



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département : Microbiologie**

**قسم : الميكروبيولوجيا**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biotechnologie fongique/ fermentation et production des substances fongiques**

Intitulé

---

# **Production de la laccase par des mycètes filamenteux sur milieu à base de déchets de citrouille (*cucurbita sp.*)**

---

**Présenté et soutenu par : BOUAOUINE Adjial Soumeya & GHARFI Manel**

**Le : 24/06/2015**

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury: Mme MIHOUBI.I**

(Prof.- UFM Constantine).

**Rapporteur: Mr KACEM CHAOUICHE.N**

(Prof. - UFM Constantine).

**Examinatrice: Mme LAHLAH. F**

(M.A.A. - UFM Constantine).

**Tutrice : Mme BENHASSINE S.**

(Doctorante. UFM Constantine)

*Année universitaire  
2014 - 2015*

# Remerciements

Avec l'aide D'Allah, nous pouvons réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à remercier tous ceux qui ; d' une façon ou d' une autre, nous ont aidé pendant nos travail de mémoire...

Certains par leurs conseils et leurs connaissances scientifiques et d'autres par leur soutien et leur présence dans les moments les plus pénibles.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de mycologie appliquée (LAMYBAM) au bio pôle de Chaab- Ersass. Faculté des sciences de la nature et de vie, Université Mentouri Constantine.

Nos premiers remerciements vont à notre promoteur Monsieur **Pr. Kacem chaouche. N**, Directeur de laboratoire et professeur à l'Université Mentouri Constantine. Pour avoir accepté de nous encadrer. Et par son caractère de noblesse incomparable, pour sa générosité et de la grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles.

Nous pourrions cordialement lui exprimé nos profonds remerciements.

Nos remerciements s'adressent également à **Madame. Benhassine .S** pour ses conseils, ses encouragements, sa patience, sa compétence, et surtout pour ses valeurs humaines qui nous ont permis de bien mener ce travail.

Nous remercions particulièrement **Mme. Mihoubi , Mme. lahlah** pour avoir accepté de juger ce travail.

Nous souhaitons également remercier tous l'équipe de laboratoire ; les enseignants **Madame Youcef ali, Kara ali, Betayache** et les doctorantes **Madame Radia ,Imane ,Hamida et Hajar.**

Merci à tous nous collègues pour tous les bons moments passés, pour leurs gentillesse, et leurs compétences, nous te minerai en rendant hommage à tous les enseignants de l'Université Mentouri Constantine qui nous ont donné le gout des études. Leurs tâche est ingrate et tors peu souvent reconnue.

## Table des matières

	Pages
1. Introduction.....	1
2. Partie bibliographique .....	3
2.1. Généralités sur les enzymes .....	3
2.1.1. Définition.....	3
2.1.2. Origine des enzymes industrielles.....	3
2.1.3. Classification des enzymes.....	3
2.1.4. Les ligninases.....	4
2.2. Les laccases .....	4
2.2.1. Définition des laccases.....	4
2.2.2. Source de laccases.....	5
2.2.2.1. <i>Laccases végétales</i> .....	5
2.2.2.2. <i>laccases bactériennes et microbiennes</i> .....	5
2.2.3. Classification des laccases.....	6
2.2.4. Structure des laccases.....	6
2.2.5. Propriétés des laccases.....	8
2.2.6. Le système médiateur.....	8
2.2.7. La production des laccases.....	10
2.2.8. Influence des facteurs sur l'activité laccasique.....	10
2.2.8.1. <i>Spécificité de substrat</i> .....	10
2.2.8.2. <i>Influence de la température sur la production de laccase</i> .....	11
2.2.8.3. <i>Influence du pH sur l'activité de laccase</i> .....	11
2.2.9. Les applications des laccases .....	11
2.2.9.1. <i>Industrie alimentaire</i> .....	12
2.2.9.2. <i>Industrie pharmaceutique</i> .....	12
2.2.9.3. <i>Immobilisation des enzymes</i> .....	12
2.2.9.4. <i>Industries textiles, des colorants, de la pâte à papier</i> .....	13
2.2.9.5. <i>Nanobiotechnologies</i> .....	13
2.2.9.6. <i>Traitement des eaux usées</i> .....	14
2.2.9.7. <i>Autre applications</i> .....	14

2.3.	Les mycètes.....	15
2.3.1.	Généralités.....	15
2.3.2.	Les mycètes des laccases .....	15
2.3.3.	<i>Trametes sp.</i> .....	16
2.3.4.	<i>Chaetomium sp.</i> .....	17
2.4.	La citrouille .....	17
2.4.1.	Généralité sur le genre <i>Curcubita sp.</i> .....	17
2.4.2.	Origine de la citrouille.....	18
2.4.3.	Classification de la citrouille.....	18
2.4.4.	Production de la citrouille en Algérie.....	18
2.4.5.	Composants de citrouille... ..	19
2.4.6.	Utilisation de déchets de citrouille.....	20
3.	Matériel et Méthodes .....	21
3.1.	Test de développement des souches sur les différents milieux de culture .....	21
3.1.1.	Réactivation des souches .....	21
3.1.2.	Préparation du substrat à base de déchets de citrouille à différents concentration .....	21
3.1.3.	Inoculation des souches sur les milieux gélosés.....	21
3.2.	Test de production de laccase sur les différents milieux de culture.....	21
3.3.	Production de laccase sur milieu submergé.....	22
3.3.1.	Préparation du substrat .....	22
3.3.1.1.	<i>En absence d'inducteur</i> .....	22
3.3.1.2.	<i>En présence d'inducteur</i> .....	22
3.3.2.	Préparation de la suspension sporale .....	22
3.3.3.	Dénombrement des spores.....	22
3.3.4.	Conduite des fermentations .....	22
3.3.5.	Prélèvement des extraits enzymatiques.....	23
3.3.6.	Dosage laccasique .....	23
4.	Résultat et discussion .....	24
4.1.	Test de développement des souches sur les différents milieux de culture.....	24
4.1.1.	Réactivation des souches.....	24
4.1.2.	Test de développement des souches sur les différents milieux de culture.....	24

