



Université Mohamed Khider de Biskra

Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Département des sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Référence ..... / 2021

# MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Biochimie Fondamentale et Appliquée

---

Présenté et soutenu par :

**HAMDI Med Amine**

Le: lundi 28 juin 2021

## **Isolement des champignons filamenteux extrêmophiles et leur contribution à la bioremédiation**

---

### **Jury :**

Titre	BENGUERAICHI Fatiha	MCA	Univ Biskra	Président
Titre	DENDOUGA Wassila	MCB	Univ Biskra	Rapporteur
Titre	AGLI Abdenacer	Pr	Univ Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020/2021

# Remerciements

Je tiens à remercier infiniment et exprimer mon profond respect à mon encadreur, Mme.DENDOUGA Wassila qui m'a guidé et aidé durant ce travail, pour sa patience, sa disponibilité, ses qualités humaines, et surtout pour ses conseils.

J'exprime également mes sincères remerciements à Mme.BENGUERAICHI pour l'honneur qu'elle/il m'a fait en acceptant de présider ce jury.

Je voudrais également adresser mes remerciements à Pr.AGLI d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mon respect à Mme.BOUKHAROUBA, Mme.BENGUERAICHI et Mme.TRABSA pour les compréhensions et les conseils qu'elles nous ont apportés au cours de notre étude.

# Dédicaces

Je dédie ce travail

A ma très chère grand-mère

Tu étais la mère, le père, l'ami et tous dans ma vie. Aucun mot ne peut exprimer mes sentiments, mon amour chaleureux à toi. Que Dieu te fasse miséricorde et que ta demeure le paradis.

A ma chère mère

Vous avez toujours été à mes côtés pour me soutenir, m'encourager, et me guider. Ton affection me couvre, ta présence à mes côtés a toujours été la source de ma force pour affronter tous les obstacles. Je ne trouve pas les mots justes pour exprimer ma gratitude pour vos sacrifices et vos prières.

A mes chers frères et sœurs

Mebark, Hind, Abir et Islem pour leur soutien et leur encouragement tout au long de mon parcours universitaire.

A tous mes amis proches

KRIM Wafa, BAMBRA Moussa, DERARDJA Imene, BOUKHEISSA Amar, OSMANE Nassim, SAOULI Khaoula. Il dit qu'un meilleur ami peut te faire sourire même dans les moments les plus tristes de ta vie. A tous mes amis sans exception, je vous remercie infiniment pour tous vos soutiens dans les moments difficiles et d'être toujours à côté de moi toujours.

## Sommaire

<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>II</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>III</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>CHAPITRE 1 : CHAMPIGNONS FILAMENTEUX</b>	
<b>1.1. Classification .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Développement des champignons filamenteux .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Mode de vie des champignons filamenteux .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4. Champignons extrémophiles.....</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE 02 : ENZYMES PRODUITES PAR DES CHAMPIGNONS EXTREMOPHILES</b>	
<b>2.1. Ligninases produites par des champignons extrémophiles.....</b>	<b>6</b>
2.1.1. Oxydases.....	6
2.1.1.1. Phénol oxydase.....	6
2.1.2. Peroxydases.....	6
<b>CHAPITRE 03 : BIOREMEDIATION</b>	
<b>3.1. Bioremédiation par champignons (mycoremédiation) .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2. Techniques de la mycoremédiation.....</b>	<b>9</b>
3.2.1. La biodégradation .....	10
3.2.2. La bioabsorption.....	10
3.2.3. La bio conversion .....	10
<b>3.3. Facteur influençant la mycoremédiation .....</b>	<b>10</b>
<b>DEUXIEME PARTIE/ PARTIE EXPERIMENTALE</b>	
<b>CHAPITRE 04 : MATERIEL ET METHODES</b>	
<b>4.1. Méthode de travaille.....</b>	<b>11</b>
4.1.1. Analyse du sol .....	11
4.1.2. Isolement des champignons filamenteux extrémophiles .....	11
4.1.3. Identification et sélection des champignons filamenteux halophiles .....	11
4.1.4. Criblage fongique pour la détection des activités ligninolytiques .....	12
4.1.4.1. Test de décoloration des colorants.....	12
4.1.4.2. Test de l'acide gallique.....	12
4.1.4.3. Test au gaïacol.....	13
4.1.5. Production et purification des enzymes .....	13
<b>CHAPITRE 05 : RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>14</b>
<b>5.1. Analyse des sols .....</b>	<b>14</b>
5.1.1. pH.....	14
5.1.2. L'humidité.....	14
5.1.3. Salinité.....	15
5.1.4. Carbone organiques.....	15
<b>5.2. Isolement des champignons filamenteux extrémophiles.....</b>	<b>15</b>
<b>5.3. Identification des champignons.....</b>	<b>16</b>
5.3.1. Identification préliminaire.....	16
5.3.2. Identification moléculaire .....	18
<b>5.4. Détection des activités ligninolytiques.....</b>	<b>20</b>
<b>5.5. Production et purification des enzymes .....</b>	<b>23</b>
5.5.1. Laccase .....	23
5.5.2. Peroxydase .....	23
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>24</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>25</b>
<b>RESUME</b>	

## Liste des tableaux

<b>TABLEAU 1.</b> RESULTATS D'ANALYSES D'ECHANTILLON DU SOL.....	14
<b>TABLEAU 2.</b> PRESENTATION DES CONDITIONS UTILISEES POUR L'ISOLEMENT DES CHAMPIGNONS EXTREMOPHILES.....	15
<b>TABLEAU 3.</b> IDENTIFICATION MACRO/MICROSCOPIQUE DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX EXTREMOPHILES PRESENTE DANS LE TRAVAIL DE .....	16
<b>TABLEAU 4.</b> RESULTATS DE L'IDENTIFICATION DES ESPECES ETUDIES A L'AIDE DE L'OUTIL D'ANALYSE BLAST DU NCBI .....	19
<b>TABLEAU 5.</b> TESTS DE RBBR, REACTION AU GAÏACOL ET A L'ACIDE GALLIQUE POUR CHAQUE ISOLAT.....	21

## Liste des figures

<b>FIGURE 1.</b> CLASSIFICATION DES CHAMPIGNONS. ....	3
<b>FIGURE 2.</b> TERMINOLOGIE DES EXTREMOPHILES EN FONCTION DE LA TEMPERATURE ET DU PH. ....	5
<b>FIGURE 3.</b> SCHEMA DE LA DEGRADATION DE LA LIGNINE PAR LES CHAMPIGNONS DE LA POURRITURE BLANCHE. ....	8
<b>FIGURE 4.</b> SCHEMA MONTRANT UNE SERIE DE DILUTIONS ET ETALEMENT SUR BOITES DE PETRI (PDA). ....	12
<b>FIGURE 5.</b> INTERVALLE DE PH. ....	14
<b>FIGURE 6.</b> INTERVALLE DE LA TENEUR D'HUMIDITE (%). ....	15
<b>FIGURE 7.</b> REPRESENTATION DE LA CROISSANCE APICALE DE DIFFERENTES ESPECES EN FONCTION DE LA TEMPERATURE. ....	18
<b>FIGURE 8.</b> TEST D'HALO TOLERANCE RESULTATS BASES SUR LE POIDS FINAL EN (MG) APRES 15 JOURS DE CROISSANCE DE LA MASSE DES CHAMPIGNONS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SEL [5-25 %] (LE PH ET LA TEMPERATURE ONT ETE MAINTENUS CONSTANTS). ....	20

## Liste des abréviations

- Lac:** laccase.
- LiP:** lignine peroxydase.
- MnP:** peroxydase de magnésium.
- VP:** peroxydase polyvalente.
- LMS:** système laccase-médiateur.
- pH :** potentiel d'Hydrogène.
- °C :** degré Celsius.
- NaCl :** chlorure de sodium.
- PDA :** Potato Dextrose Agar.
- RPM:** Rotations par minute.
- ADN:** Acide désoxyribonucléique.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peroxyde d'hydrogène.
- MEA:** Gélose à l'extrait de malt.
- RBBR:** Bleu brillant remazol R.

# **Introduction**

## Introduction

La pollution du sol est le résultat des activités humaines et des industries lourdes, en particulier l'industrie pétrolière et l'industrie chimique. Les polluants qui sont principalement des composés organiques (hydrocarbures, phénols, chlorures, etc.) et des métaux lourds peuvent être détecté d'une part par des indicateurs physicochimiques traités par différentes méthodes de remédiation ; chimique, physique et biologique et d'une autre part par des indicateurs biologiques. Dans le premier temps, les bactéries étaient les seuls microorganismes utilisés dans le processus de la bioremédiation, après des années les recherches scientifiques sont orientées vers les champignons filamenteux qui sont plus avantageux que les bactéries dans ce domaine (Benchouk, 2017).

Le principe de la bioremédiation repose sur la capacité d'un microorganisme à interagir avec les polluants à base de carbone et à les convertir en substances moins toxiques ou non toxiques, ainsi qu'à en tirer de l'énergie (Hasan, 2018). Les champignons filamenteux ou les moisissures sont des microorganismes cosmopolites, ayant un grade potentiel d'adaptation dans les différents habitats, et même aux environnements extrêmes (haute température, haute pression, pH acide, etc.), leur adaptation aux conditions environnementales est rendue à leur patrimoine génétique particulier (Benchouk, 2017).

En effet, les champignons filamenteux sont considérés comme une source importante pour le développement de nouveaux procédés biotechnologiques impliqués dans le traitement des polluants, pour cela plusieurs études ont été menées afin de comprendre le mécanisme par lequel les biomolécules d'origine fongique interviennent dans le processus de la bioremédiation (Thiebaud-Roux, 1995 ; Eichler, 2001 ; Leghlimi, 2013).

Les champignons du sol possèdent des capacités uniques de décomposition des composants chimiques, qui constituent une source de carbone importante pour ces microorganismes.

