*, 2009). Dans le cas des anaérobies, la décoloration est effectuée par clivage en réduisant la liaison azo, ce qui cause la production des amines susceptibles d'être toxiques ou/ et cancérigènes (Martins *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les mycètes sont appliqués dans le traitement des colorants de deux façons. La première implique l'adsorption mycélienne des colorants par application de cellules vivantes ou mortes (Fu et Viraraghavan, 2001, Kaushik et Malik, 2009), tandis que l'autre comprend l'application de cellules vivantes et de leurs enzymes extracellulaires (Kapdan *et al.*, 2000, Wesenberg *et al.*, 2003). L'efficacité du traitement dépend de l'espèce fongique ainsi que du type de colorant à traiter (Mendoza, 2011). En outre, les enzymes fongiques extracellulaires présentent de grands avantages, parmi ces enzymes, les laccases qui offrent la possibilité de dégrader les colorants en présence ou en absence de médiateurs. Les laccases sont capables de décolorer les colorants par la formation de radicaux libres pouvant aboutir à la polymérisation (Zille *et al.*, 2005), ou le clivage des colorants (Chivukula et Rengahatan, 1995).

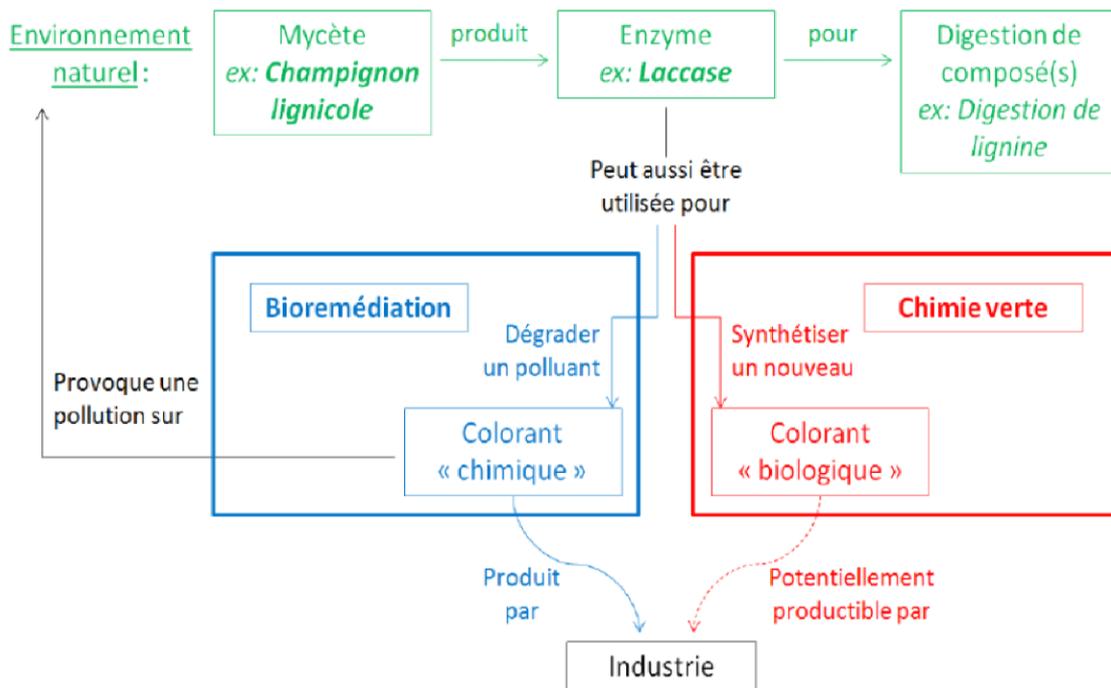


Figure 11 Utilisation de laccase pour dégrader et synthétiser des différents colorants (Bataille *et al.*, 2011)

Matériel et Méthodes

3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'isolement et la sélection de souches fongiques productrices de laccase, à partir des forêts situées à l'Est Algérien et sur la recherche des applications biotechnologiques de cette enzyme. Pour ce faire, une caractérisation partielle de l'enzyme est recherchée.

3.1- Echantillonnage

Le prélèvement d'échantillons était effectué à partir de trois sites, en l'occurrence: le parc national de Belezma qui se trouve dans la wilaya de Batna, la forêt de Kenouââ située à Collo, wilaya de Skikda et la forêt de Chettaba située à Ain Smara, Wilaya de Constantine.

Les trois sites sont localisés au niveau de l'Est Algérien, le territoire se situe entre les parallèles : $36^{\circ} 54'$ et $34^{\circ} 48'$ de latitude Nord et entre $8^{\circ} 27'$ et $5^{\circ} 4'$ de longitude Est (figure 11). Le front polaire saisonnier connaît un mouvement entre le 35ème et le 65ème parallèle, ce qui régit le climat de la région de l'Est Algérien pendant la saison la plus froide de l'année. Le climat est généralement aride en été et tempéré humide en hiver (Farah, 2014).



Figure 12 Localisation géographique des différentes régions d'échantillonnage (Farah, 2014).

Etant donné que ce travail porte sur la recherche de moisissures susceptibles de produire la laccase, enzyme dégradant la lignine, les échantillons qui ont été ciblés sont le bois des arbres et le sol rhizosphérique des régions prospectées.

L'échantillonnage a été réalisé selon la méthode de Rodriguez *et al.* (2006), avec quelques modifications. En effet, des segments de troncs d'arbres ont été prélevés de chaque forêt, emballés séparément dans des sachets comportant la date et le lieu de prélèvement, ainsi que la nature d'échantillon prélevé. En outre, des échantillons du sol ont été prélevés à partir de la zone rhizosphérique, à l'aide d'une tarière à environ 15 cm autour de l'arbre et à 20 cm en profondeur. Le prélèvement a été effectué aseptiquement à l'aide d'une spatule stérile et en utilisant un chalumeau. Les échantillons ont été recueillis dans des seringues stériles de 50 ml. Enfin, ils ont été transportés le jour même au laboratoire afin de les conserver au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation.

3.2- Isolement des mycètes

Cette étape a été réalisée sur milieux PDA (Potato Dextrose Agar) et Sabouraud (annexe 1) supplémentés de Chloramphénicol (annexe 2). L'isolement des mycètes à partir du sol a été effectué selon la méthode de suspension-dilution (Kara ali, 2014), qui consiste à préparer une solution mère par l'ajout de 1g du sol à 9 ml d'eau physiologique stérile (9g de NaCl dans 1 litre d'eau distillée) suivie d'une agitation au vortex. Cette solution a servi à préparer des dilutions décimales en ajoutant successivement 1ml de cette solution à 9ml d'eau distillée stérile jusqu'à l'obtention de la dilution désirée (10^{-6}).

La flore fongique a été mise en évidence par le dépôt de 0.1 ml de chaque suspension dans des boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif PDA à pH 5.8 supplémenté de Chloramphénicol, puis étalé uniformément avec un étaloir stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose.

Toutefois, l'isolement à partir des fragments préalablement coupés en morceaux de 2cm a été réalisé après avoir subi un traitement établi par Tortora *et al.* (2003), qui consiste en trempage successif des fragments, à l'aide d'une pince stérile, dans de l'éthanol, puis dans de l'eau de Javel et enfin dans de l'eau distillée et ce, afin d'éliminer toute contamination extérieure. Ces fragments sont ensuite, récupérés à l'aide d'une pince pour enfin être déposés au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Les préparations précédentes ont été incubées à 30°C jusqu'à développement apparent de colonies ou d'hyphes mycéliens.

La même méthode d'isolement est reprise sur milieu Sabouraud.

3.3- Purification et conservation des isolats

Cette étape permet l'obtention d'isolats à l'état pur à partir d'une spore ou d'hyphe mycélien. La purification des isolats consiste à repiquer une bouture d'hyphes mycéliens ou de spores

issus des boîtes de l'isolement. L'ensemencement a été réalisé au centre d'un milieu gélosé (PDA). L'incubation des boîtes était effectuée à 30°C pendant 7 jours. Des repiquages successifs accompagnés par des observations microscopiques sont nécessaires afin de s'assurer de la pureté de la souche (Michael et John, 2006). Une fois purifié, chaque isolat est désigné par un code. La conservation a été opérée par le maintien des isolats à une température de 4°C et un repiquage périodique pour s'assurer de la viabilité des isolats. Pour ce faire, des disques de 0.5 cm de diamètre des cultures purifiées sont transférés dans des tubes à essais stériles contenant de l'eau physiologique additionnée de 20% de glycérol.

3.4- Sélection des isolats producteurs de laccase

Ce test a pour but, la sélection des souches ayant une activité laccasique. Pour ce faire, les isolats ont été ensemencés par la méthode de disques sur le milieu de culture Olga (annexe 1) additionné de 0.01% de gaïacol. L'incubation a été effectuée à 30°C pendant 7 jours. L'apparition d'un halo rouge bordeaux est considérée comme une réaction positive résultant de l'oxydation du gaïacol par l'enzyme (Kalra *et al.*, 2013).

3.5- Identification des isolats sélectionnés

Les isolats ayant montré une activité laccasique ont été identifiés par l'ensemble de test préliminaires (observation macroscopique et microscopique) et moléculaires (analyses des séquences d'ADN- 18S et ITS). Une copie de chaque isolat sélectionné a été envoyé à la Mycothèque de Louvain la Neuve (Belgique) afin d'être complètement identifié.

3.5.1- Etude morphologique des isolats

Cette étape comprend tout d'abord l'étude de l'aspect macroscopique, qui consiste à observer à l'œil nu la croissance, la couleur des colonies et sa variation en fonction du temps, la texture de la surface, la couleur du revers des boîtes et le changement de la couleur du milieu utilisé (Camille, 2007).

Ensuite, une observation sous microscopique a été effectuée après avoir fait une coloration au lactophénol bleu coton (Annexe 3) selon la méthode de Chabasse *et al.* (2002) et Youcef Ali (2014), qui consiste à déposer une goutte du colorant sur une lame propre, ensuite, une bouture mycélienne prélevée, délicatement, à partir d'une colonie âgée de 7 jours est étalée à l'aide d'une anse sur la lame. Cette dernière est ensuite séchée à l'air, à proximité d'un bec bunsen, puis fixée par la chaleur en la passant deux ou trois fois sur la flamme. La préparation est recouverte avec une lamelle en évitant la formation de bulles d'air. Enfin, l'observation a

été faite successivement au microscope optique aux différents grossissements du microscope (GX4, GX10, GX40), et par immersion à (GX100). Les caractéristiques prises en considération dans cette technique sont la nature du filament, la fructification, la morphologie des spores et la présence de structures particulières comme les sclérotés.

3.5.2- Etude moléculaire des isolats sélectionnés

Dans un premier temps, des échantillons d'isolats fongiques sélectionnés ont été envoyés à la mycothèque de l'université de Louvain- Laneuve (Belgique) afin d'être identifiés en analysant de séquences d'ADN 18-S.

Ensuite, une identification par analyse des séquences ITS a été effectuée sur les isolats n'ayant pas été identifiés complètement, ces analyses ont été réalisées au niveau du Laboratoire des Microorganismes et Biomolécules Actives (LMBA), Tunisie, selon un protocole comprenant les étapes suivantes:

3.5.2.1- *Extraction d'ADN*

Des tubes Eppendorf de 1,5 ml sont remplis au tiers avec du mycélium fongique qui a été prélevé en grattant superficiellement de manière à éviter le risque de prendre de la gélose. Un volume de 500 µl de tampon de lyse (annexe 2) a été ajouté au broyat. Après homogénéisation du mélange avec une pince en bois, le mélange a été mis en incubation pendant 1 heure à température ambiante. Ensuite, 150µl de solution tampon de potassium d'acétate ont été ajoutés au mélange puis centrifugé à 12000 rpm pendant 8min.

Les protéines sont ensuite éliminées par un traitement au Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique (volume égal à celui du tampon de lyse). Le surnageant a été transféré dans un nouvel eppendorf (environ 400µl) et afin de précipiter L'ADN et pas les polysaccharides, 10% (40 µl) d'acétate de sodium (3 M à pH 8) et (216 µl) d'isopropanol ont été additionnés. Les eppendorfs ont été ensuite agités par inversion (environ 10 fois) et conservés à -20°C pendant toute une nuit. Après centrifugation (3min à 12000g), le surnageant a été écarté et le culot d'ADN est rincé avec 300 µl d'éthanol 70 %. Le culot a été repris dans 300 µl de tampon TE après centrifugation, puis placé à 65°C jusqu'à dissolution complète. L'ADN dissout est traité avec 3 µl de ribonucléase A (concentration finale: 100 µg/ml) pendant 1 heure à 37 °C. L'ADN est ensuite précipité de nouveau avec 30 µl d'acétate de sodium (3 M, pH 8) en présence de 600 µl d'éthanol pur (conservé à -20°C), le culot est rincé avec 300 µl d'éthanol 70 % puis séché au " Speed vac " pendant 15 à 20 min. L'ADN est ensuite repris dans 100 µl de TE, maintenu une nuit à 4°C (pour dissoudre l'ADN) pour enfin être conservé à -20°C.

3.5.2.2- Amplification de la région ITS par PCR

La technique de la PCR consiste en une amplification enzymatique in vitro d'un segment d'ADN, à l'aide d'amorces oligonucléotidiques qui sont complémentaires des séquences en 5' et 3' du segment à amplifier. Ce segment est recopié en plusieurs millions d'exemplaires par une série de réactions successives. Cette technique est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermorésistante (Taq DNA polymérase) isolée à l'origine d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus*. Cette enzyme a un optimum d'activité pour une température se situant entre 70°C et 80°C et peut supporter des températures allant jusqu'à 96°C.

La réaction d'amplification nécessite, outre la présence de l'ADN utilisé comme matrice et la Taq polymérase, l'utilisation de deux oligonucléotides (amorces) qui s'hybrident avec les séquences situées aux extrémités 5' de la zone à amplifier, et des déoxynucléotides triphosphates (dCTP, dGTP, dATP, dTTP) nécessaires à la synthèse de nouveaux brins d'ADN. La réaction d'amplification s'opère au cours d'une succession de cycles de températures sur le mélange réactionnel adéquat. Un cycle d'amplification est composé de trois étapes :

- Dénaturation de l'ADN bicaténaire à amplifier (92°C - 95°C)
- Hybridation ou appariement des amorces sur la région complémentaire (varie selon les T_m des amorces).
- Extension ou polymérisation à partir des amorces des brins d'ADN.

Environ 30 cycles d'amplification sont effectués et chaque cycle permet le doublement de la quantité d'ADN à amplifier, entraînant une accumulation exponentielle de l'ADN amplifié de 2ⁿ; (n étant le nombre de cycle d'amplification).

Dans ce travail, la PCR a été adoptée afin d'amplifier les ITS (Internal Transcribed Spacer ou espaceurs internes transcrits) de l'unité ribosomique des différentes souches.

Deux amorces universelles ITS1 et ITS4 ont été utilisées, il s'agit de:

ITS1: **TCCGTAGGTGAACCTGCGG** (T_m= 58°C)

ITS4: **TCCTCCGCTTATTGATATGC** (T_m=65°C)

➤ Protocole de la réaction PCR

La réaction d'amplification a été faite dans un volume final de 25 µl du mélange suivant:

- Tampon de la réaction IOX 5 µl
- Tampon Mg 1.5 µl
- une solution de différents désoxyribonucléotides triphosphates se composant de:

-dNTPs (10 mM)	0.3 µl
- ITS1 (20 pmoles/µl)	0.5 µl
- ITS4 (20 pmoles/µl)	0.5 µl
- H ₂ O ultra pure	17.5 µl
- Taq polymérase	0.22 µl
- ADN	1 µl

Dans un premier temps un mélange est réalisé pour un nombre de tubes, puis réparti à raison de 23 µl/tube. L'ADN (2 µl) est ajouté en dernier au mélange réactionnel.

Les cycles de température ou bien la réaction d'amplification proprement dite est effectuée grâce à différents cycles de température réalisés sur un thermocycle.

Un premier cycle consiste à dénaturer l'ADN: 95°C pendant 5 minutes, puis suit une série de 30 cycles, chaque cycle se déroulant de la manière suivante:

95°C pendant 30 secondes, Dénaturation.

55°C pendant 30 secondes, Hybridation des amorces.

72°C pendant 1 minute, Extension ou polymérisation.

Ensuite suit un dernier cycle de 72°C pendant 15 minutes pour terminer la polymérisation.

3.5.2.3- *Electrophorèse des acides nucléiques*

Afin de vérifier la qualité des produits d'amplification, ces derniers sont séparés par électrophorèse sur un gel horizontal d'agarose à 1.5% pendant 2h 30 à 3h sous 120 volts, préparé dans du tampon TBE (40 mM Tris acetate 1 mM EDTA, pH 8.0) additionné de 3µl de Bromure d'éthidium (1µl/20 ml de gel). Les bandes amplifiées sont visualisées sous UV (312 nm). La taille des différents fragments est déterminée à l'aide de marqueurs de poids moléculaire.

3.5.2.4- *Analyse bio-informatique des séquences nucléotidiques*

La comparaison des séquences avec celles des bases de données a été réalisée via l'algorithme BLAST. Les alignements des séquences nucléotidiques ont été réalisés grâce au logiciel Chromas.

3.6- Production de laccase sur milieu submergé

3.6.1- Production de laccase sur différents milieux

Afin de sélectionner le milieu le plus adéquat à la production de laccase, les souches sélectionnées, comme étant laccase positive, ont été cultivées sur trois différents milieux, à savoir: Potato Dextrose Bouillon (PDB), Malt Extrat Broth (MEB) et le milieu Olga (Annexe 1). L'inoculation a été effectuée selon la méthode de Yeşilada *et al.* (2014) avec légères modifications. En effet, cinq disques de 0.5 cm de diamètre de chaque souche sélectionnée ont été inoculés dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 150ml de chaque milieu de culture stérile à pH 6. L'incubation a été réalisée à 30°C dans un bain marie agité à 120 rpm jusqu'à l'obtention de l'optimum de l'activité laccasique sécrétée par chaque souche. Après incubation, et afin d'obtenir un extrait brut contenant la laccase, la biomasse a été séparée aseptiquement par filtration sur papier Wattman N°1, le filtrat est conservé à 4°C pour une utilisation ultérieure.

➤ Dosage de l'activité laccasique

Le dosage de l'activité laccasique a été effectué selon le protocole gentiment donné par Centre Wallon de Biologie Industrielle, Belgique (CWBI) avec légères modifications. La détermination spectrophotométrique dans le visible des produits de l'oxydation d'un substrat phénolique a été mise en œuvre. Pour ce faire, l'ABTS a été choisi comme substrat. Une courbe d'étalonnage a été réalisée. L'activité enzymatique des laccases a été dosée à 30°C en utilisant 100µl de l'extrait enzymatique additionné d'un (1) ml de milieu réactionnel (Annexe 2). La variation de la densité optique au spectrophotomètre à 420 nm a été suivie pendant 1 minute, avec un coefficient d'extinction moléculaire $\epsilon = 34450\text{m}^{-1}\text{cm}^{-1}$, et l'activité enzymatique est exprimée ici par $\mu\text{mol. min.L}^{-1}$, calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Activité} = (\text{Abs en 1min}) * V/v. t. \epsilon_{ABTS} (\mu\text{mol. Min.L}^{-1}), \text{ où :}$$

- V : volume total;
- v : volume de l'échantillon;
- t : temps d'incubation;
- ϵ d'ABTS : 34450.

3.6.2- Production de laccase en Erlenmeyer (500 ml)

Cette étape consiste à suivre la production de la laccase et la croissance des souches sélectionnées au fil des jours. Pour ce faire, les souches ont été cultivées dans des erlenmeyers

de 500ml contenant 150 ml du milieu ayant donné l'optimum de l'activité laccasique (Section 3.6.1). Les erlenmeyers ont étéensemencés par des disques et puis incubés à 30°C sous agitation (120 rpm). Un échantillon a été prélevé chaque jour afin d'estimer la laccase produite et le poids sec correspondant à la biomasse fongique. Ce dernier est estimé en séchant la biomasse récupérée sur papier Wattman N°1 au four dessiccateur (Kalra *et al.*, 2013).

3.7- Production de laccase en fermenteur de 20L

Cette étape a été mise en œuvre afin de mettre en évidence la capacité des souches sélectionnées à produire la laccase à échelle grandissant (*scale-up*).

3.7.1- Culture en fermenteur

Le milieu ayant donné la meilleure activité laccasique dans la section (3.6) a été choisi comme substrat pour la production de l'enzyme en fermenteur. Une fois préparé, le milieu est versé dans le fermenteur de 20L, à raison de 16 litres de volume réactionnel. Après étalonnage de la sonde pH et placement des autres sondes (T°, oxygène dissous), une stérilisation du fermenteur a été effectuée à 121°C pendant 20 minutes. Ensuite, les paramètres de la fermentation ont été réglés : Le pH a été ajusté et maintenu à 5.8 et la température est fixée à 30°C, avec une vitesse d'agitation de 120 rpm et une aération de 1 vvm d'oxygène dissous (Destain, 1998; Bataiche, 2014).

Le fermenteur a été inoculé par une pré-culture préparée comme suit : Les souches sélectionnées ont été repiquées sur milieu MEA et incubées à 30°C pendant 7 jours. Cinq disques de chaque souche ont été prélevés etensemencés dans des fioles de 500ml contenant 200ml du milieu PDB. Ces fioles ont été incubées à 30°C pendant 48h pour, ensuite, être transférées dans un erlenmeyer de 2L contenant 500ml de PDB qui a servi d'inoculum du fermenteur de 20L après incubation pendant 48h (Savitha *et al.*, 2011).

3.7.2- Conduite de la fermentation

Tous les paramètres ont été suivis par le système contrôle-commande. Un échantillonnage a été effectué chaque 24h, afin d'estimer l'activité laccasique. Pour rappel, la fermentation a duré 15 jours. L'échantillon a subi une centrifugation à 10000 x g pendant 30 minutes à 4°C, et le surnageant a servi pour mesurer l'activité laccasique extracellulaire (Gys, 2007).

3.8- Semi- purification de laccase

Cette étape avait pour but de purifier partiellement l'enzyme recherchée en passant par l'extrait brut concentré de cette enzyme. Pour ce faire, une concentration de 4M de sulfate d'ammonium a été additionnée au surnageant afin d'acquérir une saturation finale de 80%. le précipité a été collecté par centrifugation à 10000 g pendant 30 minutes à 4°C (Majolagbe *et al.*, 2013). Ensuite, l'extrait obtenu a été filtré à l'aide d'une pompe, à travers une membrane millipore dotée d'une cartouche de 10kD, ce qui permet de concentrer l'enzyme recherchée. A la fin de l'ultrafiltration, les extraits bruts concentrés obtenus ont été conservés à 4°C dans des falcons de 10 ml pour des utilisations ultérieures (Gys, 2007).

3.9- Caractérisation partielle de la laccase

3.9.1- Electrophorèse Native Page

Cette étape a été réalisée selon le protocole établi par Sathishkumar *et al.* (2010) au laboratoire de Biochimie Génétique et Biotechnologies Végétales « GBBV » (Université des Frères Mentouri- Constantine). Afin d'identifier le nombre d'isoenzymes de laccase produites. Les extraits bruts contenant l'enzyme ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant (10%), préparé selon le protocole de « GBBV ». Pour l'analyse de zymogramme, le gel a été incubé dans du tampon acétate de sodium 100 mM à pH 5 avec 10 mM de gâiacol, ce qui va permettre de détecter et de confirmer la présence de l'activité laccasique.