4.2.	Test de production de laccase sur les différents milieux.....	25
4.3.	Production de laccase sur milieu submergé .....	26
4.3.1.	Dénombrement des spores.....	26
4.3.2.	Cinétique de production de laccase .....	26
5.	Conclusion.....	29
6.	Références bibliographiques .....	30
7.	Résumés .....	43
8.	Annexes	

## *Liste des abréviations*

ABTS	2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)
<i>B.subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CTA	Centre technique de coopération agricole et rurale
PDA	Potato dextrose agar
PH	Potential d' hydrogène
rpm	round per minute
U/L	$\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$

## Liste des figures

Figure 1. Structure d'une lignine .....	4
Figure 2. Structure chimique d'une portion du site actif de la laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique.....	6
Figure 3. Structure cristalline d'une laccase du champignon <i>Trametes versicolor</i> contenant les cuivres.....	7
Figure 4. Positionnement des quatre atomes de cuivre dans le site actif de laccase de <i>B.subtilis</i> .....	7
Figure 5. Mécanisme de dégradation de substrats non phénoliques catalysé par les laccases.....	7
Figure 6. Structure chimique de 10 différents médiateurs naturels et 7différents médiateurs synthétiques pour la laccase.....	9
Figure 7. Utilisation de laccase pour dégrader et synthétiser des différents colorants.....	13
Figure 8. Mycélium de <i>P. chrysosporium</i> en train de coloniser des copeaux de bois.....	15
Figure 9. La croissance de <i>Trametes pubescens</i> dans la nature .....	15
Figure 10. La morphologie du <i>Tametes sp.</i> : A, <i>Trametes versicolor</i> ; B, hymenophore de <i>Trametes suaveolens</i> .....	16
Figure 11. Aspect microscopique de <i>Chaetomium.sp</i> .....	17
Figure 12. Musquée de Provence - <i>cucurbita moschata</i> .....	18
Figure 13. Fermentation liquide en Erlenmeyer.....	23
Figure 14. Extraits laccasique.....	23
Figure 15. La croissance de la souche P4 sur milieu PDA.....	24
Figure 16. La croissance de la souche L sur milieu PDA.....	24
Figure 17. Evolution de l'activité laccasique de la souche <i>Chaetomium sp.</i> A sans inducteurs et B avec inducteurs.....	27
Figure 18. Evolution de l'activité laccasique de la souche <i>Trametes sp.</i> : A. sans inducteur, B. avec inducteurs.....	27

## *Liste des tableaux*

Pages

Tableau 1. Classification des enzymes.....	3
Tableau 2. Synthèses des différentes applications de la laccase.....	14
Tableau 3. Les différents éléments de quelques espèces du genre <i>curcubita</i> .....	19
Tableau 4. Les informations nutritionnelles pour 100 g de citrouille.....	20
Tableau 5. Le développement de <i>Trametes sp.</i> et <i>Cheatomium sp.</i> sur les différents milieux de culture à base de déchets de la citrouille.....	25
Tableau 6. L'activité de laccase sur les différents milieux à base de déchets de citrouille.....	26



# Introduction

# Introduction

---

## 1. Introduction

Les laccases (hydroquinone EC 1.10.3.2) sont des enzymes à cuivre appartenant à la famille des multicopper bleu oxydases qui oxydent les polyphénols en utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électron (Elshafei *et al.*, 2012).

L'étude de cet enzyme a été initialement lancée par Yoshida (1883) à partir de l'arbre de laque japonaise *Rhus vernicifera*.

Les laccases sont des protéines présentes dans une grande variété d'organismes et elles ont diverses fonctions biologiques. Elles sont distribuées dans la nature et elles sont produites par une grande variété d'insectes et bactéries, mais la meilleure laccase délibérée est d'origine fongique (Desai et Nityan, 2011). Elle est sécrétée essentiellement par les basidiomycètes ligninolytiques, afin de dégrader les polymères de la lignine (Gianfreda *et al.*, 2004).

Les laccases sont particulièrement intéressantes d'un point de vue industriel et ce, pour leur habileté à oxyder une vaste gamme de substrats phénoliques. Diverses recherches sont effectuées dans différents secteurs d'intérêt : le textile, les pâtes et papiers, l'alimentation, le cosmétique, la décontamination des sols et de l'eau, les biocarburants et la synthèse organique (Mayer et Staples, 2002; Burton, 2003; Kenealy et Jeffries, 2003; Claus, 2004; Rodriguez Couto *et al.*, 2006; Minussi *et al.*, 2007).

La production d'enzymes industrielles exige la préparation de milieux à moindre coût sachant que l'estimation du coût du milieu de croissance représente 30-40% de celui de production d'enzymes industrielles (Srinubabu *et al.*, 2007). Ceci peut être atteint par l'utilisation des résidus agroindustriels disponibles et bon marché et par l'optimisation des conditions nutritionnelles et physicochimiques du milieu de culture. C'est ainsi que plusieurs déchets et sous-produits agro-industriels sont appliqués pour la production d'enzymes (Belmessikh, 2011). Plusieurs substrats sont utilisés pour la production de ces enzymes: le son de blé et le son de riz, la bagasse de canne et même les peaux des bananes ont été utilisés comme substrat afin de produire la laccase (Savitha *et al.*, 2011, Meza *et al.*, 2005, Facello et Cruz, 2007).