Le présent document, qui représente une synthèse des articles scientifiques, dont leur objectif est l'exploitation des champignons filamenteux isolés des milieux extrêmes dans la bioremédiation est divisé en deux parties principales :

- Partie bibliographie divisée en trois chapitres essentiels, dans le premier chapitre nous avons présenté quelques notions de base sur les champignons filamenteux

extrêmophiles, tandis que le deuxième chapitre est consacré aux enzymes intervenant dans la bioremédiation qui est présenté dans le troisième chapitre.

○ Partie expérimentale ; elle même comporte deux chapitres, où dans le chapitre matériel et méthodes on a présenté les différentes méthodes suivies pour l'isolement, l'identification et la sélection des champignons filamenteux extrêmophiles, ainsi que les tests nécessaires pour la détection des activités enzymatiques intervenant dans la bioremédiation. Dans le deuxième chapitre, qui est résultats et discussion, on a essayé d'analyser et de discuter les résultats des différents travaux effectués sur l'exploitation des champignons filamenteux isolés des milieux extrêmes dans la bioremédiation.

**Première partie :**  
**Synthèse bibliographique**

# **Chapitre 01 :**

## **Champignons filamenteux**

## Chapitre 1 : Champignons filamenteux

Les champignons sont des organismes eucaryotes qui rentrent sous-règne dikarya, soit unicellulaires (levuriforme) ou bien pluricellulaire d'aspect filamenteux. Ils sont rencontrés également sous le nom de mycète qui appartient au royaume des fungi, la paroi cellulaire des mycètes est composée de glycoprotéines et de polysaccharides, principalement des glucanes et de chitine (Bowman et Free, 2006 ; Fatima, 2017 ; Bardin, 2020).

Les champignons filamenteux ou les eumycètes (champignon vrai) sont des microorganismes achlorophylles; se nourrissent par l'absorption et l'utilisation de la matière organique (source de carbone) élaborés par d'autres organismes autotrophes (hétérotrophe) (Redecker, 2002 ; Fatima, 2017 ; Dufresne, 2018 ; Ajar *et al.*, 2021). Sont des thallophytes dépourvus d'organes végétatifs évidents : pas de tige, pas de feuilles, pas de racines. L'hyphe polycaryon se développe par l'extension et la ramification de la pointe qui continuent de se ramifier et de subir une fusion pour former un mycélium interconnecté (Hickey *et al.*, 2002 ; KACHOUR, 2005).

### 1.1. Classification

La classification des champignons filamenteux est basée sur la combinaison des considérations morphologiques, les caractères phylogénétiques et les méthodes de reproduction voir la figure 1 (Guarro *et al.*, 1999 ; Redecker, 2002).

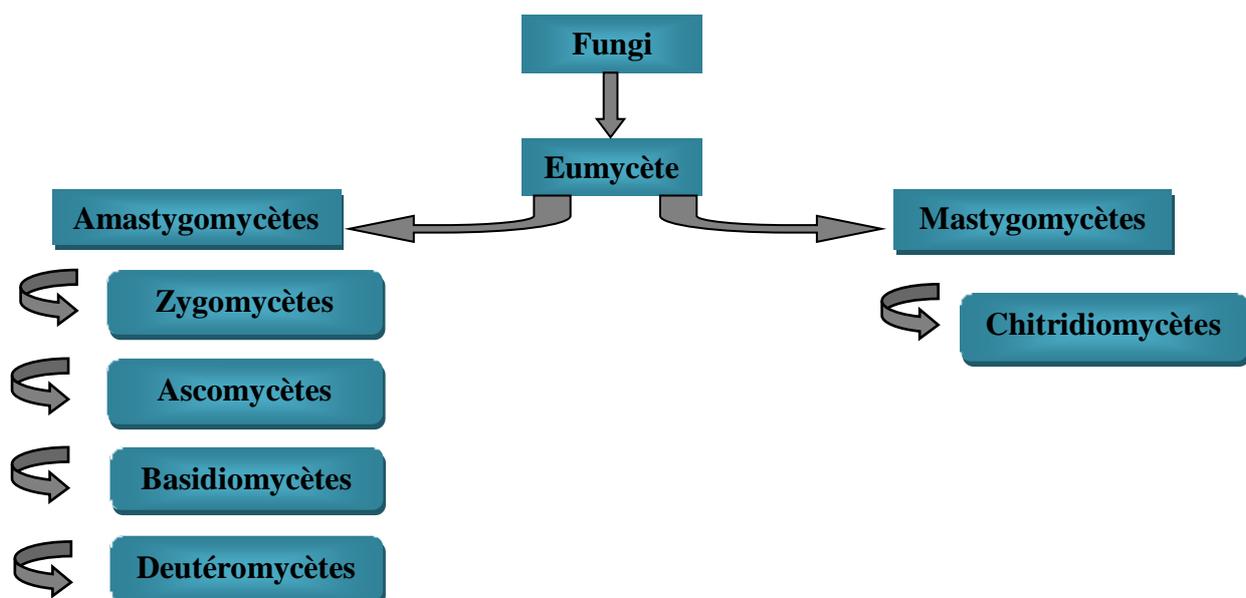


Figure 1. Classification des champignons (Berbee et Taylor, 2001).

## 1.2. Développement des champignons filamenteux

L'appareil végétatif des champignons est un thalle composé de ramification filamenteux, dont l'ensemble de ces hyphes (filaments) constitue le mycélium, ils se reproduisent grâce aux spores, ceux-ci proviennent de la reproduction sexuée (champignons téléomorphe) ou de la reproduction asexuée (champignons anamorphe), certains champignons peuvent exister sous les deux formes de reproductions, ils sont appelés des holomorphes (Calvez, 2009).

Le cycle de vie des champignons filamenteux commence par la germination de spores dans un environnement humide et riche en nutriments forment les tubes de germination. Ces derniers se forment et s'étendent pour former des cellules filamenteuses multinucléées appelées hyphes, les nouvelles formes d'hyphes sont reliées les unes aux autres par une fusion cellulaire appelée anastomose cette croissance d'hyphes et d'anastomose conduit à la formation d'un réseau complexe de mycélium filamenteux, au fur et à mesure que la pointe de la racine grandit, le mycélium s'allonge et se sépare en objets séparés par des partitions appelées «septums» (Hickey *et al.*, 2002 ; Nguyen, 2007). Ce dernier est un organe qui envahit l'environnement, ce qui permet aux champignons filamenteux d'explorer l'environnement pour obtenir ses ressources nutritionnelles lorsque les ressources sont rares ou que certaines conditions sont remplies, la structure reproductrice va lancer sa différenciation à partir du mycélium, ceux-ci proviennent de la reproduction sexuée (plasmogamie, caryogamie et méiose) ou de la reproduction asexuée (Nguyen, 2007 ; Calvez, 2009), les ascomycètes peuvent également former des conidiophores produisant des spores asexuées et / ou des asques produisant des spores sexuées. De nombreuses espèces de basidiomycètes forment des fructifications macroscopiques, qui sont composées d'hyphes aériens denses qui peuvent produire des spores sexuelles (Bardin, 2020). Tandis que, certains n'ont pas de capacité de reproduction sexuée, ils sont classés parmi les Deutéromycètes (Calvez, 2009).

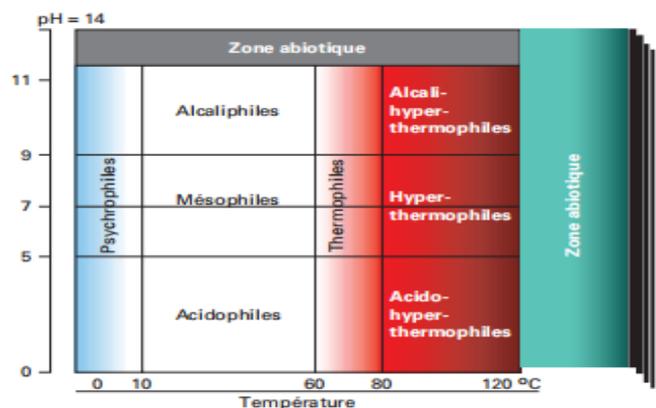
## 1.3. Mode de vie des champignons filamenteux

Les champignons utilisent des stratégies dans leur mode de vie en trois grandes catégories principales allant de la saprophyte, le parasitisme à la symbiose (Querellou et Guezennec, 2010). La plupart des espèces de champignons filamenteux se nourrissent de matière organique morte par la sécrétion des enzymes extracellulaires dans le milieu, il s'agit

du mode saprophyte, où ces enzymes servent à la dégradation des molécules résistantes et les polymères (Demirjian *et al.*, 2001 ; Boddy *et al.*, 2007 ; Bardin, 2020).

#### 1.4. Champignons extrêmophiles

Les environnements modérés sont importants pour le maintien de la vie. Un environnement modéré est un environnement dont le pH est proche de la neutralité, une température comprise entre 20 et 40°C, une pression atmosphérique de 1 ATM et des niveaux adéquats d'eau, de nutriments et de sels disponibles, on trouve également dans la nature de nombreux environnements extrêmes, tels que les sources acides ou chaudes, les lacs salés et/ou alcalins, qui sont trop rudes pour que la vie normale puisse exister tout condition environnementale qui peut être perçue comme dépassant la fourchette normale acceptable est une condition extrême, une variété de microorganismes cependant, survit et se développe dans de tels environnements ces organismes, connus sous le nom d'extrêmophiles, non seulement tolèrent des conditions extrêmes spécifiques, qui développant des diverses stratégies d'adaptation ces microorganismes sont présenté dans la figure 2 (Demirjian *et al.*, 2001 ; Satyanarayana *et al.*, 2005 ; Querellou et Guezennec, 2010 ; Ajar *et al.*, 2021).