3.10.3.1- Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique

L'effet du pH et de la température sur l'activité laccasique ont été étudiés, l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 420nm et le dosage est effectué comme il a été mentionné au paravent, en utilisant l'ABTS comme substrat. L'optimum de l'activité laccasique est considéré comme 100% de l'activité relative.

3.9.2.1- Effet du pH sur la laccase

Cette étape a été déterminée suivant la méthode de Xia *et al.* (2013), avec quelques modifications. Elle consiste à mesurer l'absorbance du milieu réactionnel contenant 100µl d'extrait enzymatique, le tout est dissous dans des tampons à différents pH allant de 2.0 à 8.0.

Ces derniers ont été obtenus en utilisant le tampon d'acétate de sodium (3.0-6.0) et le tampon de phosphate de sodium (6.0-8.0) (Annexe 2).

3.9.2.2- Effet de la température sur la laccase

Cette étape a été effectuée selon la méthode de Wang *et al.* (2013) légèrement modifiée. Elle consiste à mesurer l'absorbance du milieu réactionnel à pH 5.5, incubé pendant 15 minutes à des températures qui varient entre 15°C et 85°C avec un intervalle de 10°C.

3.10- Applications biotechnologiques

3.10.1- Production de laccase sur milieux composés de déchets

Cette étape a pour but de tester la capacité des souches sélectionnées à produire de la laccase sur différents milieux composés de déchets. Pour ce faire, plusieurs substrats ont été utilisés, à savoir : la peau, les pépins et les fibres de citrouille ; le son du blé ; l'avoine ; la sciure de bois ; les grignons d'olives ; les feuilles du pommier ; les feuilles du raisin et les feuilles du melia.

En effet, les déchets ont été séchés à l'ombre, pendant 20 jours puis broyés à l'aide d'un moulin électrique ménager de manière à obtenir une poudre. Ce test a été réalisé dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 150ml de milieu de culture à 2% de chaque substrat, le pH est ensuite ajusté à 5.5 par du HCl (0.1M) ou du NaOH (0.1 M). Ensuite, les erlenmeyers ont été stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes pour enfin, être inoculés par trois disques de 0.5cm de diamètre de chaque souche dans chaque Erlenmeyer. L'incubation a été réalisée à 30°C sous agitation de 120 rpm dans un incubateur agité. Un dosage de l'activité laccasique est effectué chaque jour jusqu'à l'obtention de son optimum.

3.10.2- Production de laccase sur milieux composés de déchets de citrouille

L'objectif de cette étude est la mise en évidence de l'activité laccasique produite sur milieu à base de déchets de citrouille par les souches fongiques sélectionnées comme étant productrices de laccase.

3.10.2.1- Test de développement des souches fongiques sur milieux solides à base de déchets de citrouille

➤ Préparation du substrat

Le milieu de culture a été préparé selon la méthode modifiée de Sathishkumar *et al.* (2010) à partir de déchets de citrouille composé séparément : de feuilles, de tiges, de fibres, de peau et

de pépins. Plusieurs concentrations ont été préparées (2%,5%,7%) et 2% d'agar a été additionné à chaque substrat : le substrat1 (S1) représente un mélange de peau, de fibres et de pépins de citrouille, le substrat 2 (S2) est un mélange de tiges avec des feuilles, alors que le substrat 3 (S3) représente un mélange de substrat 1 et de substrat 2 (50/50). Le pH des milieux a été ajusté à 6 et ce, par l'ajout de HCl (0.1M). Les milieux préparés ont été ensuite stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 15minutes.

➤ ***inoculation***

L'ensemencement a été réalisé par repiquage d'une bouture d'hyphe terminal de chaque souche au centre du milieu gélosé. L'incubation des boîtes de Pétri est réalisée à 30C° jusqu'à apparition d'un développement mycélien.

3.10.2.2- *Test de production de laccase sur milieux solides à base de déchets de citrouille*

Ce test a pour but de démontrer la capacité des souches fongiques à produire de la laccase sur milieu solide en utilisant les déchets de citrouille comme étant la seule source de carbone et d'azote. Pour ce faire, les souches sélectionnées ont été ensemencées par la méthode de disques sur les milieux S1, S2 et S3 préparés comme il a été expliqué dans la section précédente, 0.01% du gaïacol a été additionné à chaque milieu afin de permettre la révélation de l'enzyme. L'incubation a été effectuée à 30°C pendant 7 jours. L'apparition d'un halo rouge bordeaux est considérée comme une réaction positive (Viswanath *et al.*, 2008).

3.10.2.3- *Production de laccase sur milieu submergé à base de déchets de citrouille*

Après avoir mis en évidence l'activité laccasique sur milieu solide à base de déchets de citrouille, une production de laccase en milieu liquide de la même nature a été effectuée. La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyers contenant le milieu à base de déchet de citrouille sélectionné pour chaque souche. Après agitation pendant 10 minutes, le pH du milieu a été ajusté à 6 avec du HCl (0.1 M). Les milieux sont répartis en erlenmeyers de 500 ml contenant 150 ml de milieu. Après stérilisation à 120°C pendant 15 min, les Erlens ont été inoculés, puis incubés à 30°C pendant 15 jours.

3.10.3- *Dégradation des colorants synthétiques par la laccase*

L'objectif de cette partie est la mise en évidence d'un intérêt biotechnologique de laccase secrétée par des souches fongiques, en l'occurrence la dégradation des colorants synthétiques, à savoir, ceux utilisés dans l'industrie du textile.

3.10.3.2- *Etude de la dégradation des colorants*

➤ *Test de dégradation de colorants sur milieu solide*

Ce test a pour but de mettre en évidence la dégradation de quelques colorants utilisés dans l'industrie du textile par les souches sélectionnées comme étant productrices de la laccase. Pour ce faire, la méthode de Bazanella *et al.* (2013) a été employée avec quelques modifications. Cinq colorants ont été choisis, à savoir : Le Rouge Congo, le Vert de Malachite, le Bleu Bromothymol; le Tétracoton rouge 6B, BASF.FBB-coll et le Lb4GF coll 28883641 qui ont été gentiment fournis par le complexe du textile de Chabet ersas (Constantine). En effet, les souches fongiques ont étéensemencées par la méthode de disques sur gélose MEA additionnée des différents colorants ajoutés après avoir été filtrés par des micro-filtres de 0.45- μ m de cellulose nitrate. Pour chaque colorant, différentes concentrations ont été testées (50ppm, 100m, 150ppm, 200pm et 250ppm). L'incubation a été effectuée à 30°C et afin d'observer un éventuel changement de la couleur du milieu, la lecture peut aller jusqu'à 30 jours.

➤ *Test de dégradation de colorants sur milieu liquide*

La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyers de 1000 ml contenant 250ml du milieu MEB additionné des colorants qui ont donné un résultat positif dans la section précédente, avec des concentrations variantes, allant de 50ppm à 250ppm, avec un intervalle de 50ppm. L'inoculation a été faite avec 5 disques gélosés de 0.5 cm de diamètre de chaque souche, l'incubation a été effectuée à 30°C jusqu'à l'obtention de l'optimum de l'activité laccasique. A la fin de la fermentation, une filtration sur papier Wattman 1 a été effectuée pour chaque erlenmeyer et ce, afin de récupérer l'extrait brut supposé contenir la laccase, ensuite, des échantillons ont été prélevés à l'aide d'une micropipette et versés dans des tubes de conservation afin d'être conservés à 4°C pour des utilisations ultérieures.

3.10.3.3- *Analyse de la dégradation des colorants*

➤ *Analyse par spectrophotométrie*

Afin d'étudier une éventuelle dégradation des colorants testés par la laccase, une analyse spectrophotométrique a été réalisée sur les échantillons issus de la fermentation ayant donné l'optimum de l'activité laccasique sécrétée par les souches testées. Cette étape est réalisée avec un spectrophotomètre à balayage (UV/Visible) de 350nm jusqu'à 800nm (Shimadzu), en surveillant la longueur d'onde d'absorbance maximale pour chaque colorant. Le blanc a été

préparé à partir du même échantillon pour chaque colorant, en inhibant l'activité enzymatique (Bazanella *et al.*, 2013).

➤ **Analyse par HPLC**

- Rouge Congo

Cette méthode est réalisée par HPLC (JASCO) dont la colonne est en phase inversée (C18.5µm 250 mm x 4.6mm). La phase mobile est constituée d'un mélange eau-acétonitrile 50:50 v/v, distribuée avec un débit de 20µl/min, la lecture est enregistrée à une longueur d'onde de 498 nm utilisant un détecteur UV/V.

- Vert de Malachite

L'analyse de la dégradation du Vert de Malachite a été réalisée par HPLC (JASCO) dont la colonne est en phase inversée (C18.5µm 300 mm x 4.6 mm); une phase mobile composée d'un mélange eau- acétonitrile additionné de 0.1% acide formique (40v/60v) a été employée, avec un débit de 10µl/min. La détection est effectuée à 623 nm (Naoto, 2014).

3.10.3.4- Dégradation directe des colorants par la laccase

Cette étape consiste à tester la capacité d'un extrait laccasique à dégrader directement les colorants. Pour ce faire, les extraits laccasiques issus de la culture en Erlenmeyers (500ml) des souches sélectionnées ont été utilisés (Section 3.6.2). Ce test a été effectué selon la méthode de Rehan *et al.* (2016) avec quelques modifications et qui consiste à prendre 1 ml de chaque colorant sélectionné (150ppm) dont lequel 350µl d'extrait enzymatique partiellement purifié de chaque souche a été additionné, pour ensuite être incubé à différents temps d'incubation allant de 5 minutes à 60 minutes avec un intervalle de 5 minutes. Le blanc a été préparé en mettant le tampon d'acétate (pH 5.5) à la place de l'extrait enzymatique. L'absorption de chaque colorant a été mesurée par spectrophotomètre selon sa propre longueur d'onde. L'efficacité de la décoloration est exprimée en pourcentage de décoloration (%).

Décoloration (%) = Absorbance initiale - Absorbance observée x 100 / Absorbance initiale

Résultats

4- Résultats

Le présent travail porte sur l'isolement et la sélection de souches fongiques productrices de laccase à partir des forêts situées à l'Est Algérien et la mise en évidence d'un intérêt biotechnologique de la laccase produite.

Pour rappel, les prospections ont été réalisées à partir de trois sites: Parc national de Belezma (Batna), forêt de Kenouaâ située à Collo (Skikda) et la forêt de Chettaba située à Ain Smara (Constantine).

4.1- Isolement des mycètes

L'isolement effectué sur milieux PDA (Potato Dextrose Agar) et Sabouraud a permis de collectionner 51 isolats fongiques répartis comme suit ; 12 isolats obtenus à partir de l'échantillon prélevé de la forêt de Chettaba (Constantine), 16 autres à partir de l'échantillon issu de la forêt de Belezma, alors que la forêt de Kenouaâ située à Collo a fourni 23 isolats. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 3.

Tableau 3 Isolement et purification des isolats fongiques isolés à partir de différentes forêts

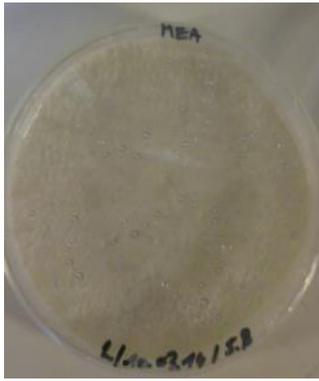
Echantillons	Provenance des échantillons	Nombre d'isolats fongiques obtenus
Sol	Chettaba	9
	Belezma	13
	Kenouaâ	21
Tronc d'arbre	Chettaba	3
	Belezma	3
	Kenouaâ	2
		Total : 51

4.2- Sélection des isolats producteurs de laccase

L'activité laccasique des isolats fongiques a été mise en évidence sur milieu Olga additionné de gaïacol. Après 7 jours d'incubation à 30°C, l'apparition d'un halo rouge bordeaux est observé sur trois isolats, ce qui est considéré comme une réaction positive résultant de l'oxydation du gaïacol. Les résultats présentés dans le tableau 4 révèlent que trois isolats ont montré une activité laccasique en présentant une couleur rouge brunâtre à l'emplacement des

colonies. Deux isolats provenant de la forêt de Chettaba (Constantine), **P4** isolé à partir du sol rhizosphérique et l'isolat **L** obtenu à partir d'un tronc d'arbre, et l'isolat **D** est pris à partir d'un tronc d'arbre récolté à la forêt de Belezma (Batna).

Tableau 4 Isolats montrant une activité laccasique et leurs aspects macroscopiques

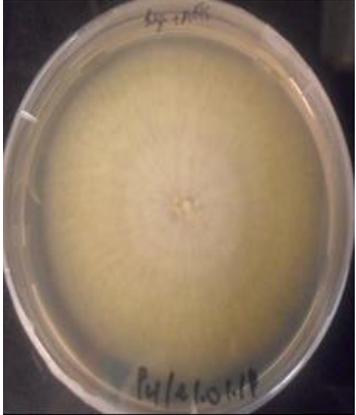
	P4	L	D
Aspect macroscopique			
Laccase positive			

4.3- Identification des isolats sélectionnés

4.3.1- Identification morphologique des isolats

L'aspect macroscopique de chaque isolat sélectionné comme étant laccase positif est montré dans le tableau 5. En effet, les résultats montrent que les isolats **P4**, **L** et **D** sont des mycètes filamenteux (moisissures), leur description est récapitulée dans ledit tableau. L'observation microscopique n'a pas été concluante et ce, par l'absence de spores ou de critères caractéristiques aux différents isolats, cependant, le mycélium septé a été observé chez les différents isolats.

Tableau 5 Aspects macroscopiques des isolats fongiques sélectionnés

Isolats	Description	Aspects des boîtes
P4	Forme ronde régulière, couleur vert clair, texture filamenteuse, plate.	
L	Envahit, en excès, toute la boîte, blanche de couleur, avec une texture poudreuse.	
D	Envahit toute la boîte, se développant sur les extrémités de la boîte, avec une texture cotonneuse avec un centre transparent.	

L'analyse morphologique de ces isolats à la mycothèque de l'université de Louvain-la Neuve (Belgique) (rapport en annexe) a permis d'identifier la souche **D** comme étant *Trichoderma longibrachiatum*. Quant aux deux autres souches, cette approche n'a pas été concluante, du fait, une identification par voie moléculaire s'avère nécessaire.

4.3.2- Identification moléculaire des isolats sélectionnés

L'identification des isolats fongiques **P4** et **L** a été réalisée à la mycothèque de Louvain-la-Neuve (Belgique). Les analyses des séquences d'ADN- 18S effectuées ont permis de conclure que la souche **L** est bien *Trametes versicolor* et que la souche **P4** s'agit de *Chaetomium sp.* (Rapport en annexe).

D'une autre part, l'analyse des séquences ITS réalisée au niveau du Laboratoire des Microorganismes et Biomolécules Actives (LMBA) (Tunisie), a permis d'identifier la souche P4 comme étant *Chaetomium globosum* (Annexe 3), enregistrée sous le numéro d'accèsion (KU702697) fourni par Gen-Bank.

4.4- Production de laccase sur milieu submergé

4.4.1- Production de laccase sur différents milieux

Cette étape consistait à cultiver les souches sélectionnées, comme étant laccase positives, sur trois différents milieux liquides (submergé) (PDB, MEB et Olga) afin de distinguer le milieu le plus adéquat pour la production de laccase et de sélectionner la souche la plus performante. Après incubation, la biomasse a été séparée aseptiquement par filtration sur papier Wattman N°1. Un extrait brut contenant la laccase sécrétée par chaque souche a été récupéré et l'activité laccasique a été dosée par spectrophotométrie.

Les résultats récapitulés dans la figure 13 révèlent que l'optimum de l'activité laccasique sécrétée par chaque souche est obtenu sur PDB (Potato Dextrose Broth), ainsi, une variabilité de production de l'enzyme en fonction des souches a été observée. En effet, *Trametes versicolor* s'avère la souche la plus performante avec une activité laccasique obtenue sur milieu PDB estimée à 1400U/L, suivi par *Chaetomium globosum* dont l'optimum de son activité laccasique est bien moindre que la première et évaluée à 550 U/L, enfin *Trichoderma longibrachiatum*, a produit l'activité laccasique la moins significative et estimée 356U/L.

Ces résultats ont permis de sélectionner deux souches pour le reste de ce travail, à savoir ; *Trametes versicolor*, en mentionnant qu'il est connu pour sa capacité à produire de la laccase et *Chaetomium globosum* qui a montré un rendement en enzyme qualifié de satisfaisant mais en revanche, très peu étudié sous cet angle.

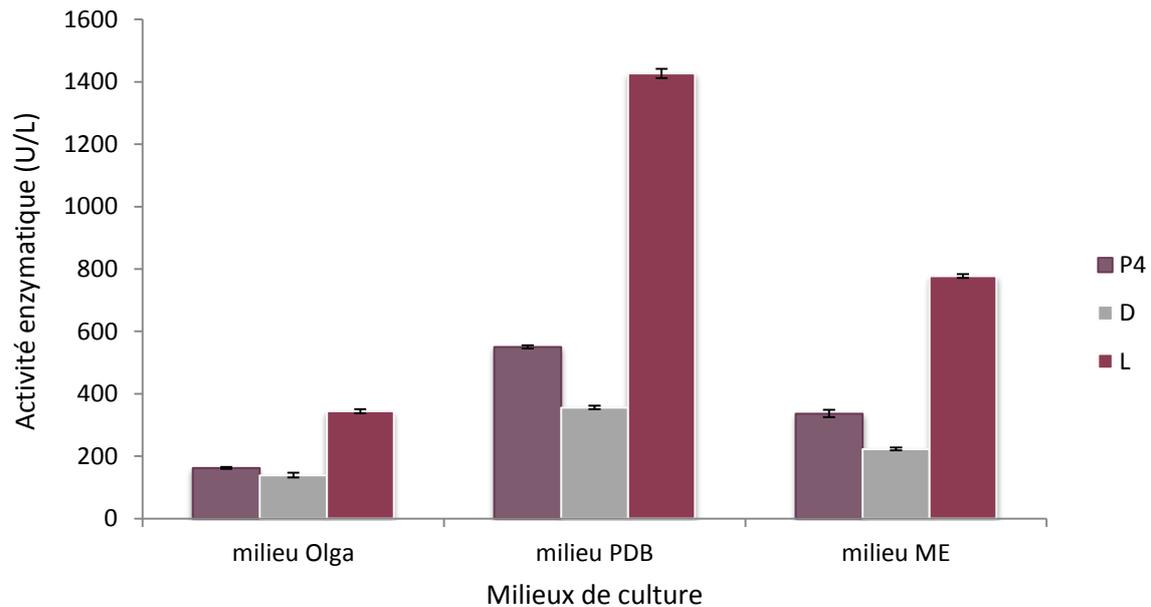


Figure 13 Evaluation de la production de laccase par les souches *Trametes versicolor* (L), *Trichoderma longibrachiatum* (D) et *Chaetomium globosum* (P4) sur différents milieux de culture.

4.4.2- Cinétique de production de laccase en Erlenmeyer (500 ml)

Cette étape a été réalisée afin de suivre la cinétique de production de la laccase et de la biomasse en fonction du temps. En effet, les résultats présentés par la figure 14 révèlent que la laccase produite par les deux souches sélectionnées est détectée dès le premier jour de fermentation avec une activité estimée à 189U/L pour *Trametes versicolor* et à 103U/L pour *Chaetomium globosum*. Ensuite, la laccase produite par les deux souches augmente progressivement en parallèle avec la biomasse jusqu'à atteindre la phase exponentielle. En effet, l'optimum de l'activité laccasique de *Trametes versicolor* est estimé à 1400U/L après 8 jours de fermentation, plus précisément lorsque la biomasse a atteint 6.1 g/L.

Par ailleurs, les résultats similaires sont observés sur l'activité enzymatique produite par *Chaetomium globosum* qui augmente de façon significative durant la phase exponentielle de la croissance pour atteindre son optimum estimé à 550U/L après 12 jours de fermentation quand la biomasse est de 5.25 g/L.

En revanche, il a été montré que lorsque les souches testées entrent en phase de déclin, l'activité laccasique diminue graduellement jusqu'à atteindre, après 15 jours de fermentation, une activité laccasique estimée à 238U/L pour *Trametes versicolor* et à 334U/L pour *Chaetomium globosum*.

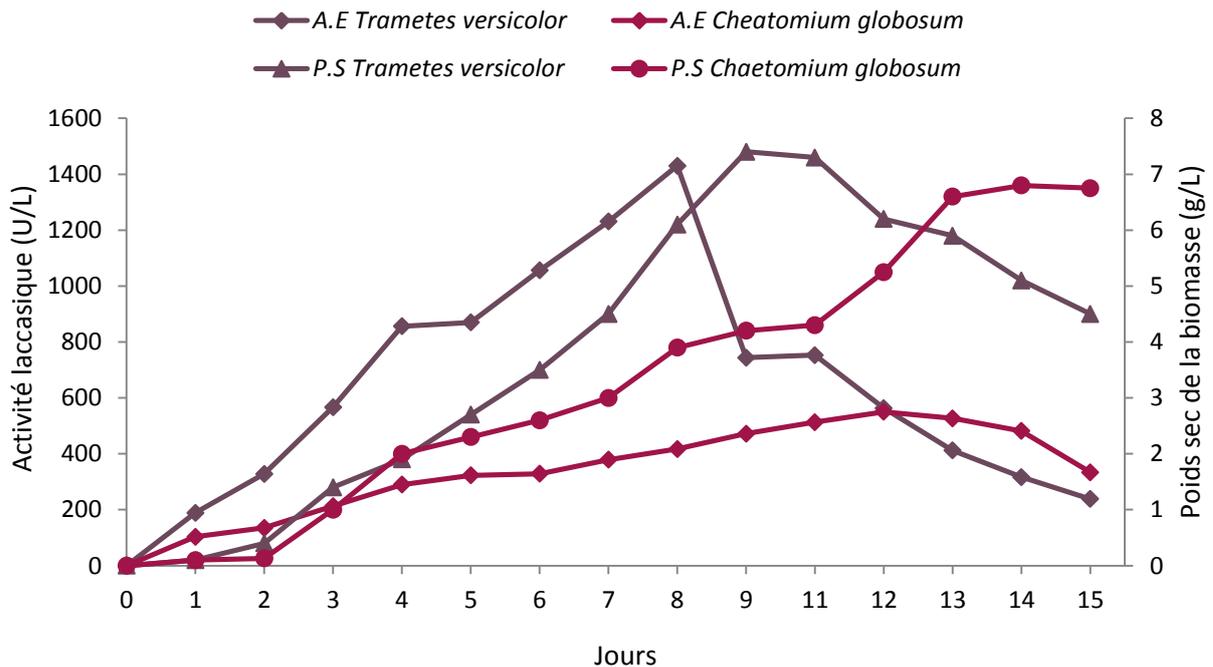


Figure 14 Cinétique de croissance de *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* et de production de laccase au cours de la fermentation en Erlenmeyer sur milieu PDB

4.5- Production de la laccase en fermenteur de 20L

La production de laccase par *Trametes versicolor* et par *Chaetomium globosum* a été réalisée dans un fermenteur de 20 L (grade pilote) en utilisant le milieu PDB (Potato Dextrose Broth). Un prélèvement a été effectué chaque 24 h afin d'estimer la laccase produite.