De ce fait, l'objectif de ce travail s'articule sur la mise en évidence de l'activité laccasique produite sur milieu à base de déchets de la citrouille par deux souches fongiques déjà sélectionnées comme laccase positives. Pour ce faire, plusieurs étapes ont été réalisées, à savoir :

- Etude de développement des souches fongiques sur différents milieux à base de déchets de citrouille à différentes concentrations;
- Test de la production de laccase sur ces différents milieux;

## Introduction

---

- Fermentation et suivi de l'activité laccasique produite en Erlenmeyer sur un milieu sélectionné en présence et en absence d'inducteur.

**Partie**

**bibliographique**

## 2. Partie bibliographique

### 2.1. Généralités sur les enzymes

#### 2.1.1. Définition

Les enzymes, catalyseurs biologiques des organismes vivants, sont des macromolécules majoritairement de nature protéique (Cosnier, 2000), présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (Drouin, 2005).

En 2005, plus de 3000 enzymes différentes ont été isolées et identifiées (Patel *et al.*, 2005).

#### 2.1.2. Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles sont, en général, de source végétale, animale ou microbienne (Belmessikh, 2011). Les enzymes d'origine végétale et animale ont longtemps été plus utilisées que celles d'origine microbienne, mais pour des considérations techniques et économiques, ces dernières prennent de plus en plus d'importance (Bezawada, 2010).

#### 2.1.3. Classification des enzymes

Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie, indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées. Selon la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie, les enzymes se répartissent en six classes (Tableau 1) (Cosnier, 2000). Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases (Assamoi *et al.*, 2009).

Tableau 1 Classification des enzymes (Cosnier, 2000).

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

## Partie bibliographique

### 2.1.4. Les ligninases

La lignine est le terme générique d'un vaste groupe de polymères aromatiques. Elle constitue le seul groupe de polymères biosynthétisés à squelette aromatique (Wertz, 2010).

La lignine se présente dans les interstices qui cimentent les chaînes de cellulose et d'hémicelluloses. Elles contiennent des molécules ayant des propriétés pharmaceutiques importantes (stéroïdes, composés phénolique et les composés inorganiques) (Godin *et al.*, 2010 ; Godin *et al.*, 2011).

Différentes enzymes sont capables de dégrader la lignine : lignine peroxydases (lignases), peroxydases à manganèse, laccase (Robert *et* Catesson, 2000).

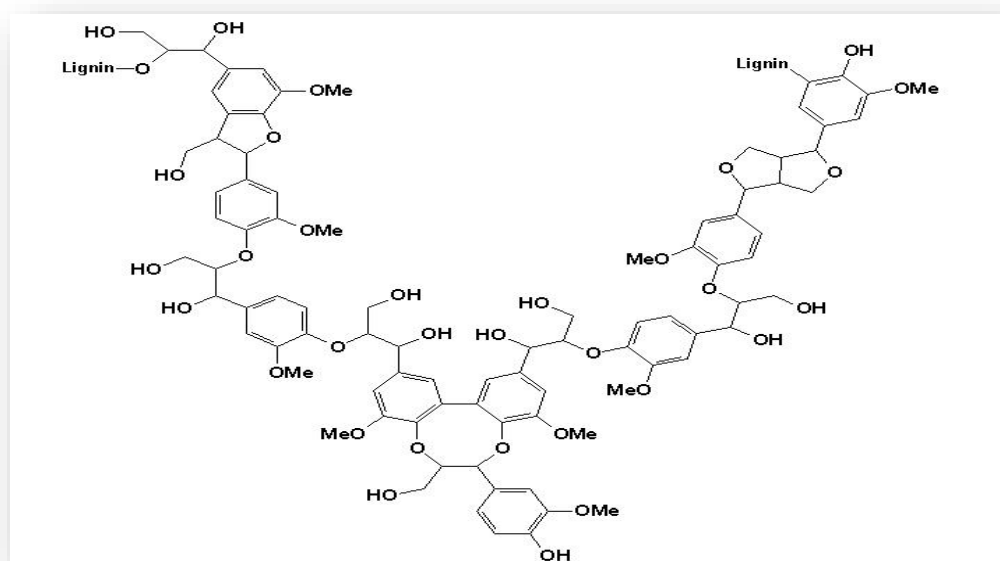


Figure 1. Structure d'une lignine (Morot-gaudry, 2010)

### 2.2. Les laccases

#### 2.2.1. Définition des laccases

La laccase (EC 1.10.3.2, oxydase p-diphénol), est une oxydase bleue de type ligninase, c'est-à-dire qu'elle est capable de dégrader la lignine. (Madhavi *et* Lele 2009, Camarero *et al.*, 2005). Elle représente un ensemble d'enzymes impliqués notamment dans le brunissement enzymatique des fruits et des légumes (Nicolas *et al.*, 2003).

Ces oxydoréductases font partie de la famille des protéines multi-cuivrées qui utilisent l'oxygène pour oxyder de nombreux composés phénoliques par le biais d'un mécanisme radicalaire (Jeanneau, 2005).

Les laccases ne présentent pas d'activité catécholasique, mais en revanche elles sont capables d'oxyder aussi bien les o-phénols que les p-phénol. En plus, elles oxydent les monophénols en monoquinones, sans les hydroxyler avant (Issa, 2009).

## Partie bibliographique

---

### 2.2.2. Source des laccases

La laccase a été découverte en 1883 par Yoshida dans les plantes. Il a observé que le latex des arbres chinois (*Rhus sp.*) a rapidement été durci en présence d'air. L'enzyme a été nommée laccase environ 10 ans plus tard, après son isolement et sa purification (Riva, 2006). Ces enzymes sont produites par les cellules eucaryotes, telles que les mycètes, les plantes et les insectes (Mayer *et Staples*, 2002).