**Figure 2.** Terminologie des extrêmophiles en fonction de la température et du pH (Querellou et Guezennec, 2010).

**Chapitre 02: Enzymes  
produites par des  
champignons  
extrêmophiles**

## Chapitre 02 : Enzymes produites par des champignons extrêmophiles

Les champignons ont une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet de dégrader une large gamme de substances. Les enzymes sont des protéines ayant une capacité catalytique spécifique en tant que catalyseurs, où en augmentant la vitesse d'une réaction sans subir elles-mêmes d'altération permanente, ces enzymes sont exploitées dans plusieurs domaines industriels et biotechnologiques tels que la décomposition des polluants (Demirjian *et al.*, 2001 ; Shen *et al.*, 2002 ; Ajar *et al.*, 2021).

### 2.1. Ligninases produites par des champignons extrêmophiles

Les champignons extrêmophiles sont considérés comme une source importante de métabolites stables dans des conditions extrêmes, en particulier les enzymes lignolytiques:

#### 2.1.1. Oxydases

C'est le principal système enzymatique de dégradation du polymère ligneux qui regroupe quatre principaux types d'enzymes et peut dégrader complètement la lignine : la lignine peroxydase (LiP), le manganèse peroxydase (MnP), la peroxyde multifonctionnel Enzyme (VP) et le phénol oxydase ou laccase le mécanisme enzymatique est présenté dans la figure 3.

##### 2.1.1.1. Phénol oxydase

###### ➤ Laccase

La laccase (EC 1.10.3.2) est une oxydase de cuivre bleue qui peut catalyser l'oxydation à un électron des phénols, des amines aromatiques et d'autres substrats riches en électrons, tout en réduisant l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O, en présence de certains substrats auxiliaires, la laccase peut également oxyder des substances non phénoliques (Cullen et Kersten, 2004 ; Dashtban *et al.*, 2010).

#### 2.1.2. Peroxydases

Le champignon de la pourriture blanche sécrète deux hème peroxydases extracellulaires (la lignine peroxydase LiP et le magnésium peroxydase MnP) (Tien M *et al.*, 1986). Ce sont des glycoprotéines glycosylées avec un groupe prosthétique de fer protoporphyrine, qui peuvent catalyser l'oxydation dépendante de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Glenn et Gold, 1983 ; Tien et Kirk, 1983 ; Wariishi et Gold, 1990 ; Nie *et al.*, 1999).

➤ **Magnésium peroxydase**

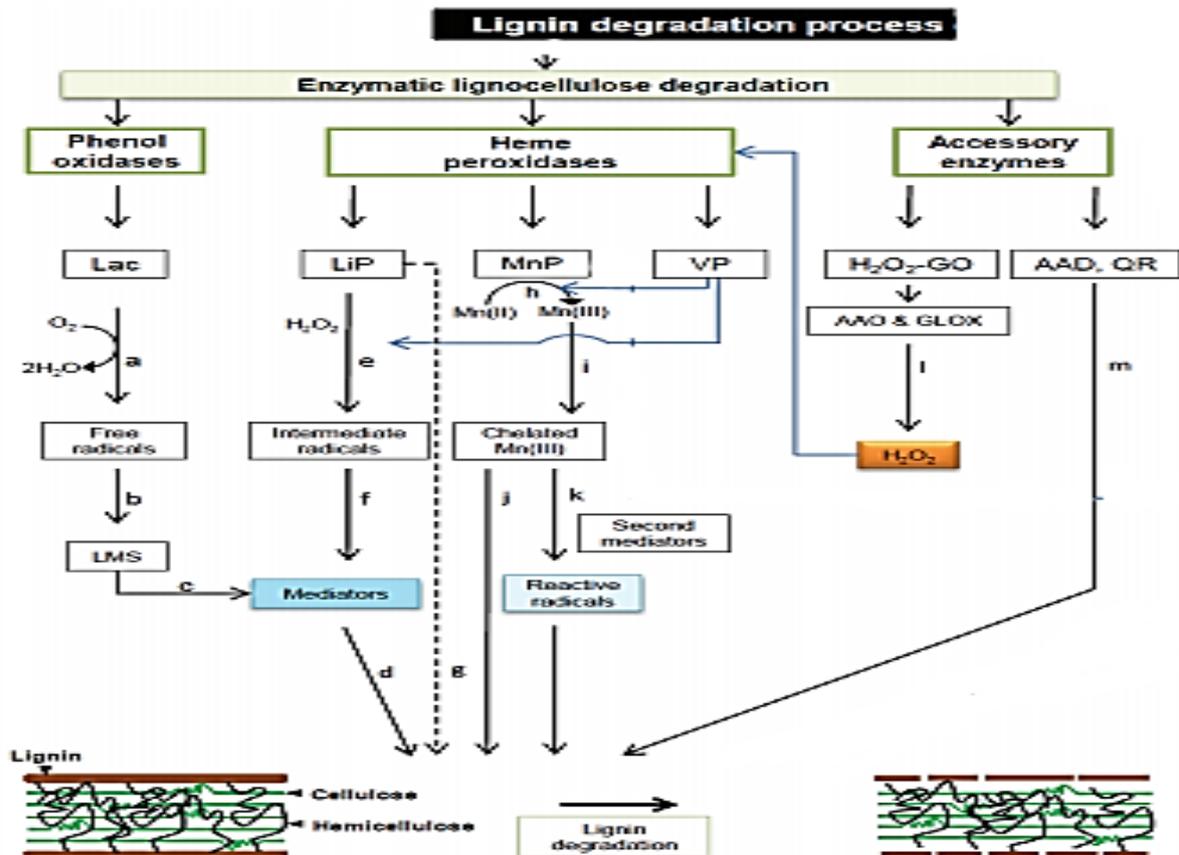
Le MnP (EC 1.11.1.13) oxyde préférentiellement le  $Mn^{2+} \rightarrow Mn^{3+}$ , le  $Mn^{3+}$  est stabilisé par d'autres agents tels que l'acide oxalique, lui-même également excrété par les champignons, le  $Mn^{3+}$  agit comme un milieu redox hautement réactif. Par conséquent, les MnP peuvent oxyder et dépolymériser leurs substrats naturels, à savoir la lignine (Van Aken, *et al.*, 1999 ; Wesenberg *et al.*, 2003 ; Dashtban *et al.*, 2010).

➤ **Lignine peroxydase**

Les LiP (EC 1.11.1.14) ayant un rôle dans la dégradation de la lignine est oxyde les fragments traités par le MnP (Kersten, 1985 ; Umezawa et Higuchi, 1987); oxydent les substrats (transferts des électrons). Contrairement aux autres peroxydes, comme le MnP, le LiP est capable d'oxyder des substrats aromatiques non-phénoliques et ne nécessite pas la participation des médiateurs (Wariishi et Gold, 1990 ; Heinfling, *et al.*, 1998 ; Cullen et Kersten, 2004 ; Dashtban *et al.*, 2010).

➤ **Peroxydase versatile**

Un troisième groupe de peroxydases, les peroxydases versatile (VP), a été récemment reconnu, qui peut être considéré comme hybride entre MnP et LiP, capables d'oxyder les substrats typiques des autres peroxydases (Heinfling *et al.*, 1998 ; Heinfling, *et al.*, 1998 ; Mester et Field, 1998 ; Dashtban *et al.*, 2010).



Les laccases couplent la réduction électronique du dioxygène en deux molécules d'eau avec l'oxydation d'une grande variété de substrats tels que la lignine (Figure 3, a), conduisent à la formation de radicaux libres qui agissent comme des substrats intermédiaires pour les enzymes (Figure 3, b), ces médiateurs peuvent quitter le site enzymatique et réagir avec une large gamme de substrats à fort potentiel d'oxydoréduction. (Figure 3, c). Finalement, le système laccase-médiateur (LMS) est impliqué dans une série de fonctions physiologiques telles que la lignolyse (Figure 3, d).

Les LiP oxydent les substrats dans des transferts d'électrons et forment des radicaux intermédiaires, tels que les radicaux phénoliques (Figure 3, e), ces radicaux intermédiaires subissent des réactions non enzymatiques (Figure 3, f)

La MnP catalyse l'oxydation dépendante du peroxyde de Mn (II) en Mn (III) (Figure 3, h), ensuite libéré de la surface de l'enzyme en complexe avec l'oxalate ou avec d'autres chélateurs (Figure 3, i). Le complexe Mn (III) agit comme un médiateur redox réactif de faible poids moléculaire et diffusible (Figure 3, j)

**Figure 3.** Schéma explicatif de la dégradation du lignine par les champignons de la pourriture blanche (Dashtban *et al.*, 2010).

# **Chapitre 03 :**

# **Bioremédiation**

## Chapitre 03 : Bioremédiation

Dans le monde entier, il existe plusieurs et différentes stratégies d'assainissement pour traiter les sols contaminés par les polluants. Trois stratégies sont largement utilisées dans la dépollution : (i) : fixer ou retenir les substances toxiques dans des espaces clos, (ii) : éliminer les polluants du sol ou bien (iii) : utiliser la remédiation par des méthodes chimiques, physiques ou biologiques pour détruire les polluants organiques (Wild *et al.*, 1997 ; Cummings, 2010 ; Goltapeh *et al.*, 2013).

### 3.1. Bioremédiation par champignons (mycoremédiation)

La bioremédiation phénomène naturel signifie l'utilisation des organismes supérieurs (végétaux) ou des microorganismes vivants pour décomposer les polluants environnementaux ou prévenir la pollution, en d'autres termes, il s'agit d'une technologie permettant d'éliminer les polluants de l'environnement utilisant des microorganismes autochtones (déjà en place dans le sol) ou allochtones (ajoutés), rétablissant ainsi l'environnement naturel d'origine et empêchant une nouvelle pollution. (Mougin *et al.*, 1996 ; Mougin *et al.*, 1996 ; Sasikumar et Papinazath, 2003 ; Shahnawaz *et al.*, 2019).

L'utilisation des champignons à la bioremédiation est désormais bien établie dans tous les écosystèmes et l'un des domaines les plus complexes de l'ingénierie de dépollution, dans ce domaine il existe deux techniques principales : la biostimulation qui consiste à stimuler l'activité des microorganismes autochtones et la bioaugmentation par l'introduire des microorganismes allochtones sélectionnés (Mougin *et al.*, 1996 ; Goltapeh *et al.*, 2013).