Les résultats obtenus pour chaque souche, récapitulés dans la figure 15, montrent que la production de laccase en fermenteur diffère de celle produite en Erlenmeyers. En effet, le suivi de la laccase produite en fermenteur par *Trametes versicolor* a montré la présence d'une activité laccasique juste après 24 h de fermentation estimée à 160U/L; ensuite, une augmentation progressive de cette activité est observée au fil des jours, jusqu'à atteindre son maximum de 833U/L au bout du huitième jour, en constatant que cette activité est nettement inférieure à celle obtenue en Erlenmeyers (1400U/L). Après 10 jours de fermentation une diminution considérable de l'activité enzymatique est notée (de 753U/L à 563U/L). Par ailleurs, l'activité laccasique sécrétée par *Chaetomium globosum* est détectée après 24 h d'incubation et commence progressivement à augmenter pour atteindre son maximum de 987U/L après 11 jours de fermentation, alors qu'en Erlenmeyers, un optimum de 550U/L a été estimé. Semblablement, une diminution de l'activité enzymatique a été observée après 12 jours d'incubation (de 878U/L à 423U/L). Ce résultat a permis de constater que

Chaetomium globosum est très performant en fermenteur et par conséquent, il répond très positivement aux exigences de scale-up. En outre, Il est intéressant de signaler ici que la biomasse n'a pas été mesurée car le mycélium se présentait sous forme de grosses pellettes, ce que ne permettait pas d'obtenir des valeurs cohérentes lorsque des petits volumes de milieu de fermentation ont été prélevés pour cet objectif.

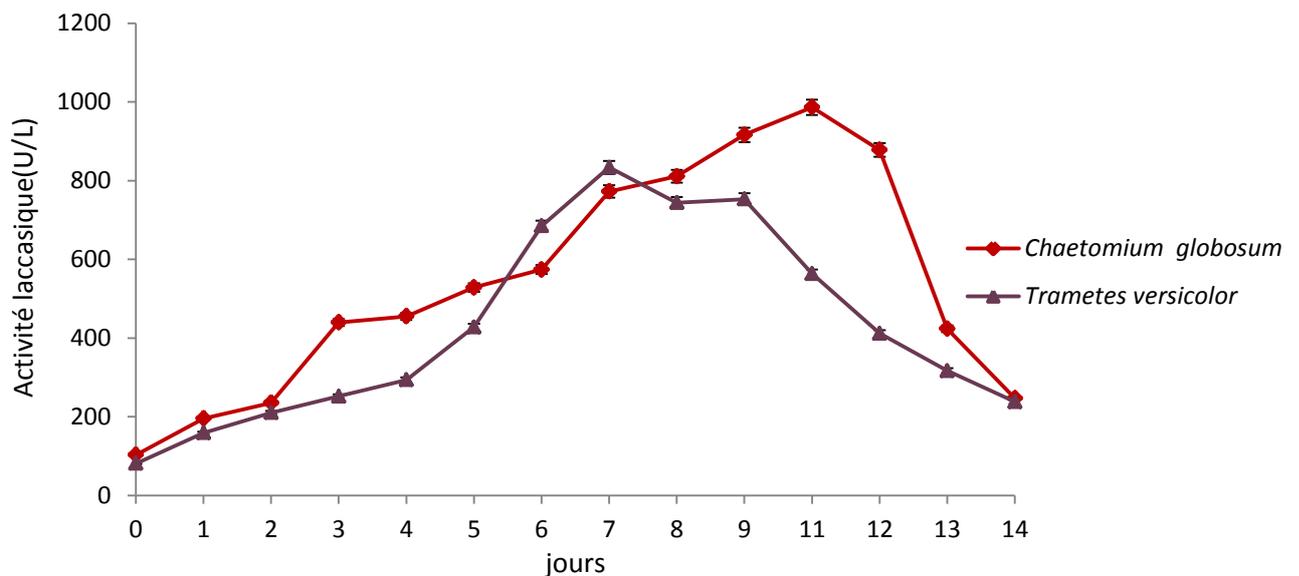


Figure 15 Evolution de la laccase produite par *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* au cours de la fermentation en fermenteur (20L)

4.6- Semi-purification de laccase

Après avoir séparé le surnageant issu de chaque fermentation de la biomasse par une centrifugation à $10000\times g$ à $4^{\circ}C$ pendant 30 minutes, une précipitation en sulfate d'ammonium a été effectuée. Cependant, les résultats récapitulés dans le tableau 6 montrent que cette méthode inhibe la laccase, car, une diminution de son activité enzymatique est observée sur les deux surnageants récupérés de la culture des deux souches sélectionnées (avec un rendement de 16% pour le filtrat de *Trametes versicolor* et de 21% pour le filtrat de *Chaetomium globosum*). Par ailleurs, l'utilisation de la méthode de l'ultrafiltration a permis de concentrer l'enzyme sans une perte considérable. En effet, sur le filtrat issu de *Trametes versicolor*, la laccase a été concentrée 6 fois en conservant 78% de son activité, alors que pour le filtrat issu de *Chaetomium globosum*, un rendement de 75% de l'activité laccasique a été estimé avec une concentration de 5 fois de l'enzyme (Tableau 6).

Tableau 6 Rendement de la laccase obtenue après précipitation en sulfate d'ammonium et concentration par ultrafiltration

	Précipitation en sulfate d'ammonium	poids initial (g)	A.E (U/ml)	A.E (U/V)	Rendement de laccase (%)
Filtrat de <i>T.versicolor</i>	surnageant avant précipitation	500	0,83	415	100,00
	Culot après précipitation	49,6	1,34	66,464	16,02
Filtrat de <i>C.globosum</i>	surnageant avant précipitation	500	0,98	490	100,00
	Culot après précipitation	57,3	1,83	104,859	21,40
Concentration par ultrafiltration					
Filtrat de <i>T.versicolor</i>	surnageant avant ultrafiltration	500	0,83	415	100,00
	Filtrat après ultrafiltration	80	4,05	324	78,07
Filtrat de <i>C.globosum</i>	surnageant avant ultrafiltration	500	0,98	490	100,00
	Filtrat après ultrafiltration	78,3	4,7	368,01	75,10

4.7- Caractérisation partielle de la laccase

4.7.1- Electrophorèse Native Page

Cette étape a pour but de confirmer la présence de laccase et ce, en oxydant le gaïacol qui joue le rôle d'un substrat, ce qui permet l'apparition d'une coloration rouge brunâtre. Les deux extraits supposés contenir la laccase ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant. Les résultats révélés dans la figure 16 représentent le zymogramme de l'enzyme recherchée. Ces résultats confirment la présence de laccase sécrétée par les deux souches. En effet, Après incubation, deux isoenzymes sont apparus pour l'extrait issu de la culture de *Trametes versicolor* Lac1(entre 100 et 150 KDa) et Lac2 (37 KDa), alors que l'extrait issu de la culture de *Chaetomium globosum* a permis l'obtention d'un seul isoenzyme Lac1(150 KDa). Cependant, la Lac 1 sécrétée par *Trametes versicolor* s'avérait plus concentrée que la Lac 2 et l'isoenzyme sécrétée par *Chaetomium globosum*.

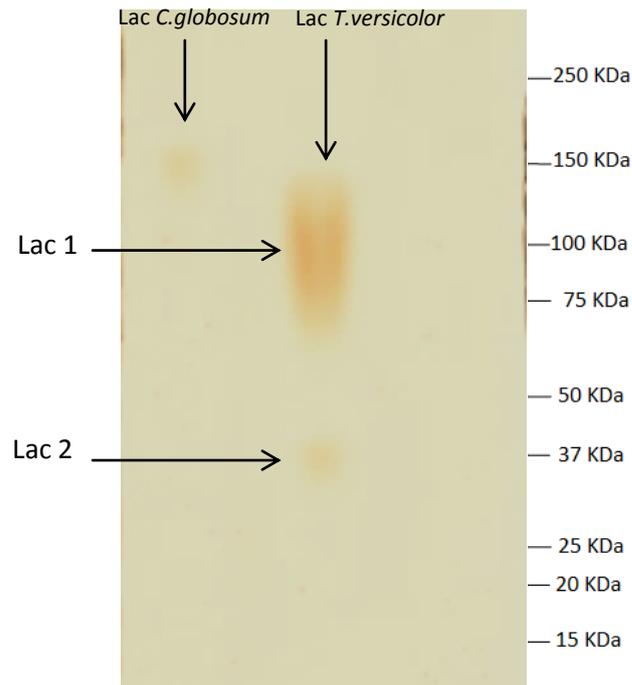


Figure 16 Zymogramme de la laccase de *Trametes versicolor* et de *Chaetomium globosum* sur gel d'électrophorèse Native page

4.7.2- Effet du pH et de la température sur l'activité laccasique

Les effets du pH et de la température sur l'activité laccasique ont été étudiés, l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 420nm et le dosage a été effectué comme mentionné au paravent en utilisant le substrat ABTS. L'optimum de l'activité laccasique est considéré comme 100% de l'activité relative.

4.7.2.1- Effet du pH sur la laccase

L'objectif de ce test est de déterminer l'effet du pH du mélange réactionnel sur l'activité enzymatique de la laccase. Les mesures du pH sont prises lorsque le mélange réactionnel est incubé à 30°C. Pour ce faire, plusieurs valeurs du pH comprises entre 2 et 8 sont testées.

Les résultats montrent que l'activité laccasique produite par *Chaetomium globosum* atteint son maximum à pH 5 et à pH 6, une diminution est, ensuite, observée tout en allant vers la zone d'alcalinité. Toutefois, Il a été observé que l'activité laccasique est plus importante dans la zone d'alcalinité (75% à pH 8) que celle obtenu au pH acide (58% à pH 3) (Figure 17).

Par ailleurs, il a été montré que l'optimum de l'activité laccasique sécrétée par *Trametes versicolor* est obtenu à pH 3 et que cette activité diminue graduellement tout en augmentant le pH (Figure 18).

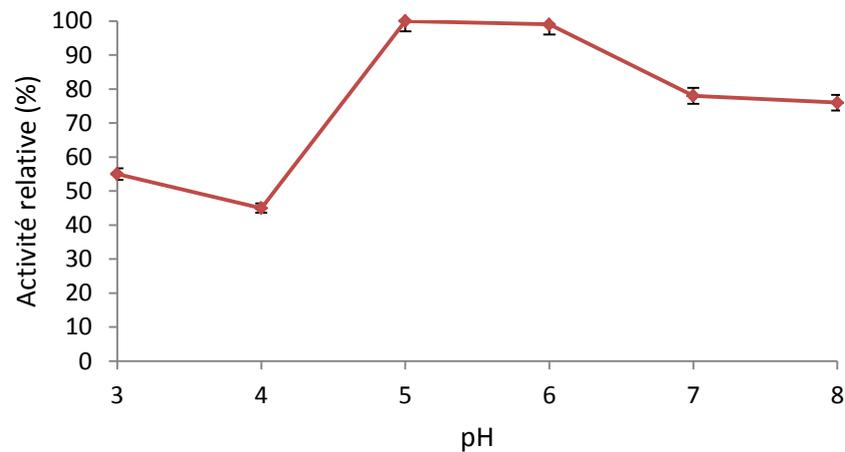


Figure 17 Effet du pH sur l'activité laccasique produite par *Chaetomium globosum*

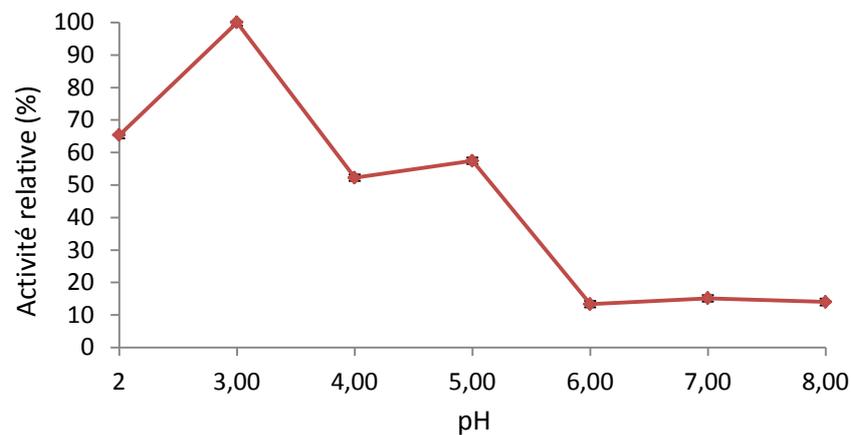


Figure 18 Effet du pH sur l'activité laccasique produite par *Trametes versicolor*

4.7.2.2- Effet de la température sur la laccase

Pour déterminer l'effet de la température sur la laccase produite, plusieurs températures sont testées, comprises entre 15°C et 85°C toute en effectuant les réactions à pH 5.5.

Il est remarquable que l'activité maximale de la laccase produite par *Chaetomium globosum* est enregistrée à température 35°C, en revanche, la plus faible activité est notée à 85°C avec une valeur de 34% (figure 19).

Par ailleurs, les résultats illustrés dans la figure 20 montrent que l'activité laccasique sécrétée par *Trametes versicolor* accroît en augmentant la température pour atteindre son maximum à 55°C pour, ensuite, diminuer jusqu'à son minimum ; représentant 10% de l'activité initiale.

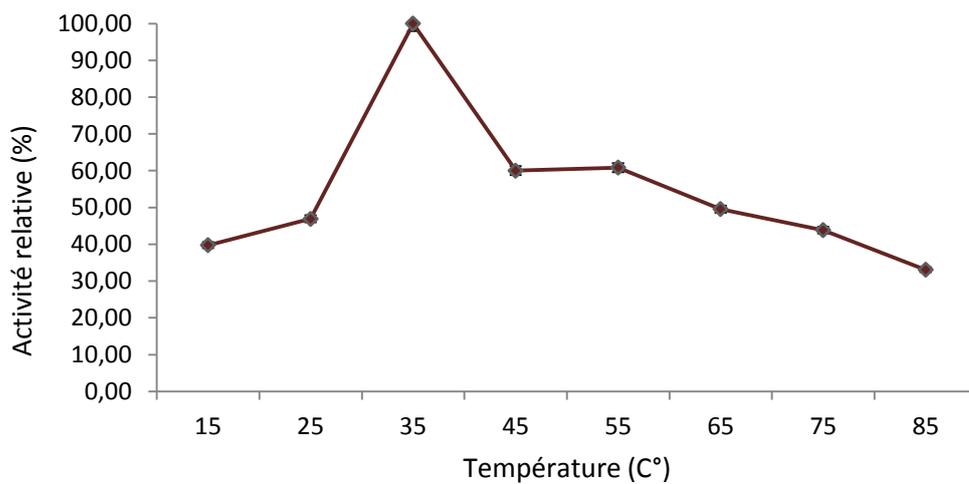


Figure 19 Effet de la température sur l'activité laccasique produite par *Chaetomium globosum*

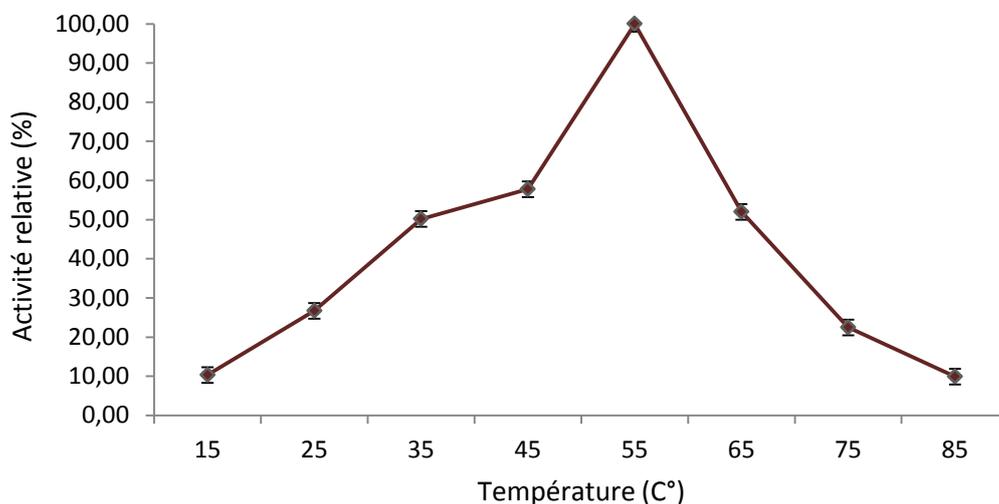


Figure 20 Effet de la température sur l'activité laccasique produite par *Trametes versicolor*

4.8- Applications Biotechnologiques

4.8.1- Production de laccase sur milieux composés de déchets

Cette étape a pour but de tester la capacité des souches sélectionnées à produire la laccase sur différents substrats à base de déchets et de les dégrader. Plusieurs substrats ont été testés, à savoir : les déchets de citrouille; le son du blé; l'avoine; la sciure de bois; les grignons d'olives; les feuilles du pommier; les feuilles du raisin et les feuilles du melia.

Les résultats exposés dans la figure 21 montrent que la laccase peut être produite sur tous les substrats, à l'exception de la sciure de bois où la sécrétion de laccase par les deux souches sélectionnées n'a pas été enregistrée. Par ailleurs, l'utilisation des déchets de citrouille comme substrat a permis de produire une activité laccasique importante (391 U/L par *Cheatomium*

globosum et 362 U/L par *Trametes versicolor*) en comparaison avec les autres substrats testés. En outre, l'activité laccasique sécrétée par *Chaetomium globosum* en utilisant l'avoine comme substrat est plus importante que celle produite par *Trametes versicolor* [282 /184 (U/L)], par ailleurs, les feuilles de pommiers ont permis de produire une activité laccasique par *Trametes versicolor* plus importante que celle produite par *Chaetomium globosum* [281/113(U/L)]. Ces résultats permettent de conclure que les souches fongiques *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* sont capables de produire de la laccase en utilisant comme seule source de carbone des milieux bon marché d'une part et peut être utilisées efficacement dans les procédés d'élimination des polluants à bases de la lignine d'autre part.

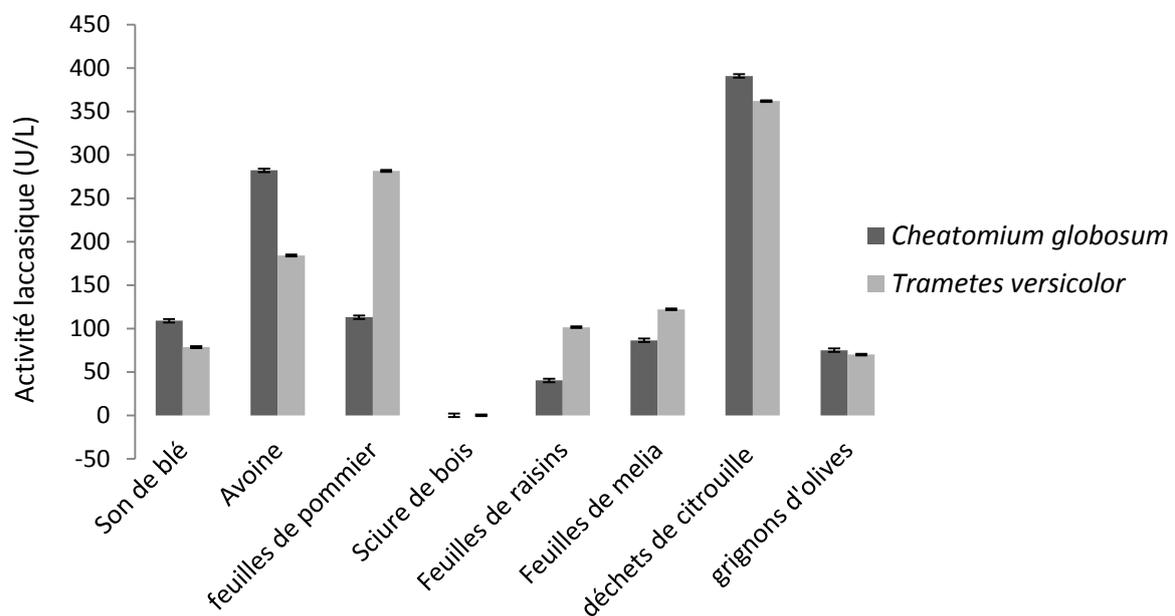


Figure 21 Production de laccase par *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* sur différents milieux à base de déchets

4.8.2- Production de laccase sur milieux composés de déchets de citrouille

Les résultats obtenus dans la section précédente ont permis de sélectionner les déchets de citrouille comme étant le substrat ayant donné l'optimum de l'activité laccasique sécrétée par les deux souches sélectionnées. De ce fait, une étude de la production de la laccase en utilisant les déchets de citrouille a été effectuée.

4.8.2.1- Test de développement des souches fongiques sur milieux solides à base de déchets de citrouille

Cette étude consistait à mettre en évidence la croissance de *Chaetomium globosum* et de *Trametes versicolor* sur trois milieux de culture à différentes concentrations (2%,5%,7%): Le substrat 1 (S1) représente un mélange de peau, de fibres et de pépins de citrouille ; le substrat 2 (S2) composé d'un mélange de tiges et de feuilles, alors que le substrat 3 (S3) est constitué d'un mélange de substrat 1 et de substrat 2 (50/50).

Les résultats présentés dans le tableau 7 montrent que, après 6 jours d'incubation, *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* peuvent utiliser les différents déchets de citrouilles testés comme étant seule source de carbone et d'azote pour leur croissance et ce même à faible concentration (2%). Cela a été illustré par leur capacité de se développer sur les trois milieux testés préparés à 2%. Par ailleurs, le milieu S2 qui est à base de feuilles et de tiges a permis d'observer une bonne croissance des deux souches par rapport aux autres milieux S1 et S3 (tableau 7).

Tableau 7 Développement de *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* sur les différents milieux de culture à base de déchets de citrouille préparés à 2%

Milieux Souches	S1	S2	S3
<i>Chaetomium globosum</i>			
<i>Trametes versicolor</i>			

4.8.2.2- Test de production de laccase sur milieux solides à base de déchets de citrouille

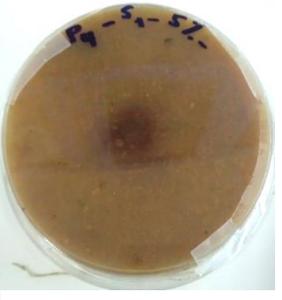
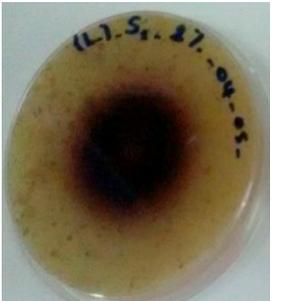
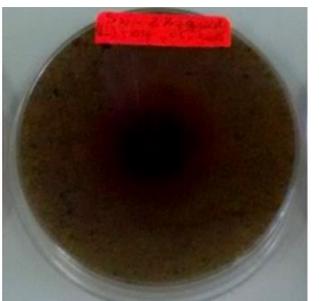
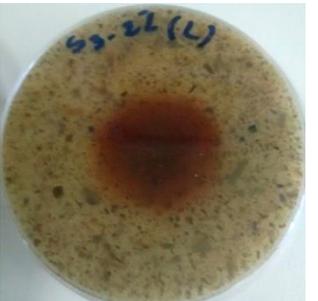
Ce test a pour but de démontrer la capacité de *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* à produire de la laccase sur milieux à base de déchets de citrouille à 2% et ce, en oxydant le gaïacol contenu dans le milieu.