En revanche, chez les mycètes, la laccase est produite en général, par des Ascomycètes, des Deutéromycètes, des Basidiomycètes et elle est particulièrement abondante dans de nombreuses pourritures blanches qui dégradent la lignine. (Kunamneni *et al.*, 2007).

#### 2.2.2.1. Laccases végétales

La présence de laccases dans les plantes supérieures apparaît moins importante que chez les champignons. Toutes les laccases caractérisées jusqu'à présent sont des glycoprotéines, notamment celle de *Rhus vernicifera* qui est la plus étudiée. En outre, l'arbre de laque est un membre de la Famille Anacardiaceae, semblent contenir laccase dans les canaux de résine (Huttermann, *et al.*, 2001).

Il a été démontré que la culture de Cellule de *pseudoplatanus Acer* pour contenir huit laccases, tous exprimé principalement dans le tissu xylème de *Pinus taeda* (Sato *et al.*, 2001).

Laccase a été exprimée aussi dans les graines et l'embryon de maïs (*Zea mays*) (Bailey *et al.*, 2004; Arora *et Sharma*, 2010) .

Les laccases ont été identifiées dans les plantes, dans les arbres, les choux, navets, betteraves, pommes, asperges, pommes de terre, les poires et divers autres légumes (Madhavi *et Lele*, 2009).

#### 2.2.2.2. laccases bactérienne et microbiennes

Laccase est présente dans les bactéries de manière intracellulaire (Claus, 2003; Arora *et Sharma*, 2010). Récemment certaines laccases bactériennes ont également été caractérisé de, *Bacillus subtilis* (Martins *et al.*, 2002), *Streptomyces lavendulae* (Suzuki *et al.*, 2003), *S. Cyaneus* (Arias *et al.*, 2003) et *Marinomonas mediterranea* (Jimenez-Juarez *et al.*, 2005).

Laccase a été produite par de nombreuses mycètes de la pourriture blanche et des champignons saprophytes (Morozova *et al.*, 2007). *Trametes versicolor*, *Chaetomium thermophilum*, sont des producteurs connus de laccase et il a été signalé que certaines espèces de *Trichoderma*, y compris *T.harzianum* a la capacité de produire polyphénol oxydases (Kiiskinen *et al.*, 2004; Sadhasivam *et al.*, 2008).

Laccase a également été produit par un grand nombre des champignons comestibles dont le pleurote *Pleurotus ostreatus*, le champignon *Lentinula edodes* et champignon *Agaricus bisporus*, etc. (Morozova *et al.*, 2007).

## Partie bibliographique

### 2.2.3. Classification des laccases

Les laccases sont classés en fonction de leur d'origine; elles sont abondantes dans la nature et sont principalement produites par les plantes et les mycètes, mais sont également présentes chez les bactéries ou encore les insectes (Claus, 2004).

La laccase fongique est une oxydase multicuivre qui appartient à la famille des Polyphénoloxydases. (Rodriguez, 2012 ; Nicolas *et al.*, 2003) de la classe d'oxydoréductases (Piontek *et al.*, 2002).

### 2.2.4. Structure des laccases

Les laccases sont des métalloenzymes contenant des atomes de cuivre au de leurs sites actifs respectif ; elles assurent simultanément l'oxydation de composés phénoliques et la réduction d'O<sub>2</sub> (Enguita *et al.*, 2003).

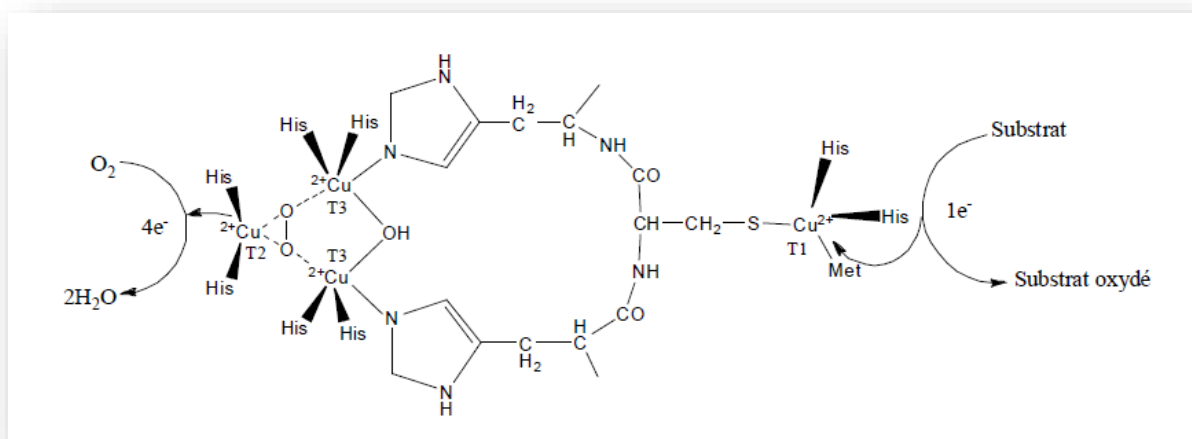


Figure 2. Structure chimique d'une portion du site actif de la laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique (Rochefort, 2001).

En général, les laccases sont des glycoprotéines dimériques ou tétramériques contenant au niveau de leur site actif quatre atomes de cuivre qui sont différents par la nature de leurs ligands. On distingue trois sites appelés T1, T2 et T3 (Claus, 2004). Les sites de type 1 et 2 possèdent chacun un atome de cuivre et sont impliqués dans la capture et le transfert d'électrons (Lanteigne, 2010).