Dans le domaine de la mycoremédiation en focalise sur les champignons ligninolytiques tels que le champignon de la pourriture blanche qui ont l'habilité de dégrader une large gamme des polluants environnementaux par la production des enzymes cellulaire spécialement les oxydases (Mougin *et al.*, 1996 ; Vidali, 2001 ; Hasan, 2018 ; Baghel *et al.*, 2020 ; Bhat *et al.*, 2020).

### 3.2. Techniques de la mycoremédiation

Les champignons impliquent plusieurs stratégies pour la remédiation des sites contaminés, classiquement on a trois principales stratégies :

### **3.2.1. La biodégradation**

Les microorganismes trouvent des sources de carbone et d'énergie dans les polluants qui leur permettent de se développer, il s'agit de la conversion des polluants en métabolites, biomasse et dioxyde de carbone (Mougin *et al.*, 1996).

### **3.2.2. La bioabsorption**

Il s'agit d'une procédure basée sur l'absorption des «ions métalliques/contaminants/xénobiotiques» par biomasse vivante ou sèche (Hakeem *et al.*, 2020).

### **3.2.3. La bio conversion**

La conversion des polluants industriels/agro-industriels en d'autres formes bénéfiques par des enzymes généralement lignolytiques (Hakeem *et al.*, 2020).

## **3.3. Facteur influençant la mycoremédiation**

Les microorganismes n'existent pas nécessairement en nombre suffisant dans les sites contaminés, il faut donc stimuler le nombre et l'activité enzymatique nécessaires à la bioremédiation du site. Cela implique généralement l'ajout de nutriments et d'oxygène (la quantité d'oxygène disponible détermine si le système est aérobie ou anaérobie), d'azote, du phosphore et du carbone (Vidali, 2001 ; Goltapeh *et al.*, 2013).

La croissance et l'activité des microorganismes sont facilement affectées par le pH (affectant les réactions redox) (Dostie, 2017 ; Baghel *et al.*, 2020), la température (affecte la vitesse des réactions biochimiques) et l'eau (pour atteindre le niveau d'humidité optimal), bien que des microorganismes sont isolés des conditions extrêmes, dont la plupart d'entre eux poussent mieux dans une fourchette étroite (Wild *et al.*, 1997 ; Vidali, 2001).

**Deuxième partie**

**Partie expérimentale**

# **Chapitre 04 :**

## **Matériel et Méthodes**

## Chapitre 04 : Matériel et Méthodes

La contribution des champignons filamenteux dans la bioremédiation et la dégradation des composés organiques a été l'objectif de plusieurs travaux. Dans le même cadre on a effectué la présente étude, qu'il s'agit d'une synthèse d'article en vue d'étudier les enzymes produites par ces microorganismes et qui sont impliquées dans la dégradation de la lignine, considéré comme l'un des composés majeurs des rejets d'origine végétale.

### 4.1. Méthode de travail

#### 4.1.1. Analyse du sol

Le sol représente un habitat très riche en champignons filamenteux, d'où son choix comme source d'isolement. Les analyses physicochimiques qui doivent être réalisées sont : les mesures de pH, la conductivité électrique, la teneur en matière organique.

Le pH des échantillons du sol est mesuré par le pH-mètre, la teneur en humidité est déterminé en calculant la différence de poids entre l'échantillon de sol frais et l'échantillon de sol séché pendant la nuit au four (méthode gravimétrique). Utilisez un salinomètre pour mesurer la salinité du sol, la matière organique et le carbone organique total, l'azote total (Ali *et al.*, 2013).

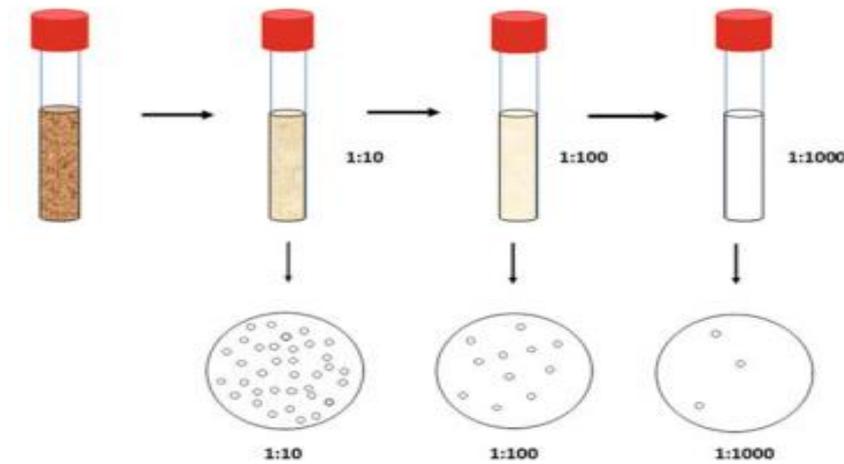
#### 4.1.2. Isolement des champignons filamenteux extrêmophiles

La meilleure méthode pour l'isolement des champignons filamenteux extrêmophiles à partir du sol est la méthode de suspension-dilution (Davet et Rouxel, 2000) présentée dans la figure 4, où dans les conditions extrêmes les microorganismes se trouvent sous forme de spores. Le milieu utilisé est le PDA additionné de 15 % de NaCl. Après 7 jours d'incubation à 35°C, les colonies apparues peuvent être purifiées par la méthode monospore (Ali *et al.*, 2013).

#### 4.1.3. Identification et sélection des champignons filamenteux halophiles

Selon l'observation microscopique et l'aspect macroscopique le genre est facilement déterminé. Une caractérisation morphologique, physiologique, biochimique approfondie et moléculaire par des amorces générales (amplification de la région ITS) et même parfois spécifiques sont nécessaires pour l'identification de l'espèce. En vérifiant et en comparant la croissance des colonies, les champignons halophiles peuvent être distingués des champignons

halotolérants par leur tolérance au sel, dont les halotolérants peuvent croître dans un milieu nutritif en absence de sel (Ali *et al.*, 2013).



**Figure 4.** Schéma montrant une série de dilutions et étalement sur boîtes de Pétri (PDA) (Lübeck et Lübeck, 2018).

#### 4.1.4. Criblage fongique pour la détection des activités ligninolytiques

##### 4.1.4.1. Test de décoloration des colorants

Au cours du protocole de criblage réalisé par Batista-García *et al.* (2017) ; Noman *et al.* (2020), du MEA additionné de 50 mg/L de Bleu brillant remazol R (RBBR) a été utilisé comme milieu pour déterminer la production de laccase des champignons testés. Le RBBR est connu pour être fortement décoloré par les champignons producteurs de laccase (Lac). L'inoculation du milieu est réalisée par des disques de 5 mm d'une préculture du champignon à tester. La culture est se fait à la température optimale de croissance du champignon à tester pendant 20 jours. Les boîtes de Pétri observées quotidiennement pour déterminertoute décoloration.

##### 4.1.4.2. Test de l'acide gallique

Dans le travail de Batista-García *et al.* (2017) utilisant du MEA additionné de 5 g/L d'acide gallique comme milieu, pour mesurer la capacité des champignons à produire des enzymes ligninolytiques. L'inoculation du milieu est réalisée par des disques de 5 mm d'une préculture du champignon à tester. La culture est se fait à la température optimale de croissance du champignon à tester pendant 20 jours. Les boîtes de Pétri observées quotidiennement pour surveiller la production de couleur brune due à l'oxydation de l'acide

gallique. L'activité enzymatique des champignons lignolytiques oxyde l'acide gallique pour former une forme de quinone de couleur brune dans le milieu solide.

#### **4.1.4.3. Test au gäiacol**

La MEA additionnée de 0,2% de gäiacol est utilisé également comme une méthode de criblage déterminant la production de laccase et peroxydases par les champignons. Après l'inoculation des milieux par le champignon à tester, les cultures sont incubées à température optimale de croissance pendant 20 jours. Les boîtes de Pétri observées quotidiennement pour observer le brun rougeâtre dû à l'oxydation du gäiacol. Inoculer des cultures fongiques en MEA sans RBBR, acide gallique et gäiacol qui ont été utilisées comme témoins dans tous les tests ci-dessus. Trois répliques de chaque culture sont réalisés dans chaque expérience (Batista-García *et al.*, 2017).

#### **4.1.5. Production et purification des enzymes**

La production de Lac et Per en milieu liquide minéral alcalin réalisé par la présence d'un substrat cette opération ce faite dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu minéral alcalin qui sélectionné pour stimuler la production d'enzymes de décomposition de la lignine, et un substrat est ajouté comme source de carbone pour stimuler la dégradation de la lignine. La culture a été incubée pendant 12 jours à son niveau de croissance optimal. Un échantillon sans substrat a servi de contrôle pour la croissance fongique. Le surnageant de culture a été séparé des mycéliums par filtration sur papier Whatman. A l'aide d'un aspirateur (Batista-García *et al.*, 2017 ; Noman *et al.*, 2020).

# **Chapitre 05 :**

## **Résultats et discussion**

## Chapitre 05 : résultats et discussion

### 5.1. Analyse des sols

Les résultats des analyses du sol effectuées par Ali *et al.* (2013) sont résumés dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Résultats d'analyses d'échantillon du sol (Ali *et al.*, 2013).

Analyse des paramètres	pH	Salinité (g/l)	Teneur en humidité (%)	Teneur en azote (%)	Carbone organique (%)	Matière organique (%)
<b>Résultat</b>	7.4	13.11	27,16	0.108	0.39	0.67

#### 5.1.1. pH

L'activité des ions d'hydrogène du système hydrique du sol exprime l'acidité et l'alcalinité du sol. Dans cette étude la valeur du pH a montré que les échantillons de sol sont légèrement alcalins. Selon le travail réalisé par Doran et Smith. (1996) ; Gostinčar *et al.* (2011) les environnements hyper salins sont soumis à l'évaporation. Leur composition saline est similaire à celle de l'eau de mer : le sodium et le chlorure sont les ions dominants, et le pH est presque neutre ou légèrement alcalin (figure 5). Suite au phénomène d'évaporation, certains changements se produisent dans la composition ionique en raison de la précipitation de minéraux après l'évaporation, donc la solubilité des minéraux diminue (Zaiad, 2010).