Les résultats illustrés dans le tableau 8 montrent la présence d'une activité laccasique sur les trois milieux à base de déchets de citrouille testés, sécrétée par *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum*. Cette activité enzymatique est révélée par la présence d'une couronne rouge brunâtre autours des colonies résultant de l'oxydation du gaïacol par la laccase présente dans le milieu. Cependant, cette activité varie d'un milieu à l'autre. En effet, malgré la faible concentration du milieu (2%), le milieu S3 (mélange de S1 et de S2 (50/50)) a permis à *Chaetomium globosum* de révéler une zone rouge plus importante par rapport aux autres milieux (S1 et S2) correspondant au développement de *Chaetomium globosum*.

Par ailleurs, *Trametes versicolor* a développé une zone rouge brunâtre, correspondant à la présence de laccase, sur milieu S1 à 2% composé essentiellement de mélange de peau, de fibres et de pépins plus importante que celles produites sur milieux S2 (mélange de tiges et de feuilles) et sur milieu S3.

Ces résultats ont permis de sélectionner le milieu S3 pour *Chaetomium globosum* et S1 pour *Trametes versicolor*.

Tableau 8 Révélation de la présence de laccase sécrétée par *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* sur différents milieux à base de déchets de citrouille

Milieux Souches	S1 + Guaicol	S2 + Guaicol	S3 + Guaicol
<i>Chaetomium globosum</i>			
<i>Trametes versicolor</i>			

4.8.2.3- Production de laccase sur milieu submergé à base de déchets de citrouille

Cette étape a pour but de produire la laccase sur milieu liquide en utilisant les déchets de citrouille comme substrat.

Les résultats récapitulés dans la figure 22 montrent qu'en effet, la production de laccase par *Chaetomium globosum* a débuté dès le 3^{ème} jour (143U/L), ensuite, une augmentation progressive de l'activité laccasique est observée jusqu'à atteindre son maximum (400 U/L) au bout de 12 jours d'incubation, après cette période, l'activité laccasique commence à diminuer.

Par ailleurs, le profil cinétique de l'activité laccasique chez *Trametes versicolor* a révélé que cette activité a débuté au 2^{ème} jour (154U/L) et a progressé jusqu'à atteindre son maximum après 10 jours de fermentation (350 U/L). Après cette période l'activité enzymatique diminue.

Ces résultats permettent de conclure que les souches *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* peuvent sécréter une activité laccasique en Erlens sur milieux à base de déchets de citrouille presque équivalente à celle produite sur milieu favorable en l'occurrence Potato Dextrose Bouillon (PDB).

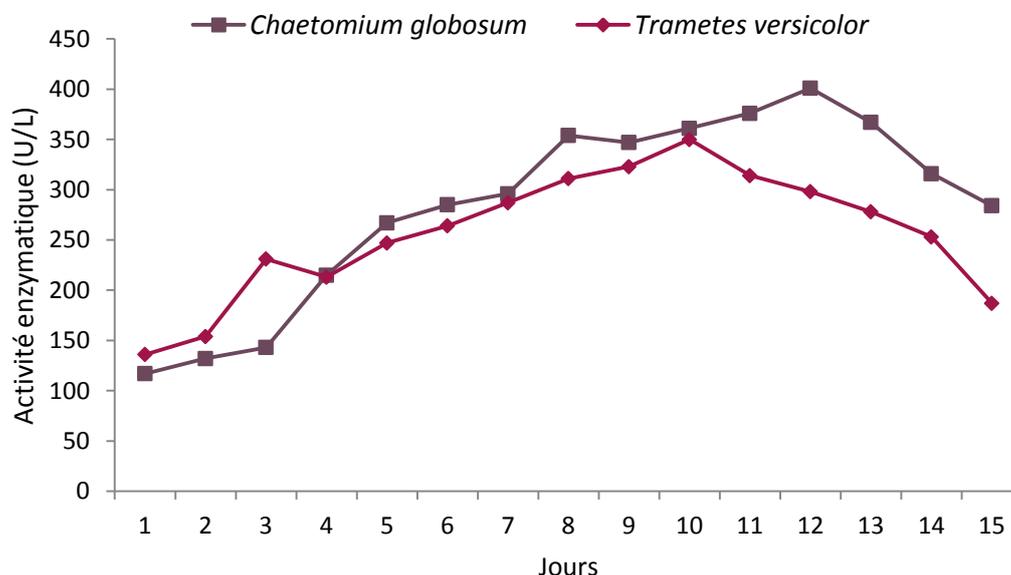


Figure 22 Evolution de l'activité laccasique de *Trametes versicolor* et de *Chaetomium globosum* sur milieux submergés à base de déchets de citrouille

4.8.3- Dégradation des colorants synthétiques par la laccase

L'objectif de cette étude est la mise en évidence d'un autre intérêt biotechnologique de la laccase, en l'occurrence la dégradation des colorants synthétiques, en particulier, ceux utilisés dans l'industrie du textile qui représentent un danger pour l'environnement.

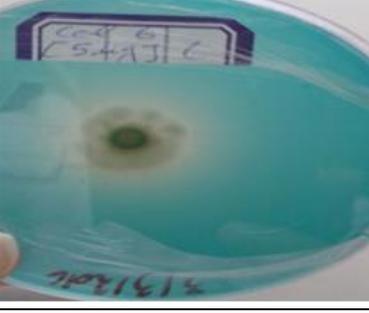
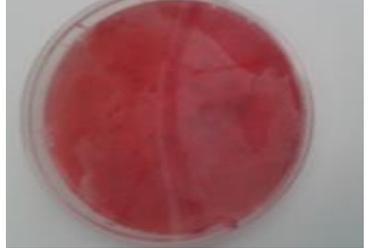
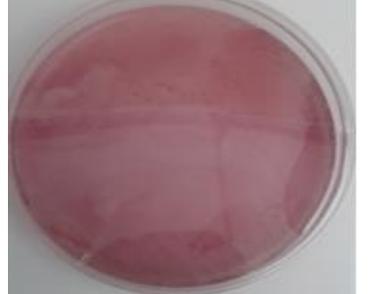
4.8.3.1- Etude de la dégradation des colorants

➤ Test de décoloration sur milieu solide

Ce test a pour but de mettre en évidence sur milieu gélosé la dégradation de quelques colorants utilisés dans l'industrie du textile par *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum*. Le tableau 9 récapitule les résultats de la dégradation des différents colorants par les deux isolats. En effet, après 15 jours d'incubation à 30°C, des zones claires sont apparues autour des colonies de *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* développés dans des boîtes contenant MEB (Malt Extrat Broth); additionnées des colorants **Rouge Congo** et **Vert de Malachite**. Ces zones peuvent être expliquées par la dégradation de ces colorants par la laccase sécrétée par ces souches. Cependant, pour les autres colorants: Tetra-Coton rouge 6B, Bleu de Bromotymol et BASF.FBB-coll; *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* ont montré un développement sur toute la surface de la boîte, ce qui peut expliquer la difficulté à observer une éventuelle zone de dégradation, néanmoins, cette croissance signifie que les deux souches ne sont pas inhibées par la présence des colorants et par conséquent, elles peuvent les dégrader.

Ces résultats ont permis de tester la dégradation des colorants par les deux isolats en milieux submergés. L'application a concerné les deux colorants dont les résultats ont été concluants dans le test précédent, en l'occurrence le Vert de Malachite (V.M) et le Rouge Congo (R.C).

Tableau 9 Test de dégradation des colorants synthétiques par *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor*

Colorants	Témoins	Echantillons
Rouge Congo		
Vert de malachite		
Bleu de Bromothymol		
Tétracoton rouge 6B		
BASF.FBB-coll		

➤ **Test de dégradation des colorants en milieux submergés**

La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyers de 1000 ml contenant 250ml du milieu MEB (Malt extrait broth) additionné de colorants, à savoir le Rouge Congo et le Vert de Malachite, en testant des concentrations variantes, allant de 50ppm à 250ppm, avec un intervalle de 50ppm. Après incubation à 30°C de sept semaines, un changement de la couleur des milieux a été observé. Ce changement résulte, probablement, de la dégradation des colorants par la laccase sécrétée par les deux souches sélectionnées ; *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* (figure 23).

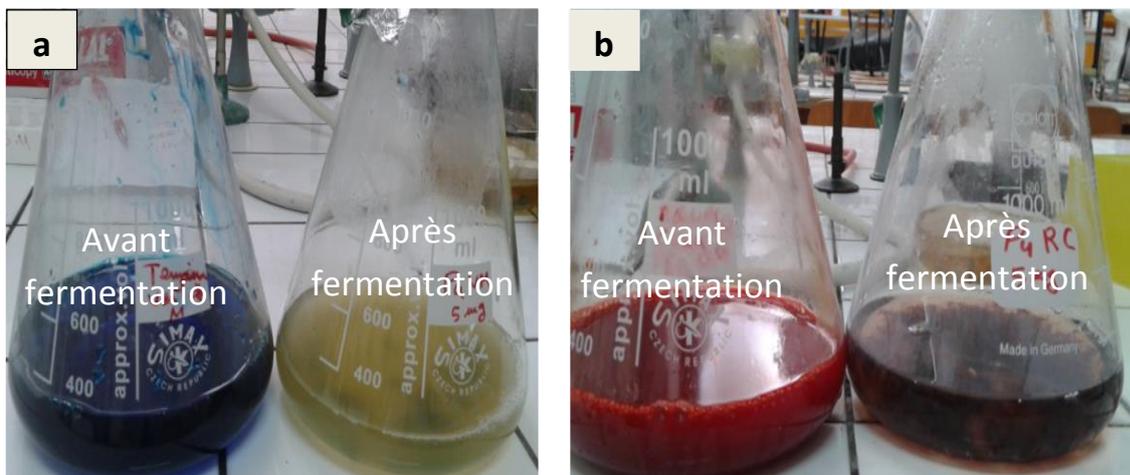


Figure 23 Virage de la couleur, avant et après fermentation, du milieu MEB additionné de
a: Vert de malachite (culture de *Trametes versicolor*) ;
b: Rouge Congo (culture de *Chaetomium globosum*)

Les figures 24 et 25 représentent l'activité laccasique de *Trametes versicolor* et de *Chaetomium globosum* en présence du Rouge Congo et le Vert de Malachite avec différentes concentrations. Cette activité laccasique montre que la dégradation des colorants par les souches fongiques est effective et accompagnée par la présence de l'enzyme dans l'environnement immédiat des colorants.

Les résultats illustrés par la figure 24 montrent qu'en présence de deux colorants à 50ppm dans le milieu, la souche *Trametes versicolor* produit le maximum de l'activité laccasique estimée à 250 U/L en présence du Vert de Malachite et à 200U/L en présence du Rouge Congo, en outre, il est nettement, remarquable que l'activité enzymatique diminue tout en augmentant la concentration des deux colorants expérimentés.

Par ailleurs, l'activité laccasique de *Chaetomium globosum* atteint son maximum (175 U/L) en présence de 100 ppm du Vert de Malachite. En revanche, l'optimum de l'activité

laccasique (248 U/L) est produit par la même souche lorsque le Rouge Congo est présent à 150 ppm dans le milieu (figure 25).

De ce fait, il est nettement observable que la souche *Chaetomium globosum* a des potentialités de dégradation de colorant plus élevée que celle montrées par *Trametes versicolor*.

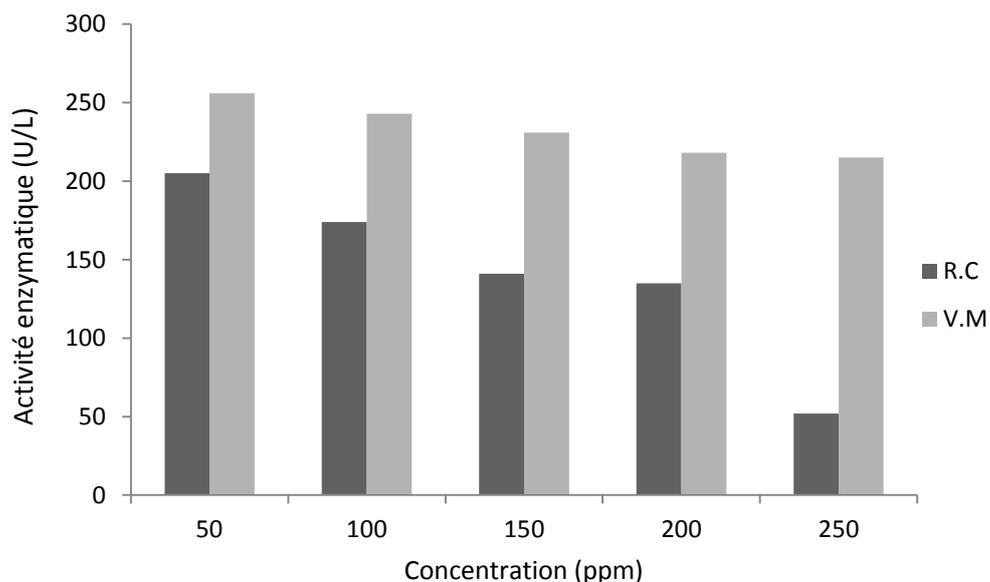


Figure 24 Effet de différentes concentrations de colorants (Vert de Malachite et Rouge Congo) sur la production de laccase sécrétée par *Trametes versicolor*

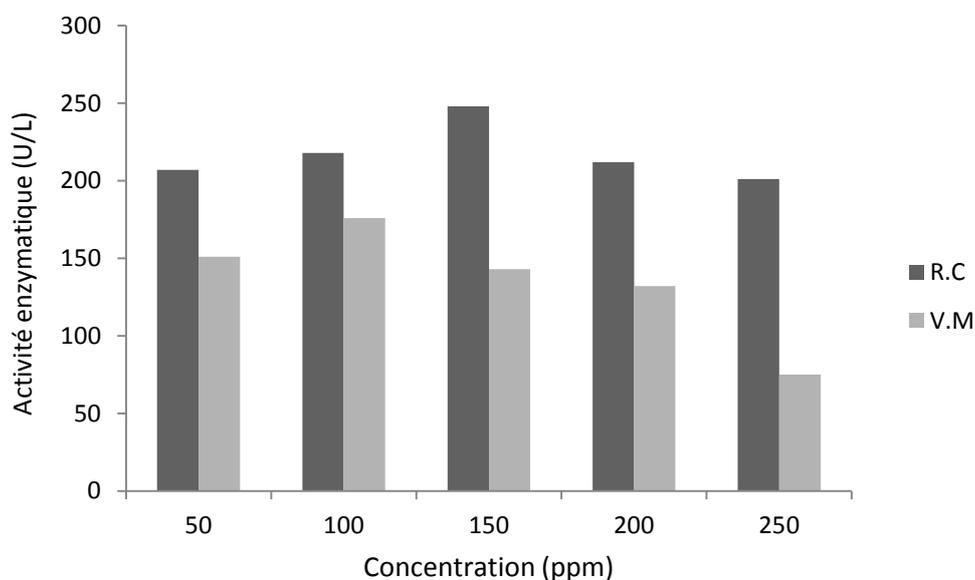


Figure 25 Effet de différentes concentrations de colorants (Vert de Malachite et Rouge Congo) sur la production de laccase sécrétée par *Chaetomium globosum*

4.8.3.2- Analyses de la dégradation des colorants

➤ Analyse de la dégradation des colorants par Spectrophotométrie

Cette analyse est effectuée afin d'étudier une éventuelle dégradation des colorants testés par la laccase sur les échantillons issus de la fermentation, ayant donnés le maximum de l'activité laccasique sécrétée par les deux souches en présence des colorants, et ce, avec un spectrophotomètre (UV/Visible) à balayage (Shimadzu), en surveillant la longueur d'onde d'absorbance maximale pour chaque colorant.

La figure 26 déploie que le Rouge Congo possède une bande d'absorption très importante à 498 nm en présentant un pic qui se stabilise jusqu'à 530 nm. En outre, il a été aperçu qu'en analysant les échantillons issus de la fermentation développés dans la section précédente, le pic correspondant au Rouge Congo disparaît et que l'absorbance de ce colorant diminue tout en augmentant la longueur d'onde jusqu'à atteindre sa valeur minimale de 0.5 à 800nm.

Ceci peut être expliqué par la dégradation du Rouge Congo par la laccase sécrétée par les deux souches.

Par ailleurs, le spectre illustré dans la figure 27 révèle la présence d'un pic à 623 nm exhibant la bande d'absorbance maximale du Vert de Malachite. En revanche, le spectre des échantillons prélevés des cultures des deux souches sélectionnées ; montre que cette absorbance diminue progressivement jusqu'à disparaître à 700 nm pour l'échantillon issu de la culture de *Trametes versicolor*. Cette disparition est due probablement à la dégradation du VM par oxydation par la laccase.

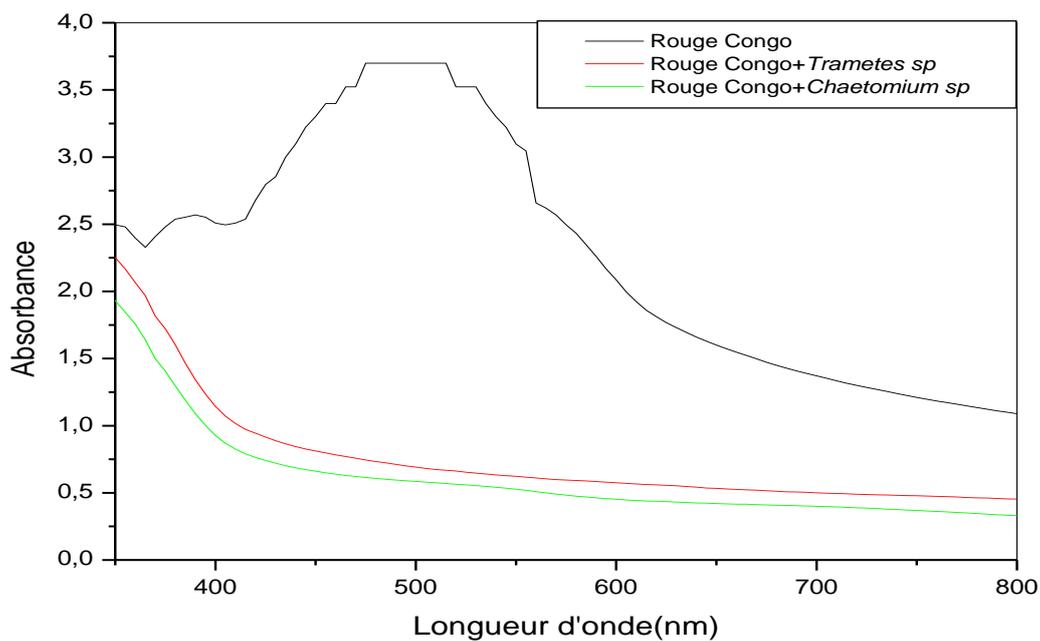


Figure 26 Spectre du Rouge Congo au spectrophotomètre

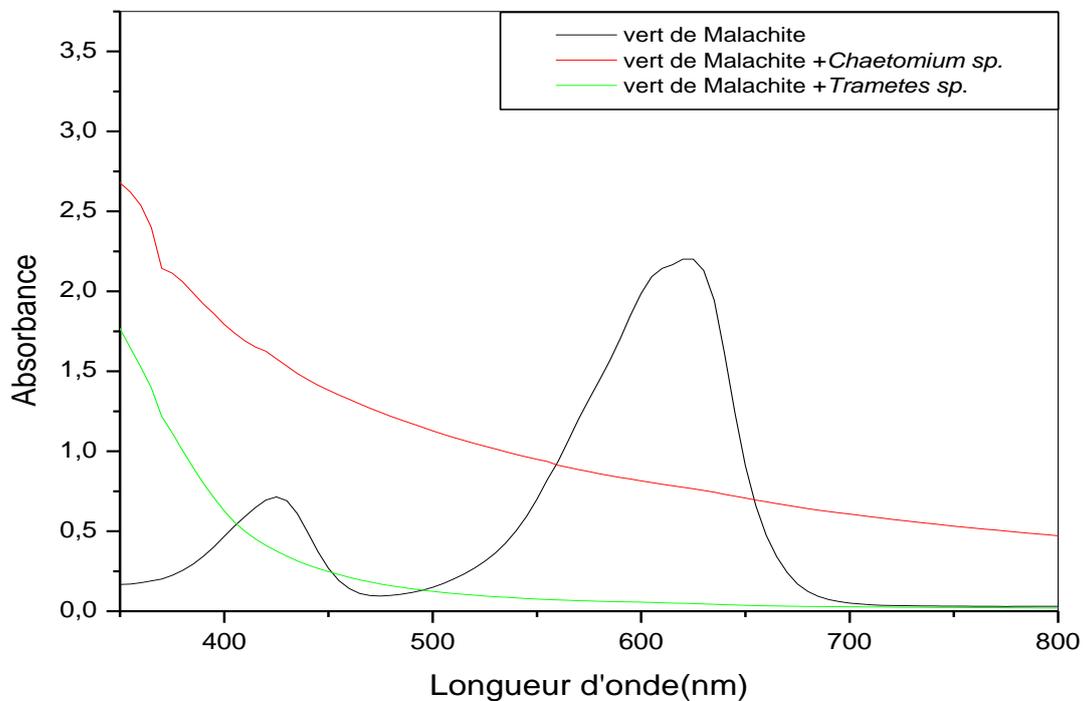


Figure 27 Spectre du Vert de Malachite au spectrophotomètre

➤ *Analyse de la dégradation des colorants par HPLC*

Cette étape a pour but de confirmer la dégradation des deux colorants étudiés après avoir été additionnés aux cultures présumées sécrétant de la laccase.

En effet, les résultats illustrés dans la figure 28 révèlent que l'analyse de Vert de Malachite par HPLC réalisée à 623 nm a donné un pic à un temps de rétention de 2.5 min qui disparaît totalement dans les échantillons issus de la culture des deux souches sélectionnées en additionnée du colorant.

De plus, le chromatogramme montré par la figure 29, effectué à 498 nm a permis l'apparition de deux pics successifs présentant le Rouge Congo; dont le premier à $t_r=2.4$ min et le deuxième à $t_r=3.8$ min. Toutefois, une disparition totale du deuxième pic a été remarquée sur les deux échantillons testés (figure 30, figure 31).

Ces résultats permettent de conclure que *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* dégradent efficacement le Rouge Congo et le Vert de Malachite.