Le site T1 contient un atome de cuivre (Cu<sup>+</sup>) absorbe à 610 nm. Il coordonne une cystéine et il est responsable de la couleur bleue de l'enzyme. Alors que le site T2 contient le cuivre non bleu (Cu<sup>2+</sup>) et il forme avec l'azote des histidines et avec l'oxygène un complexe tétraédrique. Le site T3 absorbe à 330 nm. Chaque ion cuivre est lié à trois histidines (Piontek *et al.*, 2002).





Figure 3. Structure cristalline d'une laccase du champignon *Trametes versicolor* contenant les 4 cuivres. (Piontek *et al.*, 2002)

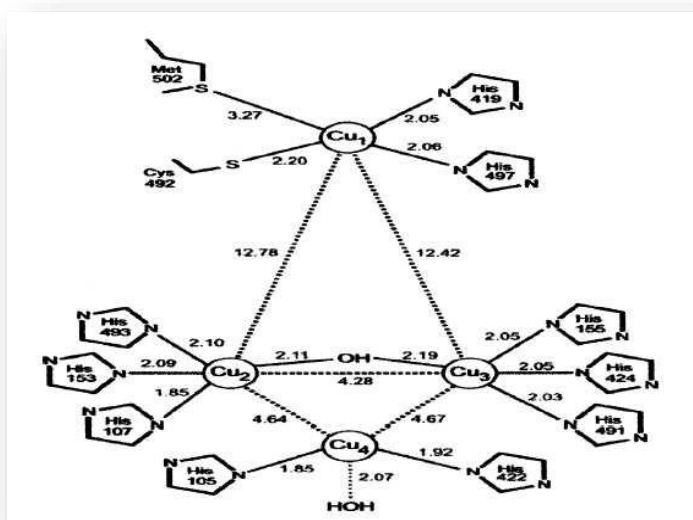


Figure 4. Positionnement des quatre atomes de cuivre dans le site actif de laccase de *B. subtilis* (Enguita, 2003)

La conformation des centres réactionnels est caractéristique avec un des quatre atomes de cuivre qui est responsable de l'oxydation du substrat tandis que les trois autres forment un cluster impliqué dans l'activation du dioxygène (Piontek *et al.*, 2002) (Figure 6).

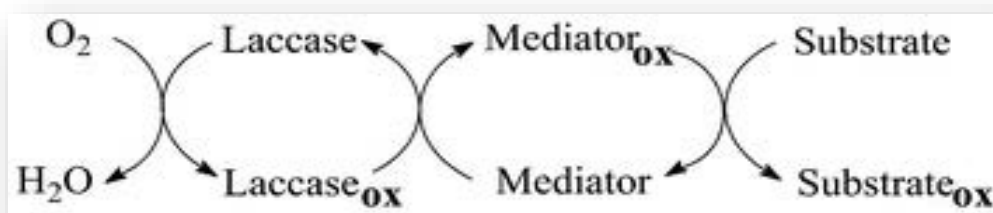


Figure 5. Mécanisme de dégradation de substrats non phénoliques catalysé par les laccases. (Piontek *et al.*, 2002)

## Partie bibliographique

---

Il a été démontré que chez de nombreux organismes la production de laccase était régulée par la présence de cuivre (Palmieri *et al.*, 2000), et qu'elle pouvait être modulée par certains xénobiotiques (Gonzales *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004).

### 2.2.5. Propriétés des laccases

Les laccases sont monomériques, dimériques ou tétramériques. Ce sont des glycoprotéines dont le taux de glucides se situe entre 10 et 45 %, celui-ci contribuant à la stabilité de l'enzyme. La masse moléculaire de ces enzymes est comprise entre 50 et 130 kDa (Claus, 2004). Le poids moléculaire des laccases fongique est inférieur à celui des laccases issues de plantes (Burton, 2003).

Mayer *et Staples*, (2002) ont montré que la laccase peut être un facteur important de virulence dans plusieurs maladies causées par les champignons.

La partie osidique des laccases de plantes constitue jusqu'à 45% du poids moléculaire, alors que chez les laccases fongiques, cette partie ne représente que 10 à 30% (Baldrian, 2006).

### 2.2.6. Le système médiateur

Un médiateur est une molécule de faible poids moléculaire qui étend l'activité catalytique de la laccase vers les unités non phénoliques des lignines (Madad, 2011).

Les médiateurs sont introduits dans le système pour transférer les électrons du site actif de l'enzyme généralement peu accessible à l'électrode. Dans ce cas, l'enzyme catalyse l'oxydation ou la réduction du médiateur (Tingry *et al.*, 2013).

Pour les substrats non phénoliques ou les phénols qui possèdent un potentiel redox élevé, l'ajout d'un médiateur dans le milieu réactionnel permet d'augmenter la vitesse d'oxydation (Johannes *et Majcherczyk*, 2000 ; Burton, 2003).

Les médiateurs sont utilisés lorsque le substrat d'intérêt (comme c'est le cas des lignines) ne peut pas être oxydé directement par l'enzyme à cause de sa taille qui lui ne permet pas de pénétrer à l'intérieur du site actif ou parce qu'il a un potentiel redox particulièrement élevé (Riva, 2006).