**Figure 5.** Intervalle de pH (Lee et Hwang, 2002).

#### 5.1.2. L'humidité

La méthode gravimétrique reste le seul moyen direct de mesurer l'humidité du sol (Reynolds, 1970), selon l'intervalle présenté dans la figure 6 la teneur en humidité du sol était élevée car le processus de précipitation était en cours pour la production de sel (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000).



**Figure 6.** Intervalle de la teneur d'humidité (%) (El-Said et Saleem, 2008).

### 5.1.3. Salinité

La salinité du sol est un paramètre très important déterminant d'une part si l'habitat choisi pour l'isolement représente vraiment un milieu extrême (échantillons du sol), et d'une autre part pour la création d'un milieu de culture (*in vitro*) proche au milieu naturel la salinité du sol dans la référence était élevée, mais se situait dans la fourchette (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000).

### 5.1.4. Carbone organiques

Les sols contiennent divers composés organiques à divers degrés de décomposition, la plupart des êtres vivants dans les sols dépendent de la matière organique et d'autres molécules pour leurs nutriments et leur énergie (Wagh *et al.*, 2013).

Les résultats présentés dans le tableau 1 que la teneur en azote, le carbone organique total et la matière organique se sont avérés inférieurs. Cette diminution progressive traduite par une relation réciproque avec l'augmentation de l'âge des décharges de sol et la faible présence de la microflore du sol (Ghose, 2004).

## 5.2. Isolement des champignons filamenteux extrêmophiles

Pour l'isolement des champignons filamenteux, la première étape consiste à choisir l'habitat du microorganisme d'intérêt. Les milieux extrêmes offrent la possibilité d'isolement des souches microbiennes bactériennes ou fongiques extrêmophiles.

**Tableau 2.** Présentation des conditions utilisées pour l'isolement des champignons extrêmophiles.

Milieu extrême	Condition	Référence
Milieu chaud	50°C	(Lamrani <i>et al.</i> , 2006)
Milieu saline	15 % de NaCl	(Ali <i>et al.</i> , 2013)

Dans le travail de Lamrani *et al.* (2006), il a été rapporté que la température d'incubation de 50°C est idéale pour l'isolement des champignons filamenteux thermophiles et thermotolerants, ce résultat est confirmé par la caractérisation physiologique.

Le travail publié par Ali *et al.* (2013) a présenté la méthode d'isolement des champignons filamenteux halophiles en utilisant le milieu sélectif PDA additionné de 15% de NaCl. La concentration de NaCl est déterminée en fonction de la salinité du sol. Selon ces résultats on peut conclure que les souches peuvent croître dans des milieux salins à hypersalins, ce qui reflète leur tolérance à la salinité, ce qui permet de les classer comme souches halophiles et halotolérantes.

### 5.3. Identification des champignons

L'identification des champignons repose sur des critères macroscopiques, microscopiques et moléculaires après leur isolement, sur des milieux de culture spécifiques.

#### 5.3.1. Identification préliminaire

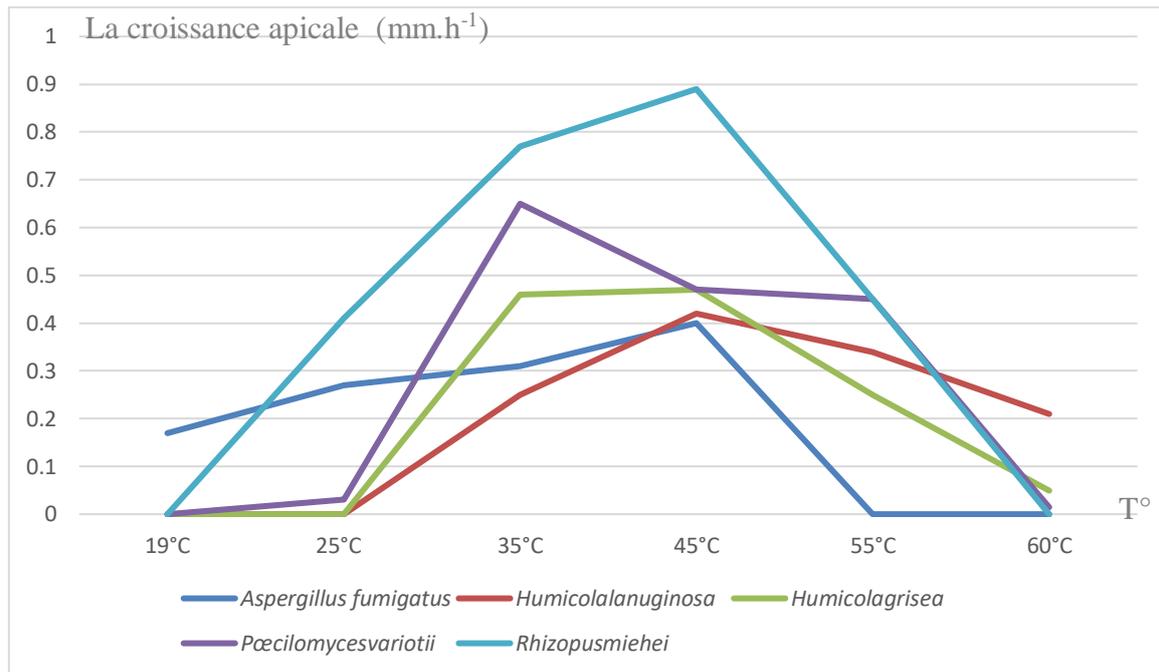
L'identification réalisée par Lamrani *et al.* (2006) utilisant différentes clés et par comparaison avec les souches répertoriées a permis la détermination du genre et l'identification préliminaire de l'espèce. Les souches sont ensemencées sur MEA et incubées pendant sept jours. La distinction morphologique doit être réalisée à deux températures (30°C et à 37°C) afin de pouvoir exploiter les clés d'identification qui font appel aux caractères culturels (la vitesse apicale, la texture, l'épaisseur, la couleur du thalle et les odeurs des colonies) et les caractères morphologiques de la souche à étudier par l'observation microscopique. Un résumé d'une synthèse bibliographique est présenté dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 3.** Identification macro/microscopique des champignons filamenteux extrêmophiles présenté dans le travail de (Lamrani *et al.*, 2006).

Genre	Identification	
	Identification macroscopique	Identification microscopique
	Thalles d'aspect poudreux. La surface de la	La présence de filament hyalin ramifié avec un diamètre constant. Les filaments mycéliens septés chevelus et

<i>Aspergillus fumigatus</i>		colonie se colore en vert foncé puis en gris vert foncé.	vésiculeux. Les conidies globuleuses.
<i>Humicola</i>	<i>Humicolala nuginosa</i>	Thalle hyalin puis virant au gris à brun - noir.	Caractères communs : Hyphes septé et courtes. Ces spores ou conidies solitaires globuleuses à subglobuleuses.
	<i>Humicolagrisea</i>		<i>Humicolalanuginosa</i> est caractérisée par des conidies globuleuses, noires, à paroi épaisse et verruqueuse.
			<i>Humicolagrisea</i> présente des conidies plus grosses.
<i>Pæcilomycesvariotii</i>		Couleur brun pale à brun jaune.	Filaments mycéliens septées. Des conidiophores de 30 à 90 um sur 3 à 7. Certaines phialides sont solitaires. Des ramifications en verticilles irrégulières.
<i>Rhizopus</i>		Dans le milieu PDA, présente un thalle de couleur blanc puis gris	Caractérisé par des ramifications vers le haut. Sporocystes multispores, globuleux, noirs La vitesse de la croissance apicale est extrêmement rapide surtout sur PDA à 45°C.

Lamrani *et al.* (2006) a réalisé un test pour distinguer les champignons thermophiles et thermotolérants par l'incubation des différentes souches de champignons filamenteux obtenues à six températures différentes. Les résultats de la même référence sont résumés dans la figure 7.



Les résultats montrent que les souches de l'espèce *Aspergillus fumigatus* sont classées comme étant des champignons thermotolérants. Les espèces *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea*, *Paeecilomyces variotii*, *Rhizopus miehei* sont des champignons thermophiles.

**Figure 7.** Représentation de la croissance apicale de différentes espèces en fonction de la température (Lamrani *et al.*, 2006).

Les micro-organismes thermophiles et thermotolérants sont devenus une source naturelle d'enzymes thermostables d'importance industrielle (Boonlue *et al.*, 2003). En outre, les enzymes thermostables sont généralement plus résistantes aux dénaturants chimiques, à une alcalinité élevée et à une acidité extrême (Hildén *et al.*, 2009).

### 5.3.2. Identification moléculaire

D'après (Verscheure et Lognay, 2002) les méthodes moléculaires sont beaucoup plus fiables que les méthodes traditionnelles ou autrement l'identification systématique. Les méthodes moléculaires permettent la distinction du polymorphisme des champignons filamenteux à différents niveaux (comparaison entre les genres, les espèces, les souches etc...).