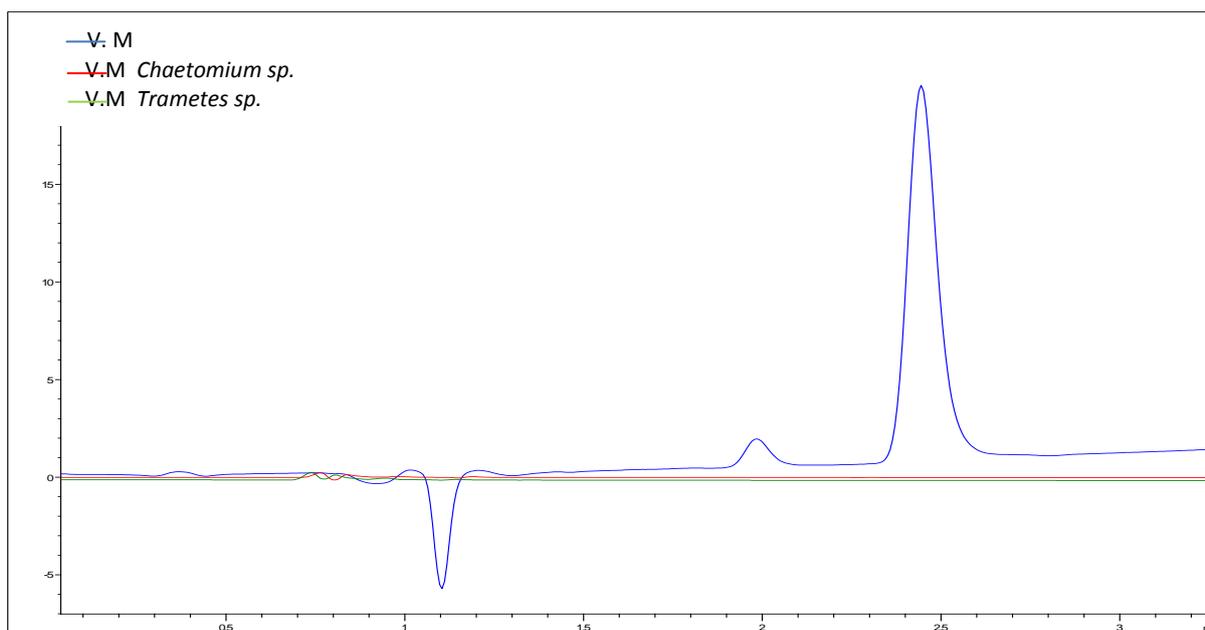


Figure 28 Chromatogramme du Vert de malachite ($\lambda=623$ nm), (VM+ *Chaetomium globosum* et VM + *Trametes versicolor*)

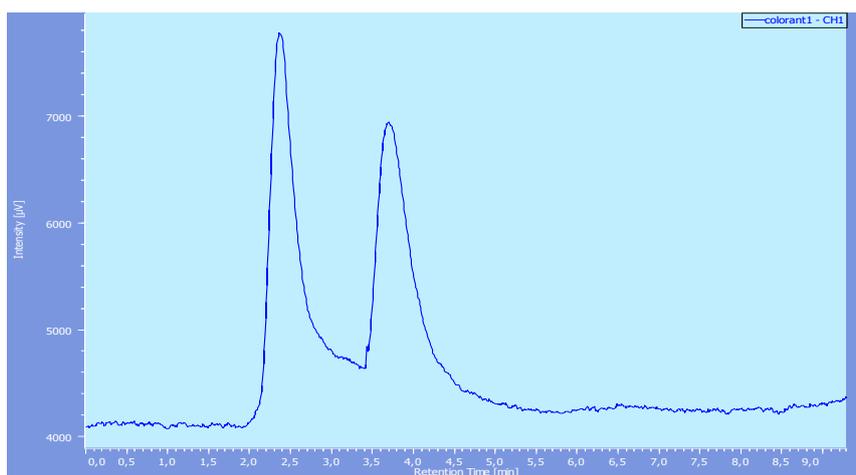


Figure 29 Chromatogramme du Rouge Congo (Témoin) ($\lambda=498$ nm)

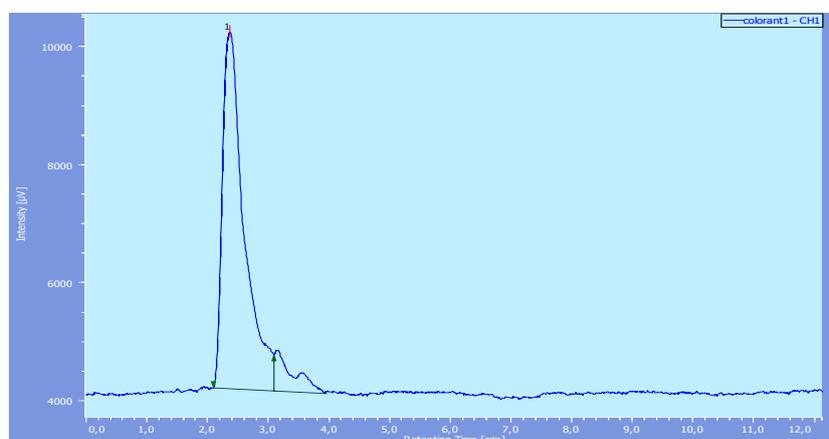


Figure 30 Chromatogramme de l'extrait enzymatique issu de *Trametes versicolor* en présence du Rouge Congo ($\lambda=498$)

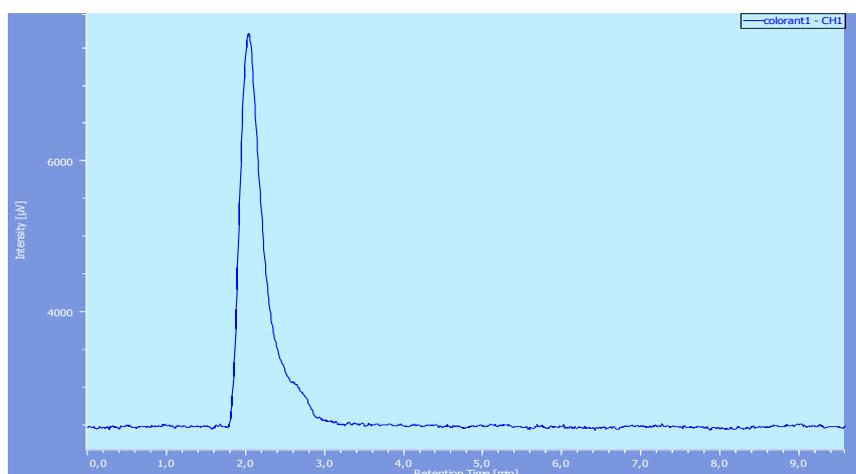


Figure 31 Chromatogramme de l'extrait enzymatique issu de *Chaetomium globosum* en présence du Rouge Congo ($\lambda=498$)

4.8.3.3- Dégradation directe des colorants par la laccase

Ce test consiste à examiner la capacité des filtrats issus de la culture de *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* (supposés contenir la laccase) en Erlenmeyers à dégrader les colorants Vert de Malachite et Rouge Congo.

Les résultats illustrés dans la figure 32 montrent qu'en effet, une décoloration de 45% du Rouge Congo par le filtrat de la culture (laccase sécrétée) de *Trametes versicolor* est estimée après 5 minutes de réaction et la coloration disparaît totalement (décoloration de 100%) après une durée réactionnelle de 45 minutes. En outre, le même filtrat décolore efficacement le vert de Malachite (100%) après 60 minutes d'incubation.

Par ailleurs, il a été montré que le filtrat (laccase sécrétée) issu de la culture de *Chaetomium globosum* a dégradé le Vert de Malachite et le rouge Congo après 55 minutes de réaction en obtenant une décoloration de 100%.

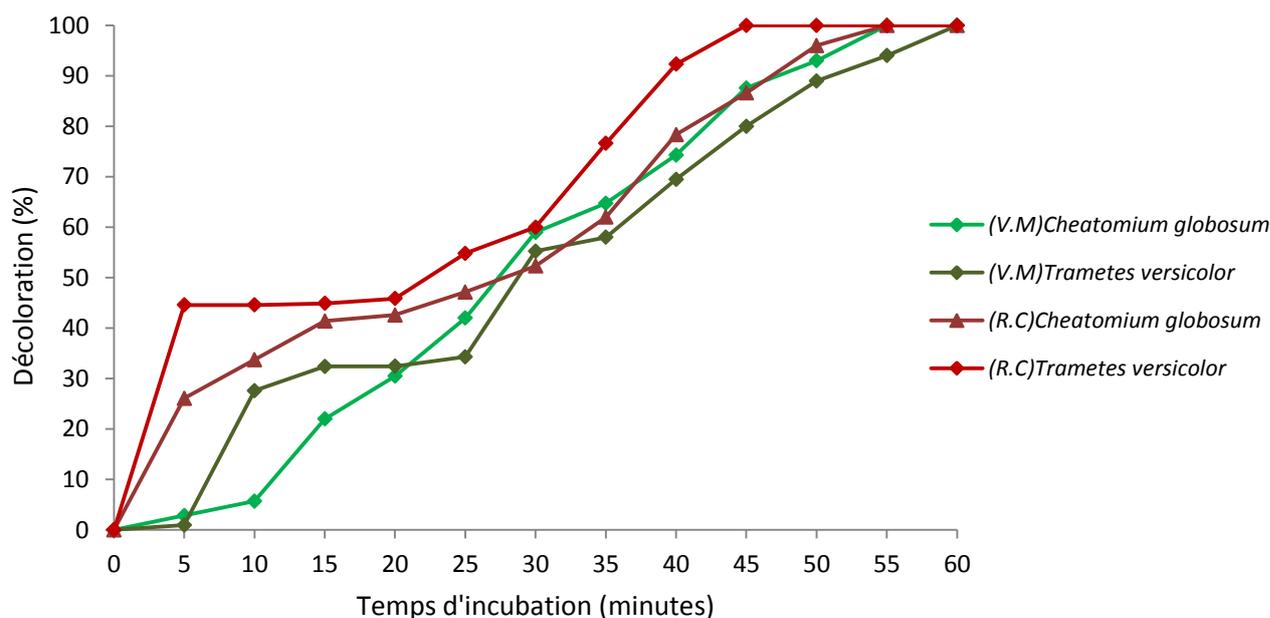


Figure 32 Evaluation de la décoloration des colorants Vert de Malachite et Rouge Congo par la laccase en fonction du temps.

Ces résultats ainsi que ceux obtenus précédemment montrent que les colorants sont décomposés par les souches sélectionnées grâce à la sécrétion de la laccase dans les milieux

Discussion

5- Discussion

L'Algérie, au lendemain de son indépendance, a choisi un modèle d'économie centralisé, où un grand programme d'industrialisation a été tracé à cet effet. Certes ; l'industrie de production reste un moteur essentiel de la croissance économique et de la richesse, néanmoins, il est évident qu'elle a une responsabilité majeure dans la pollution globale du pays (Zeghichi, 2006). Les déchets sont souvent jetés dans la nature sans traitement et s'ils sont traités, leur dégradation conduit, souvent, à la formation d'une chaîne de traitement utilisant des réactions d'oxydations par des produits chimiques nocifs pour l'environnement (Benmansor *et al.*, 2010). Toutefois, il est reconnu qu'une réduction de la pollution en utilisant des produits moins toxiques en valorisant les déchets et en diminuant la consommation d'énergie, constituent des impératifs de développement durable (Zeghichi, 2006). Ceci a incité les chercheurs à trouver de nouvelles technologies d'oxydation basées sur des systèmes biologiques tels que l'utilisation des enzymes. La laccase est une enzyme, particulièrement, intéressante et prometteuse pour l'avenir des biotechnologies. Ce groupe d'enzymes a reçu beaucoup d'attentions de la part des chercheurs pour sa capacité à oxyder des composés phénoliques et non-phénoliques de la lignine, ainsi que de certains polluants persistants dans l'environnement (Rodriguez Couto *et al.*, 2006).

Sur un autre volet, la production d'enzymes industrielles exige l'utilisation de milieux de fermentation à moindre coût, en sachant que l'estimation du coût du milieu de croissance représente 30-40% de celui de production d'enzymes industrielles (Meza *et al.*, 2005).

Cet objectif, peut être atteint par l'utilisation des résidus agroindustriels disponibles et bon marché d'une part et par l'optimisation des conditions nutritionnelles et physicochimiques du milieu de culture d'autre part. C'est ainsi que plusieurs déchets et sous-produits agroindustriels tels que le son, la bagasse de canne ou la derme des fruits sont appliqués pour la production d'enzymes, en particulier la laccase (Faccelo et Cruz, 2009; Savitha *et al.*, 2011).

C'est dans cette optique que l'objectif de ce travail trouve son évolution en traitant les points suivants :

- Sélection des isolats fongiques, producteurs de laccase à partir des divers écosystèmes locaux ;
- Identification des isolats producteurs de l'enzyme ;
- Production de la laccase par les isolats sélectionnés sur milieux à base de résidus agroalimentaires ;

- Application biotechnologique des isolats sélectionnés et de leur laccase dans le domaine de la dégradation des colorants issus de l'industrie textile.

La laccase est une oxydoréductase, appartenant aux Ligninases, qui participent en même temps que les peroxydases à la dégradation de la lignine (Wong, 2009). De plus, ces enzymes lignolitiques sont capables de dégrader une variété de polluants persistants dans l'environnement, tels que des composés aromatiques chlorés, hétérocycliques des hydrocarbures aromatiques, des colorants et de divers polymères synthétiques (Ohkuma *et al.*, 2001). Selon Shraddha *et al.* (2011), la laccase joue un rôle important dans la délignification des arbres morts dans la nature. C'est pourquoi, l'échantillonnage pour ce travail a été effectué à partir de forêts, et d'une manière délibérée, les troncs d'arbre en voie de dépérissement ont été préférentiellement ciblés (Houamel, 2012; Talbi, 2015).

En effet, la forêt située au parc de Belezma (Batna), site du premier échantillonnage, abrite une diversité biologique importante avec une flore composée de chênes verts et surtout du cèdre (Anonyme 1), en outre, la forêt de Chettaba (Constantine) a été aussi choisie comme site d'échantillonnage et ce, pour sa richesse en pin d'Alep, enfin, un dernier échantillon a été prélevé à partir de la forêt de Kenouaa située Collo (Skikda), connu pour sa richesse en châtaignier (Talbi, 2015). Pour rappel l'échantillonnage concerne aussi bien les troncs d'arbre et du sol environnant.

Aussi, l'isolement des mycètes réalisé sur milieu PDA additionné de Chloramphénicol, qui permet l'inhibition de la croissance bactérienne, a abouti à l'obtention de 51 isolats fongiques, dont quarante-trois ont été isolés à partir du sol et huit isolats ont été obtenus des troncs d'arbres. Cette répartition disproportionnée peut être expliquée par le fait que le sol soit l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes, formant des populations qui s'interagissent (Garrido-Jurado *et al.*, 2011 ; Anderson et Martens, 2013). Le nombre et l'activité de ces dernières changent d'une région à une autre, sous l'influence de différents éléments: la matière organique et la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Smith *et al.*, 2000; Kachuei *et al.*, 2012) et les populations fongiques représentent la majorité de la biomasse du sol (Bååth et Söderström, 1980; Schnürer *et al.*, 1985). Les différents isolats obtenus sont des moisissures appartenant aux différents genres, la plupart appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. En revanche, aucune levure n'a été isolée dans ces conditions. Selon Dommergues *et* Mangenot (1970), les levures sont relativement peu nombreuses dans les sols, car, elles sont

souvent adhérentes aux plantes riches en sucres directement assimilables (Bouix et Leveau, 1991) ce qui n'est pas le cas pour les présents échantillons.

L'un des paramètres largement utilisé pour la détection des enzymes ligninolytiques est l'emploi d'un chromogène (Thakur et Gupte, 2014). En effet, l'activité laccasique des isolats fongiques a été mise en évidence sur milieu Olga additionné de gaïacol. Ce dernier joue le rôle d'un chromogène révélant la présence de la laccase (Viswanath *et al.*, 2008). Ce test a permis la sélection de trois isolats comme étant producteurs de la laccase et ce, grâce à l'apparition d'un halo rouge bordeaux entourant les colonies: Deux isolats issus de la forêt de Chettaba (Constantine), l'isolat **P4** provenant du sol rhizosphérique et l'isolat **L** obtenu à partir d'un tronc d'arbre de la même localité ; le troisième isolat, codé **D**, a été isolé à partir d'un tronc d'arbre récolté de la forêt de Belezma (Batna). Ce résultat est considéré comme une réaction positive résultant de l'oxydation du gaïacol en présence de la laccase (Thakur et Gupte, 2014). Patel *et al.* (2000), Viswanath *et al.* (2008) ont, eux aussi utilisé gaïacol comme révélateur d'activité laccasique ; en revanche, Gao *et al.* (2011) ont opté pour un mélange de Remazol Brilliant Blue R (RBBR), de guaïacol et d'acide tannique.

L'observation microscopique de ces isolats a permis de détecter la présence d'un mycélium abondant et l'absence de spores ; selon Patel *et al.* (2000), ces critères sont le plus souvent caractéristiques des Basidiomycètes. Toutefois, leur identification morphologique et moléculaire a permis de distinguer deux souches appartenant à la classe des Ascomycètes, à savoir : *Trichoderma longibrachiatum* et *Chaetomium globosum* et l'autre, appartenant aux Basidiomycètes : *Trametes versicolor*. D'après Shraddha *et al.* (2011), la plupart des mycètes sécrétant de la laccase appartiennent aux Basidiomycètes, notamment au genre *Trametes* qui a fait l'objet de plusieurs études en rapport avec la production de la laccase (Moldes et Sanroman, 2006; Champagne *et al.*, 2013; Bertrand *et al.*, 2014). **De ce fait, la sélection d'isolats sécréteurs de la laccase et appartenant aux Ascomycètes, peut être considéré comme un résultat très encourageant et prometteur.**

La culture de ces trois isolat sur différents milieux de culture en l'occurrence : Olga, PDB et ME, a permis de sélectionner PDB comme étant le milieu le plus adapté pour la production de la laccase; ces résultats corroborent ceux de Rosales *et al.* (2002) qui ont obtenu l'optimum de l'activité laccasique par *Trametes hirsuta* sur PDB. Selon Gianfreda *et al.* (1999) et Shraddha *et al.* (2011), la laccase peut se trouver dans divers plante et légumes, y compris la pomme de terre. Ceci peut être expliqué par l'utilisation d'extrait de pomme de terre comme

inducteur en induisant la production de cette enzyme et ce, est probablement dû à la composition de la pomme de terre, qui est selon la FAO (2008); riche en amidon avec une teneur importante en potassium, magnésium et vitamine C, notant que ce milieu est largement utilisé pour la culture des mycètes (Botton, 1990; Guiraud,1998). En revanche, Viswanath *et al.* (2008) ont affirmé que le milieu Olga soit le milieu le plus adéquat à la production de laccase par *Stereum ostrea* et *Phanerochaete chrysosporium* qui est plus riche en sels minéraux pouvant jouer le rôle d'inducteurs.

Par ailleurs, les résultats ont montré une variabilité de production de l'enzyme en fonction des souches. En effet, *Trametes versicolor* s'avère la souche la plus performante en matière de production de laccase en Erlenmeyers (1400U/L d'activité enzymatique et 6.1 g/L de biomasse après 8 jours de fermentation), suivie par *Chaetomium globosum* (550U/L activité enzymatique et 5.25 g/L de biomasse après 12 jours d'incubation). Par conséquent, ces deux souches ont été sélectionnées pour le reste du travail. De nombreux chercheurs ont étudié la capacité de différentes souches à produire la laccase en erlenmeyer: Cordi *et al.* (2007) ont obtenu 40U/L d'activité laccasique, Viswanath *et al.* (2008) ont pu produire 600 U/L après 4 jours d'incubation. Alors que Zouari *et al.* (2006) ont montré *Trametes trogii* ne peut produire de laccase sans l'ajout de CuSO_4 comme inducteur.

Toutefois, Il a été signalé que la production de la laccase est liée à la phase stationnaire de la croissance de différentes espèces fongiques et souvent déclenchée en raison de la limitation des nutriments (Sunil *et al.*, 2011). La diminution de l'activité laccasique est observée après le point virage (l'optimum) chez les deux souches, cette régression peut-être dû au système de rétroinhibition, plus précisément, la rétroinhibition par le phénomène d'isoenzymes, où l'enzyme se trouve sous plusieurs formes, dont chacune est sensible à différents produits (Scriban,1998), en d'autre terme, la biomasse sécrète en fin de croissance des métabolites tels que les protéases qui peuvent inhiber l'activité enzymatique de la laccase ou de son isoenzyme (Gys, 2007).

L'étape de la production de laccase en fermenteur (20L) a pour but d'étudier la capacité des souches testées à produire cette enzyme en scale-up sans ajout d'inducteurs. Selon Jones (1998), le but ultime de la production à grande échelle est de réaliser la fermentation de la même façon en Erlenmeyer. D'un point de vue économique, la production de l'enzyme ne peut se faire qu'en fermenteur. L'avantage qui peut fournir un bioréacteur est la capacité de contrôler étroitement les facteurs environnementaux tels que le pH, la température et

l'oxygène dissous, qui sont difficiles à contrôler dans les autres systèmes comme les fioles agitées (Joness, 1998). Cet avantage permet une croissance plus rapide qui incite probablement à augmenter le rendement en biomasse, ce qui peut engendrer une production d'enzymes plus importante. Il semble clair que la meilleure production d'enzyme est dans un réacteur à réservoir sous agitation (Issa, 2009). Généralement, les enzymes d'origine fongique sont produites en milieu submergé (McKelvey et Murphy, 2011). Selon Shraddha *et al.* (2011), la fermentation en milieu submergé permet aux microorganismes de se cultiver en milieu nutritif concentré en oxygène. Cependant, après fermentation, il a été observé que le mycélium des deux souches change d'aspect en se développant sous forme de pellettes. Il est connu que la culture des mycètes en milieu liquide agité donne, plus souvent, un mycélium sous forme de pellettes. Plusieurs chercheurs pensent que cette morphologie ne favorise pas la production de métabolites au niveau optimal, néanmoins, il a été rapporté dans les travaux effectués par Sathishkumar *et al.* (2010) que les pellettes de *Pleurotus florida* favorisent la production de laccase. Bl'anchez *et al.* (2004) ont, eux aussi, utilisé *T. versicolor* sous forme de pellettes pour traiter une décharge de liqueurs noires et ce, par la sécrétion de laccase qui permet la détoxification et la réduction de sa couleur. Selon Kacem chaouche (2006), la morphologie des pellettes accompagne souvent la production d'enzymes extracellulaires en milieu submergé agité ; il a été confirmé que la production de catalase atteint son maximum lorsque la pellette devient dense et compacte, selon Kacem chaouche *et al.* (2005), chaque pellette est formée de trois couches, dont la couche externe est celle productrice d'enzymes.

Les résultats obtenus de la cinétique de la production de laccase par les souches fongiques ont montré que; chez *Trametes versicolor* l'activité augmente progressivement en fonction du temps jusqu'à atteindre son optimum après 8 jours de fermentation. Par ailleurs, le suivi de la cinétique enzymatique de la laccase produite par *Chaetomium globosum* a montré que cette dernière atteint son maximum après 12 jours d'incubation. Cela peut être expliqué par le fait que la laccase est considérée comme un métabolite secondaire (Morozova *et al.*, 2007), elle est produite comme une glycoprotéine extracellulaire, ce qui permet une exclusion rapide par la biomasse fongique (Kunamneni *et al.*, 2007). Cependant, il a été montré que l'activité enzymatique sécrétée par *Trametes versicolor* est moins importante en fermenteur (833U/L) qu'en Erlenmeyers de 500ml (1400 U/L) ; contrairement, une augmentation de l'activité laccasique produite par *Chaetomium globosum* a été observée en fermenteur (987U/L) par rapport à l'erenmeyer (550U/L), ceci veut dire que cette souche est peut-être plus apte à produire à grande échelle par rapport à *Trametes versicolor*, qui est pourtant, selon Shraddha

et al. (2011) parmi les souches les plus performantes en matière de production de laccase. **Ce résultat est considéré comme une première ce qui nécessite un regard plus pointu lors des prochains travaux.** Il semble qu'une augmentation de la production de laccase est observée lorsqu'elle est produite en plus grande échelle (Heather, 2000). Néanmoins, peu de travaux ont été réalisés sur la production de laccase à grande échelle: Eggert *et al.* (1996) a confirmé qu'une augmentation de l'activité laccasique est observée en fermenteur par rapport aux résultats obtenus en fioles et il a montré aussi que l'optimum est obtenu 3 jours plutôt. Quant à Heather (2000) a obtenu une meilleure production de laccase en fermenteur en comparaison à l'ermeneyer en travaillant sur *Corioloropsis gallica* en démontrant montrer que l'activité laccasique double de valeur en fermenteur.