De nombreux médiateurs sont actuellement recherchés parmi lesquels, on peut citer :

\_ Des médiateurs synthétiques: Le plus connu des médiateurs d'oxydation utilisé est l'ABTS (acide 2,2'-Azino-Bis (3-éthylbenz-Thiazoline-6-Sulfonique) (Riva, 2006);

\_ Des médiateurs dérivés de la lignine (Acétosyringone ; syringaldéhyde ; 2,6-diméthylphénol ; 2,4,6-triméthoxyphénol ; éthyle vanilline ; acétovanillone ; vanilline ; alcool vanillique ; méthyl vanillate ; *p*-coumaric acid) (Camarero *et al.*, 2005);

\_ des médiateurs synthétiques dérivés de la phényl-méthyl-pyrazolones, de l'acide benzoïque et de la N-hydroxynaphthalimide (Shumakovitch *et al.*, 2006);

## Partie bibliographique

\_ des composés N-hydroxy dérivés de l'acétanilidine et de l'hydroxybenzotriazole (HBT) (Xu *et al.*, 2001).

L'activité du système médiateur/laccase envers les substrats dépend du potentiel d'oxydoréduction de l'enzyme, de la stabilité et de la réactivité du radical formé au cours de l'oxydation du médiateur. Il semble également que l'efficacité des médiateurs augmente lorsqu'ils sont substitués par des groupements électrodonneurs (Xu *et al.*, 2000).

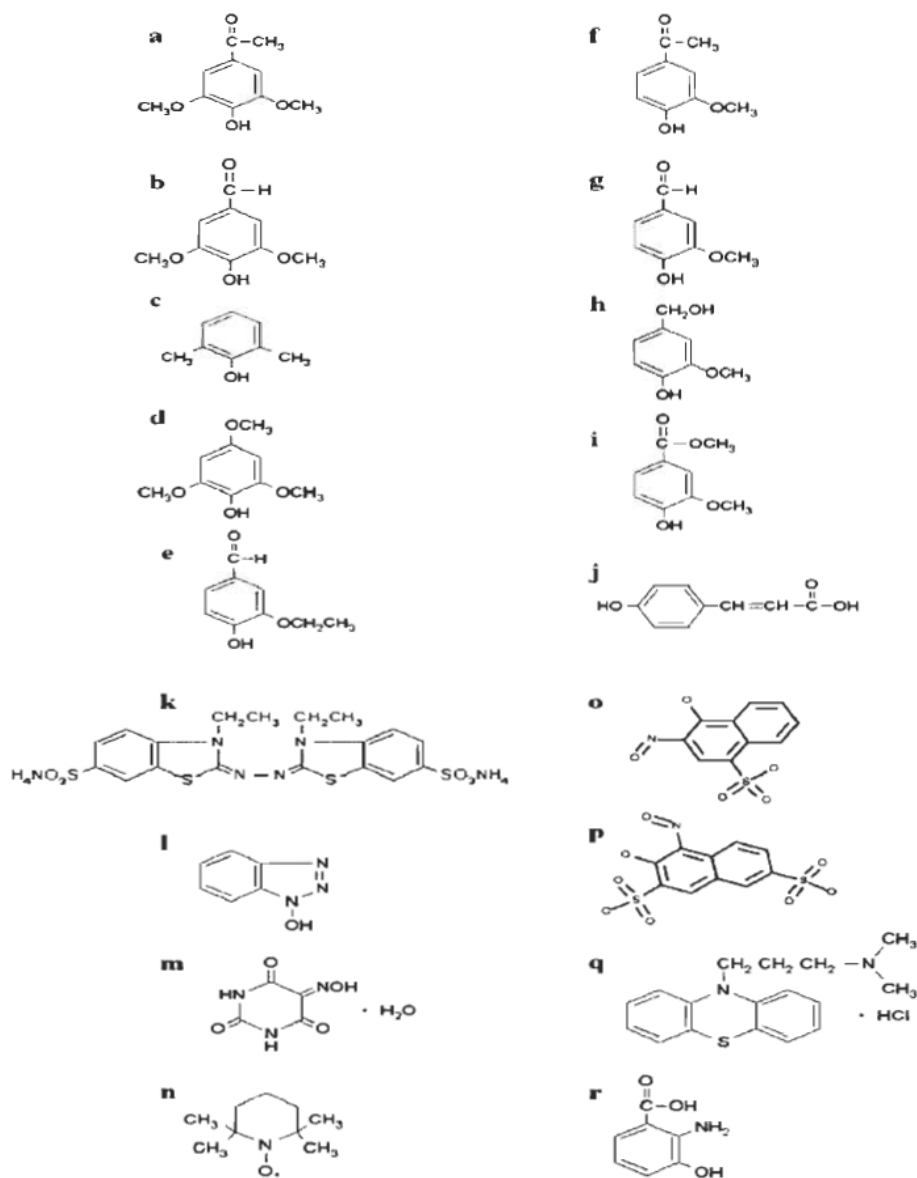


Figure 6. Structure chimique de 10 différents médiateurs naturels et 7 différents médiateurs synthétiques pour la laccase. (a) Acétosyringone (b) syringaldéhyde (c) 2,6-diméthylphénol (d) 2,4,6 triméthoxyphénol (e) 3-o-éthyl vanilline (f) acétovanillone (g) vanilline (h) alcool de vanillyle (i) méthyl vanillate (j) acide p-coumarique (k) ABTS (l) HBT (m) acide violurique (n) 2,2,6,6-tétraméthylpiperidine-1-oxyl (o) acide 2-nitroso-1-naphthol-4-sulfonique (p) acide 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonique (q) promazine (r) acide 3-hydroxyanthranilique (Camarero *et al.*, 2005).

## Partie bibliographique

---

L'efficacité des médiateurs augmente lorsqu'ils sont substitués par des groupements électrodonneurs (Xu *et al.*, 2001).

### 2.2.7. La production des laccases

L'amélioration de la productivité et le réduire de coût de production sont les principaux objectifs pour les études actuelles sur la production de laccase (Kunamneni *et al.*, 2007).