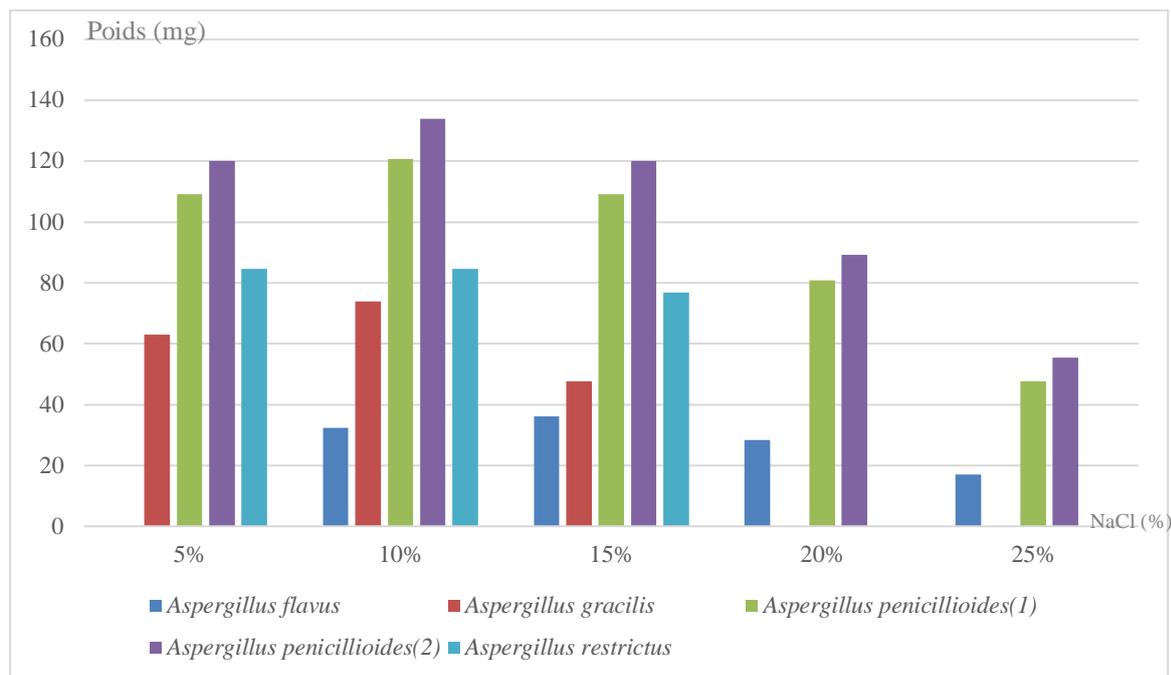
Selon Ali *et al.* (2013) l'analyse moléculaire des champignons extrêmophiles isolés utilisant le kit NucleoSpin® Plant II a permis de déterminer l'espèce. Il a été rapporté dans la même référence que la méthode suivie est le protocole standard pour l'extraction d'ADN fongique fourni avec le kit. L'ADN extrait et amplifié par PCR en utilisant des amorces

universelles (amplification de l'espaceur interne ITS) est par la suite séquencé. Les espèces et les souches ont été identifiées et l'outil NCBI BLAST a été utilisé pour obtenir une similarité entre les séquences supérieures à 97% (tableau 4).

**Tableau 4.** Résultats de l'identification des espèces étudiés à l'aide de l'outil d'analyse BLAST du NCBI (Ali *et al.*, 2013).

Codes	Espèce	Souche	Numéro d'accèsion	Analyse moléculaire des séquences ITS 1-4
01 H	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Souche 6830</i>	HQ693703	100%
02H	<i>Aspergillus gracilis</i>	<i>Isolat NRRL 4962</i>	EF652045	100%
03H	<i>Aspergillus penicillioides(1)</i>	<i>Souche ATCC 16910</i>	AY373862	99%
04H	<i>Aspergillus penicillioides(2)</i>	<i>Souche SCSGAF0031</i>	JN850993	99%
05H	<i>Aspergillus restrictus</i>	<i>Souche ATCC 16912</i>	AY373864	97%

Pour la sélection des champignons filamenteux halophiles ou halotolérants, un test de tolérance de chaque isolat dans un milieu salin a été réalisé (Tresner et Hayes, 1971). Les champignons isolés ont été incubés dans des milieux PDB à différentes concentration en NaCl 5, 10, 15, 20 et 25 %.



La figure 8 montre que les deux souches d'*Aspergillus penicillioides* ont produit le maximum de poids dans toutes ces variations de salinité étudiées, suivies par *Aspergillus flavus* a montré la plus faible croissance en termes de poids sec.

**Figure 8.** Test d'halo tolérance résultats basés sur le poids final en (mg) après 15 jours de croissance de la masse des champignons en fonction de la concentration en sel [5-25 %] (Le pH et la température ont été maintenus constants) (Ali *et al.*, 2013)

La figure 8 montre que les deux souches d'*Aspergillus penicillioides* ont produit le maximum de poids dans toutes ces variations de salinité étudiées, suivies par *Aspergillus flavus* a montré la plus faible croissance en termes de poids sec. Dans cette étude toutes les espèces étudiées à l'exception d'*Aspergillus flavus*, ont été capables de se développer *in vitro* dans un milieu contenant 5 % de NaCl (p/v). *A. gracilis* et *A. restrictus* n'ont pas pu à se développer que dans un milieu contenant au maximum 15 % de NaCl (p/v). Ces résultats nous permettent de constater que la plupart des espèces se développent bien dans un milieu contenant 10 et 15 % de NaCl. Les niveaux de sel de 20 et 25 % NaCl ont diminué la croissance de toutes les souches fongiques examinées. Les souches *A. penicillioides* 1 et 2 présentent une fréquence de tolérance saline élevée que les autres souches (Figure 8) (Ali *et al.*, 2013).

#### 5.4. Détection des activités ligninolytiques

Les basidiomycètes ont été largement étudiés pour leur capacité à produire deux enzymes de la classe d'oxydase ; la laccase et la peroxydase. Ces enzymes produites par les

champignons et surtout les basidiomycètes sont utilisées dans une large gamme de conditions environnementales et sur des substrats de nature chimique différente. Les études effectuées sur les zygomycètes et les ascomycètes sont beaucoup moins intéressante que celles effectuées sur les basidiomycètes (Batista-García *et al.*, 2017).

Dans le travail (Batista-García *et al.*, 2017) la détection des enzymes ligninases est réalisée dans un milieu solide par différents tests (décoloration du RBBR, réactions à l'acide gallique et au gaïacol). Dans la même référence, l'auteur a signalé que les espèces trouvées et considérées comme ligninolytiques ont été déjà signalées dans des travaux précédents utilisant le même test de détection. Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau 5.

**Tableau 5.** Tests de RBBR, réaction au gaïacol et à l'acide gallique pour chaque isolat (Batista-García *et al.*, 2017).

Classe des champignons filamenteux	Espèces	Croissance dans différents milieux ligninolytiques		
		RBBR (A)	Réaction à l'acide gallique (B)	Gaïacol (C)
Zygomycète	<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	5-7 jours	-	-
Ascomycète	<i>Pseudogymnoascus sp.</i> TS12	15 jours	DB	-
	<i>Aspergillus caesiellus</i> H1	15 jours	-	-
Basidiomycète	<i>Trametes hirsuta</i> IBB 450	3 jours	YB	3-5 jours
	<i>Trametes hirsuta</i> MTCC 1171	8-15 jours	YE	-

- (A) Temps pour décolorer le plat complet.
- (B) Les colonnes de réaction à l'acide gallique indiquent : DB, brun foncé ; YB, brun jaunâtre ; et YE, jaune de la forme quinone brune.
- (C) Gaïacol pour former une couleur brun rougeâtre.

Selon les travaux de Hasanin *et al.* (2019) il a été constaté que l'activité des enzymes décomposant la lignine produites par *Aspergillus flavus* EGYPTA5 diffère selon le milieu.

Lorsque la souche était cultivée dans le milieu PDA sans lignine pendant 10 jours, les résultats montrent que les activités des enzymes testées ont augmenté jusqu'à 6 ou 7 jours d'incubation puis commençaient à diminuer. Cette découverte indique que même en absence de lignine, les enzymes de décomposition de la lignine peuvent être sécrétées mais à une concentration très faible y compris *Aspergillus flavus*.

Les tests RBBR et de l'acide gallique ont été utilisés pour déterminer le potentiel du champignon à produire de la laccase. Toutes les souches testées ont été capables de décolorer le RBBR (Tableau 5). Ces résultats révèlent que la décoloration du RBBR suggère seulement la présence de Lac, autrement il est considéré comme un test qualitatif. Des études menées par Vyas et Molitoris. (1995) ont montré l'implication des enzymes ligninolytiques dans la décoloration du RBBR, et qui pourrait jouer un rôle important dans la dégradation des composés à base de cycles aromatiques, tels que la lignine et d'autres composés. Cependant, il n'y a pas toujours une forte corrélation entre la décoloration du RBBR et la tolérance/dégradation de la lignine.

Le test de l'acide gallique a été réalisé pour confirmer la sécrétion de phénol oxydases (Lac) et les peroxydases (LiP et MnP) par ces champignons (Yanto et Tachibana, 2013), avec les résultats montrés dans le (tableau 5) dont une souche d'ascomycètes et les deux basidiomycètes étant positives la réaction observée donne des différentes couleurs (brun, brun foncé, brun jaunâtre). L'apparition d'une couleur brune dans la gélose a déjà été fortement corrélée avec la capacité des champignons à se développer corrélée avec la capacité des champignons à oxyder l'acide gallique par des enzymes ligninolytiques (Shleev *et al.*, 2004). Les résultats précédemment publiés par Lee *et al.* (2014) ont permis de conclure que les réactions positives au RBBR et à l'acide gallique ne sont pas toujours en corrélation.

Lors du criblage des champignons sur le gaïacol, seulement 25 % des souches ont généré la forme colorée brun rougeâtre (tableau 5), ce qui indique l'oxydation du gaïacol par certaines souches considérées comme ligninolytiques.

Les résultats obtenus selon la même référence montrent que les champignons filamenteux sont capables de produire des enzymes extracellulaires (laccase et la peroxydase) qui ont un caractère spécifique d'oxydation de certaines molécules phénoliques et non phénoliques.