En d'autre part, afin d'étudier l'enzyme recherchée, une caractérisation partielle de la laccase a été effectuée. En effet, une électrophorèse Native-Page a été réalisée. Elle a pour but de confirmer la présence de la laccase et d'identifier le nombre d'isoenzymes produits par *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum*. L'électrophorèse Native-Page est parmi les techniques les plus fiables pour étudier la structure et la composition des protéines natives, car au cours de cette technique l'activité biologique et la conformation des protéines restent intactes (Anonyme 2, 1998).

Les résultats obtenus montrent la présence de bandes rouge-brunâtres dans le zymogramme obtenu sur gel d'électrophorèse non dénaturant, cela résulte de l'oxydation du gaïacol par la laccase (Viswanath *et al.*, 2008). En effet, deux isoenzymes sont apparus pour l'extrait issu de la culture de *Trametes versicolor* (Lac 1 et Lac 2), alors que l'extrait issu de la culture de *Chaetomium globosum* a permis l'obtention d'un seul isoenzyme (Lac 1). Ces résultats corroborent à ceux rapportés par Michniewicz *et al.* (2006) qui ont montré que *Cerrena unicolor* sécrète deux isoformes de laccase au cours de sa croissance, ayant des caractéristiques différentes dans un milieu de culture synthétique. Sathishkumar *et al.* (2010) ont montré, d'ailleurs, que deux isozymes de la laccase (L1 et L2) ont été produites par *Pleurotus florida* dont L1 était plus dominante que L2. Un motif similaire d'isoenzymes de laccase a été observé par Das *et al.* (2001) dans une précédente étude utilisant *Pleurotus florida*. En effet, selon Kunamneni *et al.* (2007) de nombreux champignons produisant la laccase sécrètent des isoformes de la même enzyme désignés isoenzymes. Ces derniers peuvent provenir de gènes identiques ou différents, codant pour la même enzyme. Les isoenzymes de la même enzyme peuvent se différencier par leur stabilité, le pH optimal, la température et même l'affinité pour différents substrats. Cependant, les résultats montrent

que la Lac 1 sécrétée par *Trametes versicolor* est plus concentrée que la Lac 2 et la Lac1 de *Chaetomium globosum*. Cela pourrait être le résultat de l'association d'au moins deux isoformes de laccase simples. Des résultats similaires ont été rapportés par Bertrand *et al.* (2014) qui ont confirmé la présence de divers isoformes ayant une activité de laccase pouvant être concentrés pour former une bande rassemblant plusieurs isozymes. Mieux encore, ils ont constaté qu'avec des agents inducteurs, *Trametes versicolor* arrive à sécréter 7 isozymes de laccase qui ont différents points isoélectriques proches. Ce qui peut confirmer que des agents xénobiotiques peuvent inhiber ou induire la sécrétion de laccase.

En effet, la présence de plusieurs gènes de laccase dans le génome d'un champignon n'est pas rare. Il a été rapporté que 16 différentes séquences de gènes codant pour la laccase sont collationnées à GenBank (Bertrand *et al.* 2014). Ces séquences codent pour des protéines entre 515 et 619 acides aminés et la proximité phylogénétique étroite entre elles est indiquée par des comparaisons de séquences (Bourbonnais *et al.*, 1995). Dans une étude menée par Kilaru *et al.* (2006), dix-sept différents gènes codant pour la laccase ont été isolés et séquencés chez *Coprinopsis cinerea*. Le génome de *Pleurotus ostreatus* comprend 12 gènes de laccase; cependant, à ce jour, seulement six isoenzymes ont été caractérisés (Castanera *et al.*, 2012). En outre, ces différentes isoenzymes peuvent moduler différents rôles dans la physiologie de différentes espèces ou dans la même espèce dans des conditions différentes (Assavanig *et al.*, 1992).

Par ailleurs, l'étude de l'effet du pH sur l'activité laccasique sécrétée par *Chaetomium globosum* a montré que l'optimum est situé entre pH 5 et 6, ce qui corrobore aux résultats de Khushal *et al.* (2010) et de Valeriano *et al.* (2009) qui ont montré que l'activité de la laccase sécrétée par *Stereum ostrea* atteint son maximum à pH6. En d'autre part, l'optimum du pH est de 3 pour l'activité laccasique sécrétée par *Trametes versicolor*. Ces résultats sont concordes à ceux de Han *et al.* (2005) qui ont extrait la laccase de *Trametes versicolor*. Des résultats similaires ont aussi été obtenus par Wang *et al.* (2013) qui ont montré que l'optimum de l'activité laccasique sécrétée par *Pichia pastoris* est de 3. Cependant, Zhixin *et al.* (2010) ont montré que le maximum d'activité laccasique est obtenu à pH 4.4. Généralement, les mycètes préfèrent les pH acides pour bien se développer (Sunil *et al.*, 2011). D'Annibale *et al.* (1996) ont expliqué ces différences par le fait que la réactivité de la laccase dépend généralement des substituants du substrat phénolique qui peuvent être ionisés différemment selon la valeur du pH. Selon Shraddha *et al.* (2011), la valeur optimale du pH varie en fonction du substrat,

mais la plupart des études montrent que le pH situant entre 4.5 et 6.0 est plus adapté pour la production d'enzymes (Thurston, 1994).

En d'autre part, l'étude de l'effet de la température sur la production de la laccase a montré que l'optimum est révocable. En effet, l'activité maximale de la laccase produite par *Chaetomium globosum* est enregistrée à 35°C, alors que celle produite par *Trametes versicolor* est obtenue à 55°C. Ces résultats sont similaires à ceux de Han *et al.* (2005) qui ont montré que l'optimum de température sur l'activité de laccase sécrétée par *Trametes versicolor* est de 50°C, en d'autre part, Nyanhongo *et al.* (2002) ont obtenu les mêmes résultats en produisant la laccase par *Trametes modesta*. En revanche, selon Valeriano *et al.* (2009) l'activité maximale de la laccase produite par *Stereum ostrea* est enregistrée à 40°C. D'une façon générale l'optimum de la température diffère d'une souche à une autre (Shraddha *et al.*, 2011), mais généralement, il est compris entre 30°C à 60°C (Nishizawa *et al.*, 1995; Youn *et al.*, 1995).

Après avoir testé la capacité des souches sélectionnées à produire la laccase à grande échelle, l'objectif s'orienté vers sa production à moindre coût. Selon John (2009), environ 3,5 milliards de tonnes de résidus agricoles sont produits par an dans le monde. Plusieurs tentatives ont été faites afin d'utiliser les déchets agroalimentaires, tels que les déchets d'orange, le marc de pomme ou de raisin à des fins industrielles pour produire des substances d'origine microbienne tels que les enzymes, les acides organiques, les arômes, etc. Ces déchets sont, généralement, difficiles à éliminer, en d'autre part, leur séchage et leur stockage sont des facteurs économiquement limitants et souvent sont sujets à des détériorations microbiennes (Mamma *et al.*, 2009). L'utilisation des résidus agroindustriels fournit des substrats alternatifs pour les bioprocédés et présente un potentiel biotechnologique important qui attire l'attention des chercheurs à travers le monde; de plus, cette approche permet de réduire, d'un point de vue, environnemental les problèmes de pollution de façon considérable (Rojan, 2009).

Afin de tester la capacité des souches sélectionnées à produire la laccase sur différents substrats à base de déchets, plusieurs substrats ont été utilisés, à savoir : la peau, les pépins et les fibres de citrouille ; le son du blé ; l'avoine ; la sciure de bois ; les grignons d'olives ; les feuilles du pommier ; les feuilles du raisin et les feuilles du melia. Les résultats obtenus dans cette étape a permis de conclure que les souches sélectionnées: *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* peuvent sécréter la laccase en utilisant comme seule source de carbone des déchets agroalimentaires. En effet; une activité laccasique a été observée sur, presque,

tous les résidus testés. Ces résultats corroborent à ceux de Faccelo et Cruz (2007) qui ont utilisé la peau de banane pour produire la laccase, en d'autre part, Freixo *et al.* (2012) ont testé la production de laccase à partir de la tomate, Quant à Mendoza (2011), elle a opté pour la pelure d'orange et la canne à sucre.

Il semble que l'utilisation de feuilles comme substrat peut induire la production de laccase; selon Milaitil *et al.* (2003), les feuilles sont riches en sels minéraux et en vitamines, ce qui joue probablement le rôle d'inducteur pour la production de la laccase.

En revanche, la sciure de bois n'a pas permis la production de laccase ; ceci peut être expliqué par l'abondance de L'holocellulose au sein de sa composition: un mélange des constituants, cellulosiques et hémicellulosiques, est présent à 66,59% (Benyoucef et Harrache, 2014). Par ailleurs, les déchets de citrouille ont permis l'obtention de l'optimum de l'activité laccasique; cela est probablement dû à la richesse de citrouille en nutriments. Selon Sylvain et Charron (2009), la citrouille est un légume économique et nutritif, considéré comme une bonne source de fibres, de potassium et de vitamines surtout du complexe B; riche en carotène, en glucides et en oligo-éléments. La citrouille est riche aussi en pépins (graines) qui représentent une source de protéine et d'huile (Beavers *et al.*, 2008; Pascault, 2012). En outre, les jeunes feuilles de courge sont riches en vitamine C et en carotène (Dornan, 2006). En d'autre part, Au Sahara Algérien, les cucurbitacées fournissent une part importante des cultures potagères, notamment la courge ou le potiron (Allam *et al.*, 2013). Les citrouilles sont plus couramment consommées dans la région de Ghardaïa, où elles sont cultivées dans la plupart des jardins familiaux de la wilaya, qui s'est forgée une réputation pour la production de ce légume (Benseddik *et al.*, 2014).

Ces résultats offrent un potentiel biotechnologique important; certes, une étude approfondie doit être concrétisée afin d'augmenter le rendement en testant d'autres inducteurs, cependant, il a été montré dans cette approche que les souches sélectionnées sont capables à produire la laccase à moindre coût, tout en valorisant les déchets agroalimentaires. **Il est impératif de mettre en exergue, qu'à notre connaissance, ce travail est le premier à avoir utilisé *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* pour la production de laccase en utilisant comme seule source de carbone les déchets de citrouille.**

On ne cessera de parler de l'importance de la laccase, car, considérée comme un catalyseur compétant, elle oxyde à la fois les substrats toxiques et non toxiques, naturels ou synthétiques (Shraddha *et al.*, 2011). Les Laccases sont des enzymes polyvalents capables d'oxyder des

composés récalcitrants comme la lignine, ce qui les rend attrayants pour être utilisés dans divers procédés biotechnologiques (Mendoza, 2011). De ce fait, notre objectif s'oriente vers la mise en évidence d'un intérêt biotechnologique de la laccase sécrétée par les deux souches sélectionnées (*Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum*), en l'occurrence la dégradation des colorants synthétiques, spécifiquement, ceux utilisés dans l'industrie du textile.

L'industrie du textile utilise un grand volume d'eau et de produits chimiques pour le traitement des colorants. La structure chimique de ces derniers fournit une résistance à la décoloration lorsqu'ils sont exposés à la lumière, à l'eau ou aux produits chimiques (Shraddha, et al., 2011). Généralement, les colorants contaminent les eaux usées car ils sont déchargés dans les effluents durant le processus industriel de fabrication de textiles où ils représentent 10-15% (Trella et al., 2006; Cristovao et al., 2009; Gopinath et al., 2009), voire même 90% des colorants utilisés (Abadulla et al., 2000). Une fois libérés, les colorants peuvent conférer des propriétés toxiques et cancérigènes à l'eau et peuvent contribuer à la charge organique totale (Dos Santos et al., 2004; Cristovao et al., 2009). En outre, la coloration de l'eau aura une incidence sur l'absorption normale de la lumière du soleil nécessaire pour de nombreux organismes aquatiques (Cristovao et al., 2009). C'est pourquoi aujourd'hui on s'intéresse aux processus de dégradation des colorants, par les souches fongiques, basés sur l'appui de leur laccase.

En premier lieu, la dégradation des colorants a été réalisée sur milieu solide, cinq colorants ont été choisis: Le Rouge Congo, le Vert de Malachite et le Bleu Bromothymol; Le Tétracoton rouge6B, BASF.FBB-coll et le Lb4GF coll 28883641. Les résultats ont révélé la présence d'un développement mycélien des deux souches testées sur toutes les boîtes, ce qui signifie que *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* sont capables de se développer en présence de différents colorants synthétiques, **ce qui est prometteur, car, cela implique la possibilité d'utiliser ces souches en industrie afin d'éliminer les colorants dans les effluents.**

Par ailleurs, une zone claire autour des souches fongiques testées sur les boîtes contenant MEA additionné des deux colorants Rouge Congo et Vert de Malachite a été observée. Cette zone peut être expliquée par la capacité de *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* à sécréter la laccase supposée être responsable de leur dégradation. Ces résultats concordent ceux de Sathishkumar et al. (2010) qui ont pu mettre en évidence la capacité de décoloration de *P. florida* sur milieu solide additionné du colorant RB 198. La décoloration se traduit par le changement de la couleur du bleu au bleu clair rosé pour devenir enfin, transparent. Des

résultats similaires ont été observés durant la décoloration de Remazol Brilliant Blue R (RBBR) par *Ganoderma lucidum*. Cependant, une décoloration du milieu de culture contenant les colorants : TetraCoton rouge 6B, Bleu de Bromotymol et BASF.FBB-coll n'a pas été observée, cela est probablement dû au développement de *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* sur toute la surface des boîtes de Pétri, qui peut expliquer la difficulté à observer une éventuelle zone de dégradation. **Ces résultats laissent supposer que le développement des souches est un signe fort de résistance des ces dernières à l'effet inhibiteur des colorants, ce qu'ouvre la voie d'utilisation de leur biomasse dans la dépollution.**

En d'autre part, l'étude de la dégradation du Rouge Congo et le Vert de Malachite sur **milieu liquide** a montré que l'activité laccasique est présente dans les deux extraits issus de la culture de *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor*. Après incubation, une décoloration du milieu de culture est observée, cela est probablement dû à l'oxydation par la laccase produite. Différents travaux ont montré que *T. versicolor* décolore complètement l'amarante, tropaéoline O, Reactive Blue 15, rouge Congo, Reactive Black 5 et décolore partiellement Brilliant Red 3G-P, Jaune brillant 3B-A et Remazol Brilliant Blue R (Ramsay et Nguyen, 2002). Romero *et al.* (2006) ont montré que les bactéries *S. maltophilia* décolorent certains colorants synthétiques (bleu de méthylène, vert de méthyle, bleu de toluidine, rouge Congo et orange de méthyle). Quant à Hartikainen *et al.* (2016) ont étudié la dégradation de 16 colorants par 6 souches fongiques différentes. Selon Champagne *et al.* (2013) les laccases décolorent les colorants anthraquinoniques de manière efficace et leur spécificité peut être élargie à d'autres classes de colorants en utilisant des médiateurs de petits poids moléculaires, tels que l'hydroxy-benzotriazole.

L'analyse spectrophotométrique effectuée sur les échantillons issus de la fermentation, ayant donné le maximum de l'activité laccasique sécrétée par les deux souches en présence des colorants a pour but de mettre en évidence la dégradation des colorants testés par la laccase. Les résultats montrent que le Rouge Congo et le vert de Malachite se présentent sous forme de pic, ces pics ont disparus lors de l'analyse des extraits bruts contenant la laccase issus de la fermentation. Ces résultats sont en accord avec ceux de Yeşilada *et al.* (2014) qui ont montré la capacité d'un extrait brut de laccase sécrété par *Funalia troglia* à décolorer des colorants réactifs. Mohammed, (2015) a aussi mis en évidence par analyse spectrophotométrique la dégradation du Rouge Congo par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus terreus*, alors que Gul et Kumar (2016) ont étudié la capacité d'*Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* à dégrader le Rouge Congo.

La dégradation de Rouge Congo et le Vert de Malachite a été confirmée par HPLC où il a été montré que les pics désignant les colorants disparaissent dans les échantillons issus de la culture de *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor*. Ce phénomène a été rapporté par Sathishkumar *et al.* (2010) qui ont observé un spectre identique du colorant Reactive Blue198, dont la dégradation est faite par la laccase sécrétée par *Pleurotus florida*.

Ces résultats permettent de conclure que les laccases produites par *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* dégradent efficacement le Rouge Congo et le Vert de Malachite.

Cette étude ne présente qu'une petite ébauche sur l'application de *Chaetomium globosum* et sa laccase dans la dégradation des colorants du textile, certes, une étude approfondie reste à faire. **A notre connaissance, la mise en évidence de la dégradation de *Chaetomium globosum* des colorants testés est considérée comme une première, d'après la littérature consultée, aucune étude n'a abordé la capacité de ce genre et de cette espèce à dégrader le Vert de Malachite ou le Rouge Congo.**

Conclusion et Perspectives

6- Conclusion et Perspectives

Dans cette étude, l'exploration des échantillons provenant de trois forêts situées à l'Est Algérien, a permis d'isoler 51 isolats fongiques. Afin de sélectionner les isolats sécrétant la laccase, un test sur milieu gélosé additionné d'un inducteur « gaïacol » a été réalisé, ce qui a permis de sélectionner trois isolats comme laccases positifs. L'identification morphologique et moléculaire de ces isolats a montré qu'il s'agit de *Trichoderma longibrachiatum*, *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum*. **Il a été conclu que les forêts renferment des souches fongiques à potentialité élevée de production de laccase.**

D'autre part, la culture de ces trois souches sur différents milieux de culture (Olga, PDB et ME) a permis de conclure que **PDB est le milieu le plus adapté pour la production de la laccase, par conséquent il a permis** de sélectionner les souches les plus productrices de laccase: *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum*.

La production de laccase par *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* sur milieu submergé en erlens (500ml) et en fermenteur (20L) a permis, au départ, de conclure que ces souches s'adaptent parfaitement aux conditions biotechnologiques de la production d'enzymes, et d'établir ensuite, que ces **deux souches possèdent la capacité à sécréter la laccase en scale-up et par conséquent en conditions industrielles.**

La caractérisation partielle des laccases, produites par les deux souches en milieu submergé, effectuée sur gel Native a permis de mettre en évidence que la laccase **sécrétée par *Trametes versicolor* se présente sous deux isoenzymes différents (Lac1 et Lac2) et celle produite par *Chaetomium globosum* est présentée en un seul isoenzyme.** D'un autre côté, il a été montré que l'activité laccasique sécrétée par *Trametes versicolor* est à son maximum à pH 3 et à 55°C, alors que l'activité enzymatique produite par *Chaetomium globosum* atteint son maximum à pH situé entre 5 et 6 et à 35°C.

Le test préliminaire de la capacité des souches sélectionnées à produire la laccase sur différents substrats à base de déchets, a permis de conclure que ***Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* peuvent utiliser des déchets agroalimentaires comme seule source de carbone et d'azote et par conséquent, assurer la production de laccase à moindre coût,** en notant que les déchets de citrouille ont permis l'obtention de l'optimum de l'activité

laccasique sécrétée par les deux souches et **à notre connaissance, ce travail est le premier à avoir utilisé *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* pour la production de laccase en utilisant comme seule source de carbone les déchets de citrouille.**

Enfin, l'étude de dégradation des colorants synthétiques par la laccase a permis de conclure, tout d'abord, que *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* peuvent se développer sur milieux concentrés en colorants, ce qui **implique la possibilité d'utiliser ces souches en industrie afin d'éliminer les colorants dans les effluents, et ensuite, de confirmer que les laccases produites par les deux souches ont la capacité de dégrader deux colorants : le Vert de Malachite et le Rouge Congo. A notre connaissance, la mise en évidence de la dégradation des colorants testés par *Chaetomium* est considérée comme une première, d'après la littérature consultée, aucun travail n'a fait une étude sur la capacité de ce genre à dégrader le Vert de Malachite ou le Rouge Congo.**

De nombreuses perspectives découlent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies sont nécessaires concernant plusieurs points, à savoir :

- Optimisation du milieu de fermentation à base de déchets agroalimentaires pour la production de laccase;
- Purification de la laccase sécrétée par *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum*;
- Etude approfondie des souches sélectionnées afin de les appliquer directement en industrie textile pour éliminer les effluents;
- Une attention particulière doit être réservée au *Chaetomium globosum* **sur tous les points étudiés, étant donné que les résultats obtenus le concernant sont considérés comme une première.**

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abadulla** E, Tzanov T, Costa S, Robra K, Cavaco-paulo A, Gübitz G (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta* *Appl Environ Microb.* 66: 3357–3362.
- Aljawish** A (2013). Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères : thèse de doctorat en Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Université de Lorraine.
- Allam** A, Tirichine A, Cheloufi H, Arif Y, Tama M, Mimouni M A (2013). Etude de la diversité biologique des espèces Maraichères cultivées dans les palmeraies de la Vallée d'Oued Righ (cas de la région de Touggourt ,) INRAA, Station expérimentale de Sidi Mehdi. B.B 17 Touggourt Algérie. 64-71.
- Anderson** T, Martens R (2013). *Soil Biology and Biochemistry.* 57: 487-495.
- Anonyme 1.** Office du Parc National de Belezma
- Anonyme 2,** Wikströms, Sweden 980997, Aug., 1998 Amersham Biosciences 1998. <https://www.med.unc.edu/pharm/sondeklab/files/resource-files/protein-purification-handbooks/Native%20gel%20analysis.pdf>
- Archibald** FS, Bourbonnais R, Jurasek L, Paice MG, Reid ID (1997). Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *J Biotechnol.* 53: 215–236.
- Arias** M E, Arenas M, Rodr ´iguez J, Soliveri J, Ball A S, Hern´andez M (2003). Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology.* 69(4): 1953–1958.
- Arora** D S, Sharma R K (2010). Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Appl Biochem Biotechnol.* 160: 1760–1788.
- Assavanig** A, Amornkitticharoen B, Ekpaisal N, Meevootisom V, Flegel T M (1992). *Applied Microbiology and Biotechnology.* 38:198.
- Ayed** L, Chaieb K, Cheref A, Bakhrouf A (2009). Biodegradation and decolorization of triphenylmethane dyes by *Staphylococcus epidermidis*. *World J Microbiol Biotechnol.* 25: 705-711.
- Bååthe** E, Söderström B (1980). Comparisons of the agar-film and membrane filter methods for the estimation of the hyphal lengths in soil with particular reference to the effect of magnification. *Soil Biol Biochem.* 12:385-387.
- Barbat** A (2009). Extraction, caractérisation chimique et valorisation biologique de glucuronoxylanes de bois de châtaignier. Thèse de Doctorat. Université de Limoges.