L'utilisation de déchets industriels et agricoles pour la production de laccase par la pourriture blanche est un moyen efficace de réduire le coût de production (Rodriguez, 2008 ; Osma *et Toca-Herrera*, 2011).

Plusieurs substrats sont utilisés comme source de carbone pour la production des laccases. Savitha *et al.*, (2011) ont été utilisées deux substrats : le son de blé et le son de riz. Meza *et al.*, (2005) et Mahajan *et al.*, (2015) aussi ont été choisis la bagasse de canne à sucre comme substrat, alors que Faccelo *et Cruz*, (2007) ont été utilisés les peaux des bananes comme source de carbone.

Mishra *et al.*, (2008) ont utilisé la biomasse des cyanobactéries d'eau fleurs, coquille d'arachide (GNS) comme milieu de culture pour la production de laccase de *Coriolus versicolor*.

Deux types de fermentations ont été utilisés pour la production de la laccase: Fermentations submergées qui sont couramment utilisés dans les procédés industriels et les fermentations solides qui présentent un rendement volumétrique supérieur, les besoins énergétiques moins, et une plus grande stabilité du produit final et la concentration de cultures submergées (Jain *et al.*, 2013)

### 2.2.8. Influence des facteurs sur l'activité laccasique

La production de laccase est influencée par divers facteurs, 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, le taux d'aération, la présence d'azote, de glucose, entre autres (Couto *et al.*, 2002).

#### 2.2.8.1. spécificité de substrat

Les laccases peuvent oxyder une très large gamme de substrats. Elles sont capables de transformer:

- La lignine qui peut être polymérisée ou dépolymérisé. Ainsi, dans le cas où le substrat est un polymère de lignine de faible masse molaire, les laccases ont tendance à continuer la polymérisation. Dans le cas où le degré de polymérisation est important, le phénomène inverse se produit (Kim *et al.*, 2002).
- L'ABTS et la syringaldazine. (Faccelo *et Cruz*, 2007 ; Manole *et al.*, 2008).
- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (anthracène, benzopyrène) : la transformation laccasique de ces substrats est effectuée à l'aide de médiateurs tels que l'ABTS, la méthionine, la

## Partie bibliographique

---

cystéine, la glutathion réduit, l'aniline et l'acide 4-hydroxybenzoïque (Johannes *et* Majchertczyk, 2000).

### 2.2.8.2. *Influence de la température sur la production de laccase*

Les températures optimales pour les réactions enzymatiques sont généralement plus élevées. Pour la plupart des champignons de la pourriture blanche sont des champignons mésophiles avec la température de culture optimal 27-30° C. (Knapp *et al.*, 2001).

La température optimale de la laccase peut varier considérablement d'une souche à l'autre. Les laccases isolés a partir d'une souche de *Marasmius quercophilus* ; sont révélés être stables pendant 1 h à 60 C° (Farnet *et al.*, 2000).

En général, les champignons ont été cultivés à des températures entre 25 ° C et 30 ° C pendant la production optimale de laccase (Vasconcelos *et al.*, 2000).

Nyanhongo *et al.*, (2002) ont montré que la laccase produite par *T. modesta* était pleinement active à 50 °C et était très stable à 40 °C, mais la demi-vie a diminué à 120 min à température élevée (60 °C).

La laccases de *Pycnoporus cinnabarinus* l'est également, un traitement à 60 °C pendant une heure ne modifie pas son activité (Schliephake *et al.*, 2000). En revanche, les températures optimales des laccases de *Chalara paradoxa* varient entre 10 et 37 °C (Robles *et al.*, 2000).

### 2.2.8.3. *Influence du pH sur l'activité de laccase*

Les laccases ont un pH optimum se situant entre 3 et 7, elles sont inactives à pH = 2. Robles *et al.*, (2000) ont testé les laccases induites par 9 souches distinctes de *Chalara paradoxa* et ont trouvé 2 pH optima différents selon le type de substrat utilisé.

La littérature suggère que la majorité des champignons filamenteux de pourriture blanche se développent de façon optimale à pH acide. La majorité des chercheurs suggèrent que l'optimum des valeurs de pH est susceptible d'être dans la plage de 4 à 4,5 (Knapp *et al.*, 2001).

Laccase produite par *Trametes modesta* était pleinement active à pH 4,0 et très stable au pH 4,5, mais sa demi-vie a diminué à 125 min à pH 3,0 (Nyanhongo *et al.*, 2002).

### 2.2.9. Les applications des laccases

Leur abondance, leur diversité font que les laccases sont des sources enzymatiques importantes et potentiellement intéressantes (Levavasseur, 2007).

Une vaste quantité d'applications industrielles pour laccases a été proposée, elles comprennent l'industrie boulangère, papeterie, la synthèse organique, l'environnement, la nourriture, les produits pharmaceutiques et nanobiotechnologie. (Kunamneni *et al.*, 2007).

## Partie bibliographique

---

### 2.2.9.1. *Industrie alimentaire*

De nombreux substrats de laccase, tels que les glucides, les acides gras insaturés, les phénols et les protéines contenant un thiol, sont des composantes importantes de divers aliments et des boissons. Leur modification par laccase peut conduire à des nouvelles fonctionnalités, la qualité, l'amélioration ou la réduction des coûts (Kirk *et al.*, 2002). Donc ; la laccase est utilisée pour améliorer la qualité des boissons telles que la bière, le vin ou les jus de fruit par l'élimination sélective des dérivés phénoliques. Elles sont également utilisées pour améliorer la durée de conservation de la bière (Minussi *et al.*, 2002).

Les laccases sont aussi utilisées dans la cuisson de certains aliments Selinheimo *et al.*, (2006) et 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.