## 5.5. Production et purification des enzymes

### 5.5.1. Laccase

Les résultats des travaux effectués par Batista-García *et al.* (2017) ont montré que la production de ligninases est observée chez tous les champignons étudiés (tableau 5). La souche *T. hirsuta* IBB 450 a l'activité la plus élevée, tandis que *T. hirsuta* MTCC1171 a l'activité la plus faible. Ces données montrent clairement que différentes souches de la même espèce et différentes espèces du même genre ont des niveaux différents de l'activité d'enzymes de décomposition de la lignine.

Cette étude soutient également l'opinion largement répandue, selon laquelle les champignons isolés d'environnements extrêmes peuvent présenter une activité enzymatique avec un potentiel biotechnologique important dans différents domaines (Batista-García *et al.*, 2017).

### 5.5.2. Peroxydase

En ce qui concerne l'activité de peroxydase, des travaux récents ont montré qu'il n'a pas été possible de détecter du LiP dans aucune des souches testées par contre chez *A. caesiellus* elle est détectée une activité moyenne de peroxydase (Biache *et al.*, 2015).

Pour les enzymes de décomposition de la lignine, les souches et les espèces qui n'ont pas été prises en compte peuvent éventuellement conduire à une meilleure production d'enzymes de décomposition de la lignine et à une activité Lac ou MnP pouvant avoir les caractéristiques souhaitées, telles qu'un potentiel redox plus élevé, des substrats plus larges (Batista-García *et al.*, 2017).

# **Conclusion**

## Conclusion

La présente étude est une synthèse des articles scientifiques (à cause de la pandémie de Covid-19), dont leur objectif est la capacité ligninolytique des champignons filamenteux extrêmophiles.

Au cours de ce travail, basé sur une analyse des résultats de 21 recherches biotechnologiques traitant la décomposition fongique de la lignine, on a pu constater que les champignons de la pourriture blanche sont les plus efficaces dans la dégradation de la lignine sous l'action des enzymes oxydatives extracellulaires. En effet, ces microorganismes jouent un rôle essentiel dans le cycle global du carbone dont, ils utilisent la lignine comme source de carbone et d'énergie.

L'analyse des résultats des différentes études nous a permis de déduire que les champignons filamenteux présentent une grande capacité d'adaptation aux environnements extrêmes.

Concernant la partie enzymatique, l'analyse des études effectuées sur le criblage des champignons et la détection de l'activité dégradante de lignine nous ont permis de constater que la sécrétion des ligninases augmente significativement en présence de lignine. En effet, en présence de lignine les champignons filamenteux sécrètent certaines enzymes dans leur milieu pour la dépolymérisation de ce composé et son utilisation comme source de carbone et d'énergie.

On a constaté également que les laccases et les peroxydases sont les molécules responsables de ces réactions biochimiques, dont le potentiel de ces enzymes diffère d'une espèce à une autre.

# **Bibliographie**

## Bibliographie

1. Ali I., Kanhayuwa L., Rachdawong S., Rakshit S. K. 2013. Identification, phylogenetic analysis and characterization of obligate halophilic fungi isolated from a man-made solar saltern in Phetchaburi province, Thailand. *Annals of Microbiology* 63(3):887-895.
2. Baghel S., Sahariah B. P., Anandkumar J. 2020. Bioremediation of Lignin-Rich Pulp and Paper Industry Effluent. Dans *Combined Application of Physico-Chemical & Microbiological Processes for Industrial Effluent Treatment Plant*. Springer Singapore. pp. 261-278.
3. Bardin T. 2020. Études de motifs de signalisation amyloïde des bactéries aux champignons filamenteux. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, pp.1-6.
4. Barrasa J. M., Martínez A. T., Martínez M. J. 2009. Isolation and selection of novel basidiomycetes for decolorization of recalcitrant dyes. *Folia Microbiologica* 54(1):59-66.
5. Batista-García R. A., Kumar V. V., Ariste A., Tovar-Herrera O. E., Savary O., Peidro-Guzmán H., Cabana H. 2017. Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents. *Journal of Environmental Management* 198:1-11.
6. Benchouk A. 2017. Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les microorganismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir de dégradation des hydrocarbures. Thèse de doctorat d'état, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badispp. 1-5.
7. Berbee M. L., Taylor J. W. 2001. *Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time*. Berlin: Springer. 229-245.
8. Bhat R. A., Hakeem K. R., Dervash M. A. 2020. *Bioremediation and Biotechnology, Vol 2: Degradation of Pesticides and Heavy Metals*. Cham: Springer International Publishing. 283p.
9. Biache C., Lorgeoux C., Andriatsihoarana S., Colombano S., Faure P. 2015. Effect of pre-heating on the chemical oxidation efficiency: Implications for the PAH availability measurement in contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 286: 55-63.
10. Boddy L., Frankland J., Van West P. 2007. *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. Elsevier. 349p

11. Boonlue S., Aimi T., Morinaga T. 2003. Molecular Characterization of a Xylanase-Producing Thermophilic Fungus Isolated from Japanese Soil. *Current Microbiology* 47(2):pp.119–124.
12. Bowman S. M., Free S. J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, New York: Éditions scientifiques et médicales Elsevier. 28(8):pp.799-808.
13. Calvez T. L. 2009. Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystème hydrothermal marin profond. Thèse de doctorat, Université Rennes 1.271 p.
14. Casieri L., Anastasi A., Prigione V., Varese G. C. 2010. Survey of ectomycorrhizal, litter-degrading, and wood-degrading Basidiomycetes for dye decolorization and ligninolytic enzyme activity. *Antonie van Leeuwenhoek* 98(4):pp.483–504.
15. Cullen D., Kersten P. J. 2004. Enzymology and molecular biology of lignin degradation. In *Biochemistry and molecular biology*. Springerpp.249-273.
16. Cummings S. P. 2010. Bioremediation. *Methods in Molecular Biology*, Totowa, NJ: Humana Press.599:pp.1-285.
17. Dashtban M., Schraft H., Syed T. A., Qin W. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International journal of biochemistry and molecular biology* 1(1):pp.36-50.
18. Davet P., Rouxel F. 2000. Detection and isolation of soil fungi. Editions Quae. 188p
19. Demirjian D. C., Morís-Varas F., Cassidy C. S. 2001. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, Chicago.5:144-151.
20. Doran J. W., Smith J. L. 1996. Measurement and Use of pH and Electrical Conductivity for Soil Quality Analysis. In *SSSA Special Publications*. Soil Science Society of America. pp. 169-185
21. Dostie P. 2017. Réhabilitation de sols industriels contaminés aux hydrocarbures par mycoremédiation. École de technologie supérieure Université du Québec. pp.1-82.
22. Dufresne P. 2018. Identification des champignons d'importance médicale. Institut national de santé publique. pp.1-64.
23. Eichler J. 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology advances*. 19:261 – 278.

- 24.** El-Said A., Saleem A. 2008. Ecological and Physiological Studies on Soil Fungi at Western Region, Libya. *Mycobiology* 36(1):pp.1-9.
- 25.** Fatima M. 2017. Etude écologique et taxonomique des champignons forestiers et morphologie des ectomycorhizes du chene vert dans la wilaya de Relizane. Thèse de magistère, Université d'Oran p.3.
- 26.** Ghose M. K. 2004. Effect of opencast mining on soil fertility. *Journal of Scientific & Industrial Research* 63:1006-1009.
- 27.** Glenn J. K., Gold M. H. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology* 45(6):1741-1747.
- 28.** Goltapeh E. M., Danesh Y. R., Varma A. 2013. Fungi as Bioremediators. *Soil Biology*, Springer Berlin Heidelberg.32:pp.1-482.
- 29.** Gostinčar C., Lenassi M., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 2011. Fungal Adaptation to Extremely High Salt Concentrations. In *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier.77:pp.71-96.
- 30.** Guarro J., Gené J., Stchigel A. M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, Spain.12(3):pp.454-500.
- 31.** Gunde-Cimerman N., Zalar P., Hoog S., Plemenitaš, A. 2000. Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology* 32(3):235-240.
- 32.** Hakeem K. R., Bhat R. A., Qadri H. 2020. *Bioremediation and Biotechnology: Sustainable Approaches to Pollution Degradation*. Cham: Springer International Publishing. 334p
- 33.** Hasan I. F. 2018. Role of Filamentous Fungi to Remove Petroleum Hydrocarbons from the Environment. Dans V. Kumar, M. P. Kumar, *Microbial Action on Hydrocarbons*. Springer Singapore. pp. 567-580.
- 34.** Hasanin M. S., Darwesh O. M., Matter I. A., El-Saied H. 2019. Isolation and characterization of non-cellulolytic *Aspergillus flavus* EGYPTA5 exhibiting selective ligninolytic potential. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 17: pp.160-167.

- 35.** Heinfling A., Martínez M. J., Martínez A. T., Bergbauer M., Szewzyk U. 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, Madrid, Spain.64(8):2788-2793.
- 36.** Heinfling A., Ruiz-Dueñas F. J., Martínez M. J., Bergbauer M., Szewzyk U., Martínez A. T. 1998. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS letters* 428(3): pp.141-146.
- 37.** Hickey P. C., Jacobson D. J., Read N. D., Louise Glass N. 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, California.37(1): pp.109-119.
- 38.** Hildén K., Hakala T. K., Lundell T. 2009. Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnology Letters* 31(8):pp.1117-1128.
- 39.** KACHOUR L. 2005. Identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leur diversité. Thèse de magistère, Département de Biochimie.pp.1-20.
- 40.** Kersten P. J. 1985. The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *Journal of Biological Chemistry*, U.S.A. 260(5): 2609-2612.
- 41.** Lamrani K., Ismaili-Alaoui M., Cheheb M., Kammas N., Iraqi-Houssaini L., Hassouni H., Sevastianos R. 2006. Distribution écologique des champignons filamenteux thermophiles isolés à partir des principales Maâsra du Maroc. *Biotechnologies et qualité des produits de l'olivier dans le bassin méditerranéen*pp.293-306.
- 42.** Lee H., Jang Y., Choi Y.-S., Kim M.-J., Lee J., Lee H., Kim J.-J. 2014. Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. *Journal of Microbiological Methods* 97:pp.56-62.
- 43.** Lee J. Y., Hwang B. K. 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology* 48(5):pp.407-417.
- 44.** Leghlimi H. 2013. Cellulases de souches fongiques issues du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de doctorat d'état, Département de Microbiologie.pp.1-10.