- Barrett F M** (1987). Characterization of polyphenol oxidases from larval cuticle of *sarcophaga bullata* and a comparison with cuticular enzymes from other species. *Can.J.Zool.* 65: 1158-1166.
- Bataïche I** (2014). Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse de Doctorat. Université des Frères Mentouri. Constantine.
- Bataille G**, Coster Q, Gilet M, Robise A (2011). La chimie du vert, Université catholique de Louvain.
- Bazanella G C**, Souza D, Castoldi R, Ferreira R O, Bracht A, Peraltav R M (2013). Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonarius* in solid-state cultures and application in dye decolorization. *Folia Microbiol.* 58:641–647.
- Beavers R**, Mackenzie J, Hammermeister A (2008). Production d'huile de pépins de citrouille: fertilité et lutte contre les ravageurs : Rapport de recherche intermédiaire, centre d'agriculture biologique (CABC). Canada. E2008-38.
- Beloqui A**, Pita M, Polaina J, Martinez-Arias A, Golyshina O V, Zumarraga M, Yakimov M *et al.* (2006). *Journal of Biological Chemistry.* 281.
- Benfield G**, Bocks S, Bromley K, Brown B (1964). *Phytochemistry.* 3: 79-88.
- Benmansour H**, Mosrati R, Corroler D, Ghedira K, Bariller D, Chekir- Ghedira L (2010). Acid violet 7 and its biodegradation products induce chromosome aberration, lipid peroxidation and cholinesterase inhibition in mouse bone marrow. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17: 1371-1778.
- Benseddik A**, Azzi A, Allaf A K (2014). Modélisation des isothermes de désorption de la citrouille en vue de leur séchage solaire. Le 3ème Séminaire International sur les Energies Nouvelles et Renouvelables. Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables, Ghardaïa – Algérie.
- Benyoucef S**, Harrache Dj (2015). Caractérisation de la microstructure de sciure de bois de pin sylvestre "*Pinus sylvestris*" [Microstructure characterization of scots pine "*Pinus sylvestris*" sawdust]. *J. Mater. Environ. Sci.* 6(3) : 765-772.
- Bertrand B**, Martínez-Morales F, Tinoco R, Rojas-Trejo S, Serrano-Carreón L, Mariá R. Trejo H (2014). Induction of laccases in *Trametes versicolor* by aqueous wood extracts. *World J Microbiol Biotechnol.* 30:135–142.
- Bl'aquez P**, Casas N, Font X (2004). Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*, vol. 38, no. 8, pp. 2166–2172, 2004.
- Botton B**, Breton A, Fevre M, Gautier S, Guy P H, Larpent J P, Reymond P, Sanglier J J, Vayssier Y, Veau P (1990). *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle.* Paris: Masson.
- Bouchet P**, Guignard J.L, Pouchus Y.F, Villard J (2005). *Les champignons.* Mycologie fondamentale et appliquée. Ed. Masson. 2ème édition.

- Bouix M, Leveau J (1991).** *Les levures Ds* : Bourgeois C, Leveau J. *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3: 206-229.
- Bourbonnais R, Paice M, Reid I, Lanthier P, Yaguchi M (1995).** *Applied and Environmental Microbiology*. 61 :1876.
- Brinch D S, Pedersen P B (2002).** Toxicological studies on laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 35: 296-307.
- Burton S G (2003).** Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends Biotechnol*. 21 (12): 543-549.
- Camille D (2007).** *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition Lavoisier. 128-129.
- Carlson, A.; Justo, A.; Hibbett, D.S. 2014.** Species delimitation in *Trametes*: a comparison of ITS, RPB1, RPB2 and TEF1 gene phylogenies. *Mycologia*. 106(4):735-745.
- Casas N, Parella T, Vicent T, Caminal G, Sarra M (2009).** *Chemosphere*. 75: 1344- 1349.
- Castanera R, Pérez G, Omarini A, Alfaro M, Pisabarro AG, Faraco V, Amore A, Ramírez L (2012)** Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid state fermentation cultures. *Appl Environ Microbiol* .78(11):4037–4045
- Champagne P, Nesheim M, Ramsay J (2013).** A mechanism for NaCl inhibition of Reactive Blue 19 decolorization and ABTS oxidation by laccase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97:6263–6269.
- Chabasse D, de Gentile L, Brun S, Cimon B, Penn P (2002).** *Cahier de formation biologie médicale, les moisissures d'intérêt médical*. ed BIOFORMA. N°25. 11-110. *Chrysosporium*. Annales de l'ACFAS, Montréal. 143.
- Chen H T, Calabrese Barton S, Binyamin G, GAO Z, Zhang Y, Kim H H, Heller A A (2001).** Miniature biofuel cell. *Journal of the American Chemical Society*. 123: 8630-8631.
- Chenini H (2012).** Etude de la dégradation par voie photochimique de polluant organique «orange g » en milieu aqueux homogène et hétérogène. Université Mentouri Constantine.
- Chivukula M, Renganathan V (1995).** *Appl Environ Microb*. 61: 4374-4377.
- Claus H (2004).** Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35 (2004) 93–96.
- Couto S R, Herrera J (2006).** Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Advances*. 24: 500–513.
- Cordi L, Minussi R C, Freire R S, Durán N (2007).**Fungal laccase: Copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. *Afr. J. Biotechnol*. 6: 1255-1259.

Cosnier S (2000). Biosensors based on immobilization of biomolecules by electrogenerated polymer films. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 89: 127-138.

Crecchio C, Ruggiero P, Pizzigallo M R (1995). Polyphenol oxidases immobilized in organic gels: properties and applications in the detoxification of aromatic compounds. *Biotechnol Bioeng*. 48: 585–591.

Cristovao R, Tavares A, Ferreira L, Loureiro J, Boaventura R, Macedo E (2009). *Bioresource Technol*. 100: 1094- 1099.

D'Annibale A, Celletti D, Felici M, Dimattia E (1996). Substrat specificity of laccase from *lentinus edodes*. *Acta Biotechnologica*.16: 257-270.

Delarras C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris.

Das N, Chakraborty T K, Mukherjee M (2001). Purification and characterization of a growth-regulating laccase from *Pleurotus florida*. *J. Basic Microbiol*. 41:261–267.

Destain J (1998). Production, purification et caractérisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. Thèse doctorat. Université Gembloux.

Dornan J (2006). La citrouille : un légume en plein essor. *Division de l'agriculture Immeuble Jean Talon*, 12e étage, Ottawa, K1A 0T6 Canada, Octobre 2004, No 11-621, ISBN: 0-662-78141-4.

Dos Santos A, Candido J, Granhen C, Gomes Da Costa S (2004). *J Basic Microb*. 44: 288-295.

Dromer F, Bretagne S, Lortholary Olivier (2013). Mycoses Invasives et Antifongiques ; Rapport annuel d'activité. Centre national de référence. 47.

Dwivedi U, Singh P, Pandey V, Kumar A (2011). *J Mol Catal B- Enzym*. 68: 117-128.

Eggert C, Temp U, Eriksson K (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cimabannus*: Purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol*. 62: 1 151 - 1158.

El-Tarabily K A, Sivasithamparam K (2006). Potencial of yeast as bicontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*. (47):25-35.

Facelo J, Cruz O (2008). Banana skin: a novel material for a low-cost production of laccase, M.S. Thesis, Universitat Rovira I Virgili.

Facelo J, Cruz O (2009). Production of laccases by the white-rot fungus *Trametes pubescens* for their potential application to synthetic dye Treatment. Thèse de Doctorat. Department of Chemical Engineering, Université de Rovira i Virgili, Tarragona, Spain. ISBN: 978-84-692-7932-8.

FAO: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0500f/i0500f02.pdf>

Farah A K (2014). Changement climatique ou variabilité climatique dans l'Est algérien. Thèse de Magiqtter. Université des frères Mentouri (Constantine).

Fogel R, Limson JC (2013). Electrochemically predicting phenolic substrates suitability for detection by amperometric laccase biosensors. *Electroanalysis*. 25:1237–1246.

Fogle M.R, Douglas D.R, Jumper C.A, Straus D.C. (2007). Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia*.. 164. 49-56.

Freixo M, Karmali A, Arteiro J M (2012). Production, purification and characterization of laccase from *Pleurotus ostreatus* grown on tomato pomace. *World J Microbiol Biotechnol*. 28: 245–254.

Fu Y, Viraraghavan T (2001). *Bioresource Technol*. 79: 251-262.

Gao H, Wang Y, Zhang W, Wang W, Mu Z (2011). Isolation, identification and application in lignin degradation of ascomycetes GHJ-4. *Afr. J. Biotechnol*. 10:4166-4174.

Garrido-Jurado I, Ruano F, Campos M, Quesada-Moraga E (2011). Effects of soil treatments with entomopathogenic fungi on soil dwelling non-target arthropods at a commercial olive orchard. *Biological Control*. 59: 239-244.

Gaspiretti A, Chiara D (2012). Biochemical and structural characterisation of the copper containing oxidoreductases catechol oxidase, tyrosinase, and laccase from ascomycete fungi. *Espoo. VTT Science* 16: 124.

Gaudry- Morot J F (2010). Les lignines. *c.r.acad. agric. Fr.*1:96.

Georis J, Lomascolo A, Camarero S, Dorgeo V, Herpoel I, Asther M (2003). *Pycnoporus cinnabarinus* laccases: an interesting tool for food or non-food applications. *Meded Fac Landbouwkd Toegep Biol Wet*. 68: 263-266.

Gianfreda L, Xu F, Bollag J M (1999). “Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes,” *Bioremediation Journal*. 3:1–25.

Gonzalez T, Terron M, Zapico E, Yague S, Tellez A, Junca H, Gonzalez A (2003). Identification of a new laccase gene and confirmation of genomic predictions by cDNA sequences of *Trametes sp.* I-62 laccase family. *Centro de Investigaciones Biologicas, Velazquez 144, E-28006 Madrid, Spain*.

Gopinath K, Murugesan S, Abraham J, Muthukumar K (2009). *Bioresource Technol*. 100: 6295-6300.

Guiraud J P (1998). *Microbiologie alimentaire*. (edn) Dunod. Paris.

Gul R and Kumar R . Biodegradation of Congo Red from Liquid Medium using Fungi Isolated from Dye Contaminated Sites. *International Journal of Basic and Applied Biology*. 2016, pp. 40-45.

Gupta V, Suhas (2009). *J Environ Manage.* 90: 2313-2342.

Gusetu G (2010). Développement d'un microréacteur à base d'enzyme microencapsulée en vue d'un couplage en ligne à un système d'électrophorèse capillaire, Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en chimie, Université de Montréal, Montréal.

Gys M (2007). Characteristics and dyes biodegradation potential of rube lignolytic enzymes from white-rot fungus *crepidotus variabilis* isolated in coastal tanzania. *J. Sci.* Vol 33.

Hammami S (2008). Etudes de dégradation des colorants de textile par les procédés d'oxydation avancée, application à la dépollution des rejets industriels. Université Paris-Est. Institut Francilien des Sciences Appliquées.

Hamza M, Abdelhedi R, Brillas E, Sirés I (2009). *J Electroanal Chem.* 627: 41-50.

Han M J, Choi H T, Song H G (2005). Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Microbiology.* 43(6): 555–560.

Heather A, Vandertol Vanier (2000). The role of laccase from *coriolopsis gallica* in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Edmonton, alberta fall.*

Hartikainen S, Miettinen O, Hatakka A, Kähkönen M (2016). Decolorization of Six Synthetic Dyes by Fungi. *American Journal of Environmental Sciences* 2016, 12 (2): 77.85

Horgan K A, Murphy R A (2011). Pharmaceutical and Chemical Commodities from Fungi. *Fungi: Biology and Applications*, Second Edition. Edited by Kevin Kavanagh.

Houamel A (2012). Contribution à l'étude du dépérissement de la cédraie dans la région de Batna (cas du parc national du Belezma). Université de Tlemcen..

Intra A, Nicotra S, Riva S, Daniel B. (2005). Significant and unexpected solvent influence on the selectivity of laccase-catalyzed coupling of tetrahydro-2-naphthol derivatives. *Adv Synth Catal.* 347: 973-977.

Issa N (2009). Etude de l'oxydation de différents composés phénoliques par la laccase de *Myceliophthora thermophila* : application à la fonctionnalisation du chitosane. Thèse en procédés Biotechnologiques et Alimentaires ; Institut National Polytechnique de Lorraine ; Nancy, France.

Jones A (1998). Large-scale production of fungal inoculum. In: Young E, Akhtar M, editors. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. *John Wiley and Sons, Inc.* New York. 481-504.

Justo A. (2014). The Taxonomy of Turkey Tails (*Trametes*) and Related Polypores: One Genus or Too Many. *The Mycophile* 54, 8–10.

- Kacem Cahouche N** (2006). Production de catalase extracellulaire par un mutant d'*Aspergillus phoenicis* sur un milieu à base de farine de dattes déclassées. Thèse de Doctorat. Université des frères Mentouri. Constantine.
- Kacem Chaouche N.**, Maraihi Z, Destain J, Thonart P (2005). Study of catalase production by an *Aspergillus phoenicis* mutant strain in date flour extract submerged cultures. *Biotechnol Agron Soc Environ* 9: 173-178.
- Kachuei R**, Emami M, Naeimi B, Diba K (2012). Isolation of keratinophilic fungi from soil in Isfahan province, Iran. *Journal de Mycologie Médicale*. 22 (1): 8-13.
- Kahraman S S**, Gurdal I H (2002). Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*. 82(3): 215–217.
- Kalme S**, Jadhav S, Jadhav M, Govindwar S (2009). Textile dye degrading laccase from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. *Enzyme Microb Technol*. 44: 65–71.
- Kalra K**, Chauhan R, Shavez M, Sachdeva S (2013). Isolation of laccase producing *Trichoderma spp.* and effect of pH and temperature on its activity. *Int. J. Chem. Environ. Technol*. 5 (5): 2229–2235.
- Kapdan I**, Kargi F, McMullan G, Marchant R (2000). *Bioprocess Eng*. 22: 347-351.
- Kara- ali M** (2014). Isolement et caractérisation de souches levuriennes des milieux arides productrices de l'éthanol sur différents substrats. Thèse de Doctorat. Université des frères Mentouri. Constantine.
- Kaushik P**, Malik A (2009). *Environ Int*. 35: 127-141.
- Khambhaty Y**, Ananth S, Sreeram KJ, Rao JR, Nair BU (2015). Dual utility of a novel, copper enhanced laccase from *Trichoderma aureoviridae*. *Int J Biol Macromol*. 29(81): 69–75.
- Khan N**, Wilson B L (2003). An environmental assessment of mold concentrations and potential mycotoxin exposures in the greater Southeast Texas area. *J Environ Sci. Health A Tox. Hazard. Subst Environ Eng*. 38(12): 2759-2772.
- Khushal B**, Anne R, Praveen V (2010). Fungal laccases: Production, Function, and Application in food processing. *Enzyme Res*. 10:10.
- Kiiskinen L**, Ratto M, Kruus K (2004). Screening for novel laccase-producing microbes. *J Appl Microbiol*. 97: 640–646.
- Kilaru S**, Hoegger P, Ku'es U (2006) The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea*; it has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Curr Genet*. 50:45–60.
- Kirk O**, Borchert T V, Fuglsang C C (2002). Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*. 13: 345-351.

Knapp J, Vantoch-Wood E, Zhang F (2001). Use of Wood – rotting fungi for the decolorization of dyes and industrial effluents, In: *Fungi in Bioremediation*.

Kobayashia S, Higashimurab H (2003). Oxidative polymerization of phenols revisited. *Progress in polymer science*. 28: 1015-1048.

Kuhar F, Castiglia V, Levin L (2015). Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 104: 238-243.

Kunamneni A, Ballesteros A, Plou F J, Alcalde (2007). Fungal laccase– a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.

Lante A, Crapisi A, Krastanov A, Spetolli P (2000) Biodegradation of phenols by laccase immobilized in a membrane reactor. *Process Biochem*. 36: 51–58.

Lee T Y, Jung K H, Lee C H, Park Y H (1999). Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnology Letters*. 21(11): 965–968.

Levine W G (1965). Laccase, a review, In: *The biochemistry of copper* (Academic Press Inc., New York). 371-385.

Li D, Pang Z, Chen X, Luo L, Cai Y, Wei Q (2014). A catechol biosensor based on electrospun carbon nanofibers. *Beilstein J Nanotechnol*. 5: 346–354.

Liu D, Paterson R. C (2011). Molecular Detection of Human Fungal Pathogens. *CRC Press*.

Lorenzo M, Moldes D, Couto S R, Sanromán A (2002). Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*. 82(2): 109–113.

Lu S X, Jones C L, Lonergan G T (1996). Correlation between fungal morphology and laccase expression under the influence of cellobiose, in Proceedings of the 10th International Biotechnology Symposium, Sydney, Australia.

Madhavi V, Lele S (2009). Laccase: properties and applications. *Bioresour Technol*. 4(4):1694–1717.

Majolagbe O, Oloke J, Deka-Boruah H, Adetunji C, Bordoloi A, Borah M (2012). Extraction and purification of extracellular laccase from wild, mutants and hybrid strains of two white-rot fungus and its applications in decolourization and ligninolysis. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci*. 2(3): 998-1016.

Mamma D, Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P (2009). Biotechnological Potential of Fruit Processing Industry Residues. P. *Singh nee' Nigam, A. Pandey (eds.)*. Biotechnology for Agro-

Industrial Residues Utilisation. DOI :10.1007/978-1-4020-9942-7 14, *Springer Science+Business Media B.V.*

Mansur M, Arias M E, Copa-Patino J L, Flardh M, Gonzalez A E (2003). The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia*. 95: 1013-1020.

Martínez A, Speranza M, Ruiz-Dueñas F, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, et al (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol*. 8: 195-204.

Martins M, Ferreira I, Santos I, Queiroz M, Lima N (2001). *J Biotechnol*. 89: 91-98.

Mathiasen T E (1996). Laccase for improved beer storage. *Trends in Food, Science & Technology*.

Mayer A M, Staples R C (2002). Laccase : new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60: 551-565.

McKelvey S M, Murphy R A (2011). *Biotechnological Use of Fungal Enzymes. Fungi: Biology and Applications*, Second Edition.

Mendoza L (2011). Laccases from New Fungal Sources and Some Promising Applications Lund University Media-Tryck).

Meza J., Sigoillot J., Lomascolo A., Navarro D., Auria R. (2006) *J Agric Food Chem* 54: 3852–3858.

Michael M, John M (2006). *Broch Biology of Microorganisms*, (11th edn). Prentice Hall sanitaire. Edition Lavoisier. 128-129
Moreira M, Mielgo I, Feijoo G, Lema J (2000). *Biotechnol Lett*. 22:1499-1503.

Michniewicz A, Ullrich R, Ledakowicz S, Hofrichter M (2006). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69:682

Miessner M, Crescenzi O, Napolitano A, Prota G, Andersen S O, Peter M J (1991). Biophenyltetrols and dibenzofuranones from oxidative coupling of resorcinols with 4-alkylpyrocatechols : new clues to the mechanism of insect cuticle sclerotization. *Helvetica chimica Acta*. 74: 1205-1212.

Milaitil M, Traorei A S, Moletta R (2003). Détermination de la composition physico-chimique des feuilles de *Calotropis procera* provenant de Ouagadougou (Burkina Faso) et de N'Djaména (Tchad). *Sciences et Médecine. Rev. CAMES - Série A*. vol. 02.

Minussi R C, Pastore G M, Duran N (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol*. 13 (6-7): 205-216.

Mohammed H. A (2015). Biodecolorization of Congo red Dye by using two species of Fungi. *Mesop. environ. j*. Vol. 1, No.4:50-56.

- Moldes D**, Sanroman A (2006). Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. *World J Microbiol Biotechnol.* 22:1197–1204.
- Morozova O**, Shumakovich G, Gorbacheva M, Shleev S, Yaropolov A (2007). Laccases "bleu". *J Biochem.* 72 (10): 1136-1150.
- Munoz C**, Guillen F, Martinez A, Martinez A M (1997). Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology.* 34(1): 1–5.
- Naoto F** (2014). An isocratic toxic chemical-free mobile phase HPLC-PDA analysis of Malachite Green and Leuco-Malachite Green. Graduate school of Human Life Science. Osaka city University. Osaka 558-8585 Niladevi K N (2009). Ligninolytic enzymes in Biotechnology for agro-industrial residues. *Pandey*. DOI: 10.1007/978.
- Nicotra S**, Cramarossa M R, Mucci A, Pagnoni U M, Riva S, Forti L (2004). Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron.* 60: 595-600.
- Nishizawa Y**, Nakabayashi K, Shinagawa E (1995). Purification and characterization of laccase from white rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2. *J. Ferment. Bioeng.* 80:91-93.
- Nyanhongo G S**, Gomes J, Gübitz G, Zvauya R, Read J S, Steiner W (2002). Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Technology.* 84(3): 259–263.
- Nyanhongo G S**, Gübitz G, Sukyai P, Leitner C, Haltrich D, Ludwig R (2007). Oxidoreductases from *Trametes spp.* in Biotechnology: A Wealth of Catalytic Activity. *Food Technology and Biotechnology.* 45(3):250–268.
- Ohkuma M**, Yoshimasa M, Toru J, Toshiaki K (2001). Lignin degradation and roles of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation. *RIKEN Review.* 42.
- O'Malley D**, Whetten R, Bao W, Chen C, Sederoff R (1993). *Plant J.* 4: 751-757.
- Oubagha N** (2011). Decontamination des eaux contenant les colorants textiles et les adjuvants par des matériaux naturels et synthétiques. Thèse de magister. Université de Tizi Ouzou.
- Palmieri G**, Giardina, Bianco, Scaloni A, Capasso A, Sannia G (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry.* 272(50): 31301– 31307.
- Palmore G R**, Kim H H (1999). Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell. *J Electroanal Chem.* 565: 110–117.
- Pascault M** (2012). Les courges. Association des jardins familiaux de Landser.

Patel H, Gupte A, Gupte S (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a Basidiomycete fungal isolate *Pleurotus treatus* HP-1 under solid state fermentation. *Bioresources*. 4:268-284.

Piontek K, Antorini M, Choinowski T (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem*. 277: 37663-37669.

Ramsay J., Nguyen T. (2002). *Biotechnol Lett*. 24: 1757-1761.

Rispail P (2008). Champignons : principaux champignons impliqués en pathologie humaine mycoses chez l'homme. faculté de médecine montpellier-nîmes.

Roch L M (2010). *utilisation des enzymes lipase et laccase pour améliorer la blancheur d'une pâte désencrée de papier journal*. Université du Québec.

Rodriguez C S, Sanroman M A (2006). Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolorization ability. *Journal of Food Engineering*. 73: 388- 393.

Romero S, Bl'aquez P, Caminal Get al (2006). Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*,. 31, n1: 42–47.

Rojan P J (2009). Biotechnological Potentials of Cassava Bagasse. In *Biotechnology for agroindustrial de Poonam Singh nee' Nigam*. Springer.

Rosales E, Rodr'iguez Couto S, Sanrom'an A (2002). New uses of food waste: Application to laccase production by *Trametes hirsuta*. *Biotechnol. Lett*. 24:701-704.

Sadhasivam S, Savitha S, Swaminathan K, Lin F H (2008). Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochem*. 43: 736-742.

Saratale R G, Saratale J S. Chang and S.P. Govindwar(2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *J Taiwan Inst. Chem. E*, 42: 138-157. DOI: 10.1016/j.jtice.2010.06.006

Sathishkumar P, Murugesan K, Palvannan T (2010). Production of laccase from *Pleurotus florida* using agro-wastes and efficient decolorization of Reactive blue 198. *Journal of Basic Microbiology*. 50: 360–367.

Savitha S, Desai Gururaj B, Tennali Nityanand Channur A C, Anup Gouri Deshpande B P, Azhar M (2011). Isolation of laccase producing fungi and partial characterization of Laccase. Research Article. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng*. 1(4): 543-549.

Schnürer J, Clarholm M, Rosswall T (1985). Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biol. Biochem*. 17:611-618.

Scriban R (1998). *Biotechnologie*. Lavoisier 5 ed. Paris.

Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*. 43: 152- 159.

Shraddha S, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A (2011). Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Res*. 217861.

Sirinivasan C , D'Souza T M, Boominathan K, Reddy C A (1995). Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4274–4277.

Smith C, Coyea M, Munson A (2000). Soil carbon, nitrogen and phosphorus stocks and dynamics under disturbed black spruce forest. *Ecol. App.* 10 :75-78.

Srebotnik E, Hammel KE (2000). Degradation of nonphenolic lignin by the laccase 1-hydroxybenzotriazole system. *J Biotechnol.* 81(2-3):179-88.

Steffan S, Bardi L, Marzona M (2005). *Environ Int.* 31: 201-205.

Sunil S M, Renuka P S, Pruthvi K, Swetha M, Malini S, Veena S M (2011). Isolation, Purification and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus sp.* *Enzyme Res*. 11:7.

Sylvain N, Charron M, La citrouille sous toutes ses formes. <https://www.harmoniesante.com/HS/default.aspx?url=https://www.harmoniesante.com/HS/astuces.aspx?id=214>.

Talbi Y (2015).Dépérissement du châtaignier dans la région de Skikda (Kenouaa).Université de Skikda.

Thakker G D, Evans C S, Koteswara K (1992). Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 37(3): 321–323.

Thakur S, Gupte A (2014). Optimization and hyper production of laccase from novel agaricomycete *Pseudolagarobasidium acaciicola* AGST3 and its application in in vitro decolorization of dyes. *Ann. Microbiol.* 65(1):185-196.

Thurston C F (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140(1): 19–26.

Tingry S, Marc C, Christophe I (2013). Les biopiles enzymatiques pour produire de l'électricité . Institut Européen des Membranes, Université Montpellier 2, place E. Bataillon, CC 047, F-34095 Montpellier Cedex 5.l'actualité chimique - n° 373.

Tomsovsky M, Homolka L (2003) Laccase and other ligninolytic enzyme activities of selected strains of *Trametes spp.* from different localities and substrates. *Folia Microbiol.* 48:413–418.

Trella D, Tiwari R, Kumar A, Raghukumar C (2006). *Enzyme Microb Technol.* 38: 504-511.

Torres E, Bustos-Jaimes I, Le Borgne S (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*. 33: 47-54.

Tortora J, Funk B F, Case C (2003). *Introduction à la microbiologie*. (eds) ISBN. Canada.

Upadhyay P, Shrivastava R, Agrawal P k (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*. 6:15. DOI 10.1007/s13205-015-0316-3.

Valeriano V S, Silva A M, Santiago M F, Bara M T, Garcia T A (2009). Production of laccase by *Pycnoporus sanguineus* using 2,5-xylidine and ethanol. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(4): 790–794.

Vasconcelos A F, Barbosa A, Dekker R, Scarminio I, Rezende M I (2000). *Process Biochemistry*. 35: 1131.

Velazquez-Cedeño M, Farnet A M, Mata G, Savoie J M (2008). Role of *Bacillus spp.* in antagonism between *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum* in heattreated wheat-straw substrates. *Bioresource Technology*. 99: 6966-6973.

Viswanath B, Chandra M S, Pallavi H, Reddy B R (2008). Screening and assessment of laccase producing fungi from different environmental samples. *Afr. J. Biotechnol*. 7:1129-1133.

Walker G M, white N A (2011). Introduction to fungal physiology.. *fungi: biology and applications*, second edition. edited by kevin kavanagh.

Welham A (2000). The theory of dyeing (and the secret of life). *J. Soc. Dyers Colour*. 116: 140-143.

Wertz J L (2010). La lignine. *Document valbiom – gembloux agrobiotech*.

Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos S (2003). *Biotechnol Adv*. 22: 161-187.

Wong D (2009). *Appl. Biochem. Biotechnol*. 157: 174.

Xavier A M, Evtuguin D V, Ferreira R M, Amado F L (2001). Laccase production for lignin oxidase activity, in Proceedings of 8th International Conference on Biotechnology, Helsinki, Finland.

Xia H, Chunyan W, Wang L, Zhang R, Chen H (2014). Influence of temperature, pH and metal ions on guaiacol oxidation of purified laccase from *Leptographium qinlingensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 30(4):1285-1290.

Xu F (1996). Oxidation of phenols, aniline, and benzenthols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentiels as well as inhibition. *Biochemistry*. 35: 7608-7614.

- Yague S**, Terron M C, Gonzalez T (2000). Biotreatment of tanninrich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete *Coriolopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/ mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 14(10): 905–910.
- Yeşilada O**, Birhanli E, Ercan S, Özmen N (2014). Reactive dye decolorization activity of crude laccase enzyme from repeated-batch culture of *Funalia trogii*. *Turkish Journal of Biology.* 38: 103-110.
- Youcef-Ali M** (2014). Etude de l'activité anti-Candida albicans des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides. Thèse de Doctorat. Université des frères Mentouri. Constantine.
- Youn H D**, Hah C H, Kang S O (1995). Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 132:183-188.
- Zeghichi L** (2006). Etude des bétons basiques a base des différents granulats. Université Mohamed Khider Biskra.
- Zhixin W**, Yujie C, Xiangru L, Feng Z, Dabing Z, Zhiling L (2010). Production and Characterization of a Novel Laccase with Cold Adaptation and High Thermal Stability from an Isolated Fungus. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162: 280-294.
- Zille A**, Ramalho P, Tzanov T, Millward R, Aires V, Cardoso M (2004). *Biotechnol Progress.* 20: 1588-1592.
- Zouari H**, Mechichi T, Dhouib A, Sayadi S, Martínez AT, Martínez MJ (2006). Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: Decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme Microb.. Technol.* 39(1):141-148.

Annexes

Annexe 1 : Préparation des milieux de culture

- Gélose Sabouraud

La gélose Sabouraud est un milieu recommandé pour la culture des champignons.

La composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est :

Peptone de viande (bovin ou porcin).....	3g
Peptone de caséine (bovin).....	3g
Peptone de soja.....	3g
Extrait de levure.....	2g
Extrait de malt.....	1g
Glucose.....	19g
Phosphate monopotassique.....	0.5g
Phosphate disodique.....	0.5g
Agar.....	15g

Le pH est de 6.4. La présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le pH acide du milieu favorisent la croissance des levures et des moisissures (Delarras, 2007).

- Milieu PDA

Laver et couper en petits cubes 200g de pommes de terre non pelées. Les mettre dans un litre d'eau distillée et porter à l'ébullition pendant une heure. Ecraser, filtrer et compléter un litre.

Composition du milieu finale :

Extrait de pomme de terre.....	1000ml
Glucose.....	20g
Agar.....	15g

Stériliser 30 minutes à 110°C (Larpent, 1997)

La préparation de PDB est la même, sauf qu'il n'y a pas l'ajout de l'agar.

- **Milieu MEA**

Le Milieu MEA est un milieu recommandé pour la culture des mycètes.

La composition chimique de ce milieu en g/L d'eau distillée est :

Extrait de Malt..... 20 g

Glucose..... 15g

Peptone.....5g

Agar.....15g

Le pH du milieu est ajusté à 6.

Stériliser 15 min à L'autoclave à 120°C (Guiraud, 1996).

Le milieu ME a la même composition sauf qu'il est dépourvu d'agar.

- **Milieu Olga**

Le milieu Olga est un milieu sélectif, il utilisé mettre en évidence l'activité laccasique des mycètes (Budolla *et al.*, 2008).

La composition chimique de ce milieu en g/L d'eau distillée est :

Peptone.....3g

Glucose.....10g

KH₂PO₄.....0.6g

ZNSO₄.....0.001g

K₂HPO₄.....0.4g

FESO₄.....0.0005g

MNSO₄.....0.05g

MgSO₄.....0.05g

Le pH du milieu est ajusté à 6.

Stériliser 15 min à L'autoclave à 120°C (Budolla *et al.*, 2008).

Annexe 2: Préparation des réactifs, des tampons et des colorants

- Chloramphénicol

Le chloramphénicol est un antibiotique de la famille des phénicolés. Il a été isolé la première fois en 1947 de *Streptomyces venezuelae*, une bactérie du genre *Streptomyces*, il est utilisé dans les milieux de culture en mycologie pour empêcher la croissance des bactéries (Guiraud, 1998).

- Lactophénol bleu coton

Solution saturée de bleu coton

Bleu d'aniline..... 10mL

Glycérol.....10mL

Eau..... 80mL

Lactophénol.....100mL

- Préparation d'un tampon ABTS + acide tartrique

1.5g d'acide tartrique (MM 150) ;

100 ml de H₂O ;

Ajuster le pH avec du NaOH 10 N à 4.5 ;

Ajouter ensuite 0.2g d'ABTS (MM 514) ;

- Dosage de l'activité laccasique

1ml du milieu réactionnel ;

50µl de l'échantillon à doser ;

Lire l'absorbance à 414nm quelques minutes avant que l'absorbance ne dépasse 0.9.

- Tampon phosphate (10mM/ pH6.5)

KH₂PO₄.....1,74 g/L

K₂HPO₄.....1,36 g/L

- **Tampon acétate de sodium (10mM/ pH 4.5)**

Acétate de sodium 1,36 g/L

Acide acétique.....0,6ml/L

- **Tampon phosphate de sodium (100µmM/pH 6)**

NaH₂PO₄.H₂O13,8 g/L

Na₂HPO₄.2H₂O.....17,8 g/L

- **Tampon de lyse**

400mM Tris-HCL.... pH=8

60mM EDTA pH=8

150mM NaCl

1% SDS est ajouté par filtration

**Annexe3: Analyse morphologique et moléculaire des souches
fongiques**

- **Séquençage du gène ITS de *Cheatomium globosum***

```
AGGTGGTTTAAACGGCCGGAACCCGCAGCACGCCAGAGCGAGATGTATGCTACT
ACGCTCGGTGTGACAGCGAGCCCGCCACTGCTTTTCAGGGCCTGCGGCAGGCCGC
AGGTCCCCAACACAAGCCCGGGGCTTGATGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCA
TGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACT
GAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAG
AACCAAGAGATCC
```

Figure Séquence finale du gène *ITS* après avoir été corrigée à l'aide du programme « Bioedit »

**Rapport d'analyse de la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain
la-neuve**



Louvain-la-Neuve,
Le 11 mars 2014

Monsieur Ph. Thonart
Bio-Industrie
Passage des Déportés, 2
5030 Gembloux

RAPPORT D'IDENTIFICATION

Objet: identifications de 2 échantillons.
Vos références: ULG14/1606521/R
Nos références: DIV/14-024
Identifications: P Massart et C. Decock

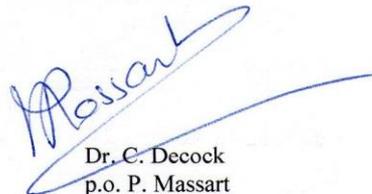
Cher Monsieur Thonart,

Suite à votre demande d'identification par analyse morphologique de 2 échantillons reçus ce 18 février dernier, vous trouverez ci-dessous nos résultats.

V/Réf.	N/Réf.	Identifications
D/10.02.14 P4/10.02.14	024A 024B	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> complex. mycélium stérile indéterminé

Pour ces deux échantillons, l'analyse par morphologie ne permet pas d'identification précise à l'espèce. Nous vous proposons, sur simple demande de votre part, une nouvelle analyse par technique de biologie moléculaire et séquençage de ces deux échantillons afin d'obtenir de meilleurs résultats d'identification.

En vous remerciant de la confiance que vous accordez à BCCMTM/MUCL, nous vous prions de croire, Monsieur Thonart, en l'expression de nos sentiments distingués.


Dr. C. Decock
p.o. P. Massart

Louvain-la-Neuve,
Le 29 avril 2014

Monsieur Ph. Thonart
Bio-Industrie
Passage des Déportés, 2
5030 Gembloux

RAPPORT D'IDENTIFICATION

Objet: identifications de 2 échantillons
Vos références: ULG14/1615130
Nos références: DIV/14-051
Identifications: P Massart et C. Decock

Cher Monsieur Thonart,

Suite à votre demande d'identification de 2 échantillons reçus ce 11 avril dernier, vous trouverez ci-dessous nos résultats.

V/Réf.	N/Réf.	Identifications
P4	051A	<i>Chaetomium</i> sp.
L	051B	<i>Trametes versicolor</i> (Linnaeus: Fries) Pilat

Ces deux souches ont été identifiées par analyse en biologie moléculaire par séquençages de la zone ITS de l'ADN ribosomal.

Les colonies de ces deux souches sont stériles.

Trametes versicolor (basidiomycète) sporule rarement en culture. L'identification moléculaire est toutefois robuste.

L'identification du *Chaetomium* demande une confirmation morphologique. La sporulation des *Chaetomium* peut-être retardée. Nous vous tiendrons informé du développement de fructifications fertiles.

En vous remerciant de la confiance que vous accordez à BCCMTM/MUCL, nous vous prions de croire, Monsieur Thonart, en l'expression de nos sentiments distingués.



Dr. C. Decock

Résumés

Nom: BENHASSINE

Prénom: Sara

Etude de la Laccase produite par des Mycètes isolés à partir de différents écosystèmes Algériens

ملخص

أسفر فحص العينات المأخوذة من غابات ذات انظمة بيئية مختلفة من شرق الجزائر على عزل 51 عزلة فطرية, حيث تم اختيار ثلاث عزل لقدرتهم على إنتاج اللكاز. سمحت الدراسة المورفولوجية و الجزيئية من تصنيفهم كالتالي:

Trichoderma longibrachiatum, Trametes versicolor, Chaetomium globosum

كشفت حركية إنتاج اللكاز في الوسط PDB أن *Chaetomium globosum* قادر على انتاج كمية معتبرة من هذه الإنزيم بعد 12 يوما من التخمير، حيث بلغت 550 U / L في القارورة ذات حجم 500 مل و 987 U / L في المخمر (20 لتر)، في حين أن *Trametes versicolor* أفرز بعد 8 أيام من التخمير 1400 U / L في القارورة و سُجل نشاط لكَازي بقيمة 833 U / L في المخمر (20 لتر). بالإضافة إلى ذلك، فقد تبين أن النشاط اللكَازي الذي يفرزها *Trametes versicolor* يصل إلى حده الأقصى في درجة حموضة تعادل 3 وعلى 55 درجة مئوية، في حين أن النشاط الإنزيمي الذي ينتجه *Chaetomium globosum* يصل إلى حده الأقصى عند 35 درجة مئوية، ودرجة حموضة محصورة بين 5 و 6.

كشفت التعريف الجزئي للكَاز الذي أجري على هلام الصفحة الأصلية أن *Trametes versicolor* يقوم بإفراز اثنين متشابهات انزيم مختلفة (Lac1 و Lac2) أما *Chaetomium globosum* فإنه ينتج ايزوانزيم واحدا فقط.

كشفت دراسة إنتاج اللكاز على الفضلات قدرة السلالتين على إفراز الأنزيم على جميع أوساط الاختبار، ومع ذلك، فإن أفضل الإنتاجات التي تم الحصول عليها كانت عند استعمال بقايا اليقطين كوسط غذائي. وفقا للمراجع ، يعتبر هذا العمل الأول من نوعه فيما يخص استخدام بقايا اليقطين كوسط غذائي و كمصدر وحيد للكربون لإنتاج اللكَاز.

أظهرت دراسة تحلل الأصباغ الاصطناعية، التي أجريت على وسط صلب و وسط سائل أن كلا السلالتين قادرة على تحليل بشكل فعال لونين: أخضر الملكيت وأحمر الكونغو.

وأكد هذا التحلل عن طريق التحليل الطيفي و HPLC على المستخرجات اللكَازية الناتجة عن *Trametes versicolor* و *Chaetomium globosum* في وجود الأصباغ المذكورة آنفا.

تم تحليل اللون أحمر الكونغو بنسبة 100% بواسطة اللكَاز التي يفرزها *Trametes versicolor* بعد 45 دقيقة من التفاعل أخضر الملكيت بعد 60 دقيقة. في المقابل، سمحت اللكَاز المفروزة من طرف *Chaetomium globosum* بتحليل 100% اللون أخضر الملكيت وأحمر الكونغو بعد 55 دقيقة من التفاعل. تعتبر هذه النتائج واعدة ، خاصة أنه لم يتم دراسة إمكانية *Chaetomium globosum* على تحليل اللونين أخضر الملكيت وأحمر الكونغو من قبل، وهو ما يعتبر تقدما في مجال تطبيقات التكنولوجيا الحيوية.

كلمات مفتاحية: لكَاز ، بقايا اليقطين ، أخضر الملكيت ، أحمر الكونغو.

Trichoderma longibrachiatum, Trametes versicolor, Chaetomium globosum

Abstract

51 fungal isolates were isolated from forests in eastern Algeria (Kenouaâ, Belezma and Chettaba), three of them showed positive laccase activity. The morphological and molecular study carried out allowed identifying them as *Trichoderma longibrachiatum*, *Trametes versicolor* and *Chaetomium globosum*.

The production kinetics of laccase on PDB medium exposed that *Chaetomium globosum* produced a large amount of laccase after 12 days of fermentation, reaching 550 U / L in Erlens and 987U / L in 20 L fermenter, while *Trametes versicolor* secretes after 8 days of fermentation 1400 U / L of laccasic activity in Erlens and 833U / L in fermenter (20L). Furthermore, the laccase activity secreted by *Trametes versicolor* has been shown to be at its maximum at pH 3 and at 55 ° C., whereas the enzymatic activity produced by *Chaetomium globosum* reaches its maximum at 35 ° C. and at pH between 5 and 6.

The partial characterization of laccase performed on a Native page gel revealed two different isozymes produced by *Trametes versicolor* (Lac1 and Lac2) and a single isozyme produced by *Chaetomium globosum*.

The study of laccase production using waste media showed the ability of *Trametes versicolor* and *Chaetomium globosum* to produce laccase on all media tested, however, the optimum of laccase produced by *Trametes versicolor* (350U / L) and by *Chaetomium globosum* (400 U / L) is obtained on pumpkin waste medium. **According to the literature consulted, this work is the first to use these two fungal strains for the production of laccase using only the pumpkin waste as the exclusive source of carbon.**

The study of synthetic dyes degradation carried out on solid medium and on submerged medium, demonstrated that selective strains degrade two dyes effectively: Malachite Green and Congo Red. Degradation was followed by spectrophotometric analysis and HPLC. It was found that 100% decolorization of Congo Red by *Trametes versicolor*'s laccase was complete after 45 minutes of reaction and Malachite green after 60 minutes. On the other hand, the laccasic extract from *Chaetomium globosum* allowed a 100% discoloration of Malachite Green and Congo Red after 55 minutes of reaction. **This result can be promising, and considerable progress in the field of biotechnological applications.**

The literature consulted did not mention the ability of *Chaetomium* species to degrade Malachite Green or Congo Red. As a result, this work is considered original.

Keywords: Laccase, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trametes versicolor*, *Chaetomium globosum*, pumpkin waste, Malachite Green, Congo Red

Nom et Prénom : BENHASSINE Sara

Date de soutenance : 03/05/2017

Thème: Etude de la Laccase produite par des Mycètes isolés à partir de Différents Ecosystèmes Algériens

Résumé :

L'exploration des échantillons provenant de trois forêts de différents écosystèmes situées à l'Est Algérien (Kenouaâ, Belezma et Chettaba) a permis d'isoler 51 isolats fongiques, dont trois ont été sélectionnés comme producteurs potentiels de laccase. L'identification morphologique et moléculaire des isolats a montré qu'il s'agit de *Trichoderma longibrachiatum*, de *Trametes versicolor* et de *Chaetomium globosum*. Le test préliminaire de production de laccase sur milieux submergés en Erlens a permis de sélectionner *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* comme étant les souches les plus productrices de laccase sur le milieu Potato Dextrose Broth (PDB) qui s'avère le milieu favorable. La cinétique de production de laccase sur milieu PDB a révélé que *Chaetomium globosum* est capable de produire une quantité importante de laccase après 12 jours de fermentation, atteignant 550 U/L en Erlens et 987U/L en fermenteur de 20 L, alors que *Trametes versicolor* sécrète après 8 jours de fermentation 1400 U/L d'activité laccasique en Erlens et 833U/L en fermenteur (20L). En outre, il a été montré que l'activité laccasique sécrétée par *Trametes versicolor* est à son maximum à pH 3 et à 55°C, alors que l'activité enzymatique produite par *Chaetomium globosum* atteint son maximum à 35°C et à pH entre 5 et 6.

La caractérisation partielle des laccases effectuée sur gel Native page a mis en évidence deux isoenzymes différents sécrétés par *Trametes versicolor* (Lac1 et Lac2) et un seul isoenzyme produit par *Chaetomium globosum*.

L'étude de la production de laccase sur milieux à base de déchets agroalimentaires a révélé la capacité de *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum* à sécréter l'enzyme sur tous les milieux testés cependant, les meilleures productions par *Trametes versicolor* (350U/L) et par *Chaetomium globosum* (400 U/L) sont obtenues sur milieu à base de déchets de citrouille. D'après la littérature consultée, ce travail est le premier à avoir utilisé ces deux souches fongiques pour la production de laccase en utilisant comme seule source de carbone les déchets de citrouille.

L'étude de la dégradation des colorants synthétiques, effectuée sur milieu solide et sur milieu submergé a démontré que les deux souches dégradent efficacement deux colorants: Vert de Malachite et Rouge Congo. Cette dégradation a été suivie par l'analyse spectrophotométrique et de l'HPLC sur des extraits laccasiques produits par *Chaetomium globosum* et *Trametes versicolor* en contact avec les deux colorants susmentionnés. Il a été constaté qu'une décoloration à 100% du Rouge Congo par la laccase sécrétée par *Trametes versicolor* est obtenue après 45 minutes de réaction et après 60 minutes pour le vert de Malachite. En revanche, l'extrait laccasique issu de *Chaetomium globosum* a permis une décoloration à 100% du Vert de Malachite et du Rouge Congo après 55 minutes de réaction.

A notre connaissance, la mise en évidence de la dégradation des colorants testés par *Chaetomium globosum* est une première, aucune étude n'a mentionné la capacité des espèces du genre *Chaetomium* à dégrader le Vert de Malachite ou le Rouge Congo. Ces résultats sont prometteurs et sont considérés comme une avancée dans le domaine des biotechnologies appliquées.

Mot clés : Laccase, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trametes versicolor*, *Chaetomium globosum*, déchets de citrouille, Vert de Malachite, Rouge Congo.

Laboratoire de Recherche : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM)

Président de jury: Mr. HAMIDECHI M A.

Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine.

Directeur de thèse: Mr. KACEM CHAOUCHE N.

Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine.

Examineurs: Mr. DEHIMAT L.

Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine.

Mr. RIBA A.

Prof. Univ. M'Hamed Bougara-Boumerdès.