45. Lübeck M., Lübeck P. S. 2018. Isolation and Screening of Cellulolytic Filamentous Fungi. In Cellulases, Springer New York. 1796: pp.37-45.
46. Mester T., Field J. A. 1998. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by Bjerkandera species strain BOS55 in the absence of manganese. Journal of Biological Chemistry 273(25):pp.15412-15417.
47. Mougin C., Chaplain V., Gaillardon P., Sohier L., Mercier R., Sigoillot J. C., Asther M. 1996. Le traitement biologique des sols pollués par des composés organiques. L'intérêt des champignons filamenteux. Le Courrier de l'environnement de l'INRA 28(28):pp.49-56.
48. Mougin C., Chaplain V., Rama-Mercier R., Sohier L., Sigoillot J.-C., Asther M. 1996. Utilisation de champignons filamenteux pour la dépollution de sols pollués par des polluants organiques. Déchets, sciences et techniques 4:pp.20-22
49. Nguyen M. T. 2007. Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du vietnam : étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat. TOULOUSE. 147p
50. Nie G., Reading N. S., Aust S. D. 1999. Relative Stability of Recombinant Versus Native Peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of biochemistry and biophysics 365(2):328-334.
51. Noman E., Al-Gheethi A., Talip B. A., Mohamed R., Kassim A. H. 2020. Oxidative enzymes from newly local strain *Aspergillus iizukae* EAN605 using pumpkin peels as a production substrate: Optimized production, characterization, application and techno-economic analysis. Journal of Hazardous Materials 386:pp.1-14.
52. Querellou J., Guezennec J. 2010. Biotechnologie des extrêmophiles. *Techniques de l'Ingenieur*. pp.1-13.
53. Redecker D. 2002. New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil record. Research in Microbiology, Switzerland: Éditions scientifiques et médicales Elsevier. 153(3):pp.125-130.
54. Reynolds S. G. 1970. The gravimetric method of soil moisture determination Part IA study of equipment, and methodological problems. Journal of Hydrology 11(3):pp.258-273.

- 55.** Sasikumar C. S., Papinazath T. 2003. ENVIRONMENTAL MANAGEMENT: BIOREMEDIATION OF POLLUTED ENVIRONMENT. In Proceedings of the Third International Conference on Environment and Health, New York. pp.465 – 469
- 56.** Satyanarayana T., Raghukumar C., Shivaji S. 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current science* 89(1):pp.78-90.
- 57.** Shahnawaz M., Sangale M. K., Ade A. B. 2019. Bioremediation Technology for Plastic Waste. Springer Singapore. pp.978-981.
- 58.** Shen S., Tu S. I., Taylor R. W. 2002. Interactions of enzymes with clays and applications in bioremediation. *Soil mineralogy with environmental applications* 7:pp. 795-817.
- 59.** Shleev S., Morozova O., Nikitina O., Gorshina E., Rusinova T., Serezhenkov V., Yaropolov A. 2004. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie* 86:pp. 693-703.
- 60.** Thiebaud-Roux S. 1995. Valorisation chimique de composés lignocellulosiques: obtention de nouveaux matériaux. Thèse de doctorat d'état, 1-2. L'institut National Polytechnique de Toulouse. pp. 198
- 61.** Tien M., Kirk T. K. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221(4611):pp. 661-663.
- 62.** Tien M., Kirk T. K., Bull C., Fee J. A. 1986. Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Journal of Biological Chemistry* 261(4):pp. 1687-1693.
- 63.** Tresner H. D., Hayes J. A. 1971. Sodium Chloride Tolerance of Terrestrial Fungi. *Applied microbiology* 22(2):pp. 210-213.
- 64.** Umezawa T., Higuchi T. 1987. Mechanism of aromatic ring cleavage of  $\beta$ -O-4 lignin substructure models by lignin peroxidase. *FEBS letters* 218(2):pp. 255-260.
- 65.** Van Aken B., Hofrichter M., Scheibner K., Hatakka A. I., Naveau H., Agathos S. N. 1999. Transformation and mineralization of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation* 10(2):pp. 83-91.
- 66.** Verscheure M., Lognay G. 2002. Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. 6(3):pp. 131–142.

67. Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* 73(7):pp.1163-1172.
68. Vyas B. R., Molitoris H. P. 1995. Involvement of an extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol brilliant blue R. *Applied and Environmental Microbiology* 61(11):pp. 3919-3927.
69. Wagh G. S., Chavhan D. M., Sayyed M. R. 2013. Physicochemical Analysis of Soils from Eastern Part of Pune City. *Universal Journal of Environmental Research & Technology* 3(1):pp. 93-99.
70. Wariishi H., Gold M. H. 1989. Lignin peroxidase compound III: formation inactivation conversion to the native enzyme. *Febs Letters* 243(2):pp. 165-168.
71. Wariishi H., Gold M. H. 1990. Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *Journal of Biological Chemistry* 265(4):pp. 2070-2077.
72. Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S. N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology advances* 22(1-2):pp. 161 – 187.
73. Wild J. R., Varfolomeyev S. D., Scozzafava A. 1997. Perspectives in bioremediation. *Technologies for environmental improvement Springer Science & Business Media., Springer Netherlands*.19:pp. 1-65
74. Yanto D. H., Tachibana S. 2013. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85:pp. 438-450.
75. Zaiad G. M. 2010. Physico-Chemical Analysis of Soils in Al-Khums city, Libya. *Journal of Applied Sciences Research* 6(8):pp. 1040-1044.

## ملخص

تعتبر فطريات التربة احدى عوامل المعالجة الحيوية القوية نظرًا لقدرتها على تفكيك أنواع مختلفة من الملوثات البيئية. ترتبط هذه الخصوصية بمجموعتها الأنزيمية الغنية للغاية. تعتمد الدراسة الحالية على تحليل العمل العلمي الذي يهدف إلى التحلل البيولوجي للأنزيمي للليغنين بفطريات خيطية محبة للظروف القاسية. تظهر دراسات مختلفة أنه يمكن التعرف على العزلات التي تم الحصول عليها من خلال الجمع بين مختلف المعايير المجهرية والميكروسكوبية، والتحليل الجزيئي لتسلسل ITS. يتم إجراء الكشف عن lignasse عن طريق الاختبارات النوعية التي تكشف عن أكسدة ركائز الليغنين، واختبار تغير اللون، واختبار حمض الغاليك، واختبار جايكول. يمكن تنقية lignasse الذي يتم إفرازه في وسط الاستزراع بواسطة تقنية الترشيح. جعلت الملاحظات المجهرية والميكروسكوبية للعزلات الفطرية من الممكن تسليط الضوء على العديد من الأنواع في التربة التي تمت دراستها في أعمال مختلفة، وقد أتاحت نتائج التحليلات الجزيئية التمييز بين العديد من السلالات. أظهرت نتائج الاختبارات الأنزيمية الثلاثة الأكسدة الأنزيمية لليغنين. تشير هذه النتائج إلى أن فطريات العفن الأبيض قادرة على تكسير الليغنين وأن الإنزيمات المشاركة في هذه العملية هي الأكسيدات والبيروكسيدات.

**الكلمات المفتاحية:** فطريات العفن الأبيض، المعالجة الحيوية، lignasse، الليغنين، التربة.

## Résumé

Les champignons du sol sont des agents puissants dans la bioremédiation en raison de leur capacité à décomposer différents types de polluants environnementaux. Cette particularité est liée à leur panoplie enzymatique extrêmement riche. La présente étude basée sur l'analyse des travaux scientifiques, dont leur objectif est la biodégradation enzymatique de la lignine par les champignons filamenteux extrémophiles. Les différents travaux montrent que les isolats obtenus peuvent être identifiés par la combinaison des différents critères macroscopiques, microscopiques, et l'analyse moléculaire des séquences ITS. La détection des ligninases se réalise par des tests qualitatifs révélant l'oxydation des substrats de lignine, le test de décoloration, test de l'acide gallique, et le test gaïacol. La purification des ligninases secrétés dans le milieu de culture peuvent être effectué par une technique de filtration. Les observations macroscopiques et microscopiques des isolats fongiques ont permis la mise en évidence de plusieurs espèces dans les sols étudiés dans les différents travaux, et les résultats de l'analyse moléculaire ont permis de distinguer plusieurs souches. Les résultats des trois tests enzymatiques effectués, montre l'oxydation enzymatique de la lignine. Ces résultats indiquent que les champignons de la pourriture blanche sont capables de décomposer la lignine et les enzymes impliqués dans ce processus sont des oxydases et des peroxydases.

**Les mots clés :** Champignons de pourriture blanche, bioremédiation, ligninases, lignine, le sol

## Abstract

Soil fungi are potent agents in bioremediation because of their ability to decompose different types of environmental pollutants. This characteristic is related to their extremely rich enzymatic panoply. The present study based on the analysis of scientific works, whose aim is the enzymatic biodegradation of lignin by extremophilic filamentous fungi. The different works show that the isolates obtained can be identified by the combination of different macroscopic and microscopic criteria, and the molecular analysis of ITS sequences. The detection of ligninase is done by qualitative tests revealing the oxidation of lignin substrates, the decoloration test, gallic acid test, and guaiacol test. The purification of ligninases secreted in the culture medium can be performed by a filtration technique. The macroscopic and microscopic observations of the fungal isolates allowed the identification of several species in the soils studied in the different works, and the results of the molecular analysis allowed to distinguish several strains. The results of the three enzymatic tests carried out, show the enzymatic oxidation of the lignin. The results of the analyzed works indicate that white rot fungi are able to decompose lignin and the enzymes involved in this process are oxidases and peroxidases.

**Key words:** White rot fungi, bioremediation, ligninases, lignin, soil.