### 2.2.9.2. *Industrie pharmaceutique*

Les laccases ont été utilisées pour la synthèse de plusieurs produits de l'industrie pharmaceutique (Arora *et Sharma*, 2010). Elles sont également utilisées dans la préparation de certains médicaments importants, comme les médicaments anticancéreux, et ajoutées dans certains produits cosmétiques pour réduire leur toxicité (Couto *et Herrera*, 2006).

La laccase possède aussi des applications dans la synthèse des dérivés des hormones. Intra *et al.*, (2005) et Nicotra *et al.*, (2004). et elle est utilisée dans des réactions de conversion de plusieurs composés importants ayant des propriétés utiles, comme les antibiotiques (Pilz *et al.*, 2003).

Les catéchines ont une capacité antioxydante et les laccases peuvent oxyder ces catéchines. Ces catéchines consistent des petites unités de tanins et ce sont des antioxydants importants trouvés dans le thé, les herbes et les légumes (Kurisawa *et al.*, 2003).

Récemment, la laccase a été utilisée dans des préparations dermatologiques contenant des protéines pour éclaircir la couleur de la peau (Golz-Bemer *et al.*, 2004).

### 2.2.9.3. *Immobilisation des enzymes*

Asther *et al.*, (2005) constatent qu'il est en général indispensable de fixer la laccase sur un support afin d'augmenter son action dans le traitement des eaux usées pour améliorer sa stabilité et permettre sa réutilisation. Dans d'autres domaines, de plus en plus d'applications font référence à l'immobilisation des enzymes. C'est le cas par exemple des cellules « biofuel » (Barriere *et al.*, 2006) développées dans

## Partie bibliographique

le domaine biomédical. Dans le domaine de la lignification, (Shleev *et al.*, (2006) ont développé une électrode sur laquelle est immobilisée une laccase pour le suivi de la solubilisation des lignines.

### 2.2.9.4. Industries textiles, des colorants, de la pâte à papier

Les colorants synthétiques sont largement utilisés dans des industries telles que textile, le cuir, les cosmétiques, l'alimentation et l'impression de papier (Forgacs *et al.*, 2004).

Dans ces industries, les procédés relatifs à la décoloration (dégradation de colorant, blanchiment) utilisent les laccases, principalement avec des systèmes médiateurs (Schliephake *et al.*, 2000 ; Baldrian, 2004, Knutson *et* Ragauskas, 2004 ,Camarero *et al.*, 2005). Dans les industries du papier, les systèmes laccase/médiateur sont le plus utilisés pour dégrader la lignine lors de l'extraction de la pulpe évitant l'utilisation de produits chimiques chlorés par exemple (Srebotnik *et* Hammel, 2000).

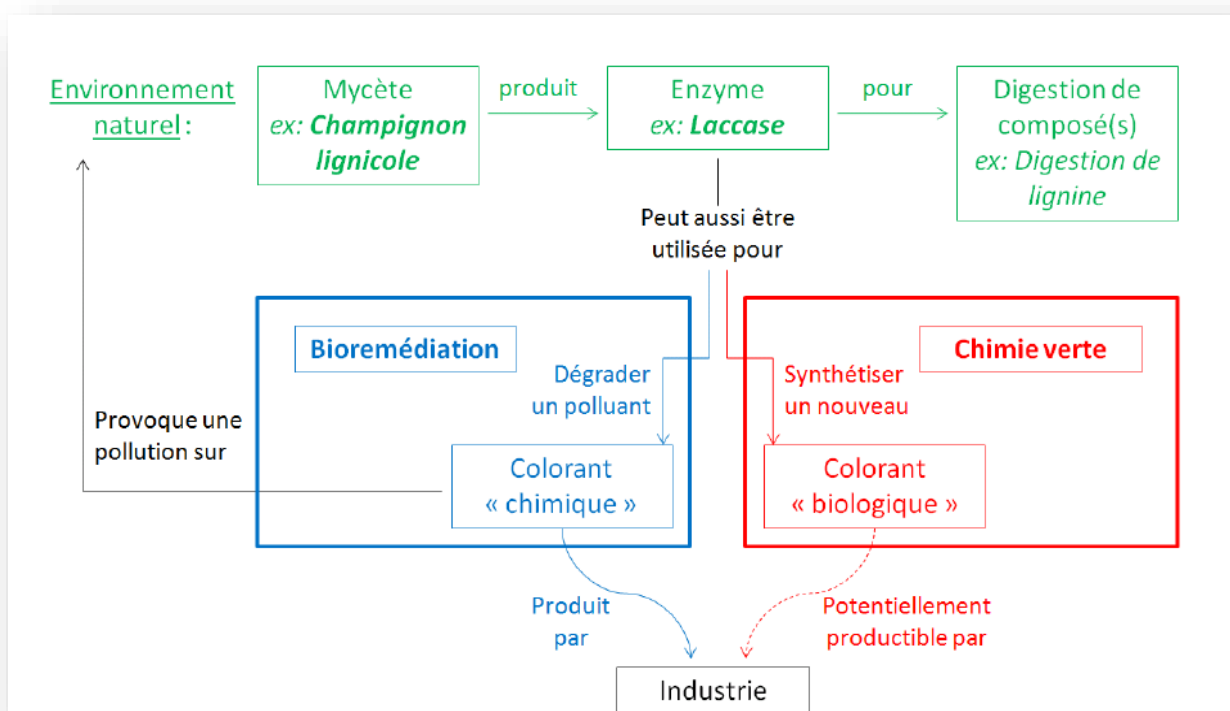


Figure 7. Utilisation de laccase pour dégrader et synthétiser des différents colorants (Bataille *et al.*, 2011)

### 2.2.9.5. Nanobiotechnologies

Les nanobiotechnologies sont l'ensemble des technologies se déroulant à l'échelle du nanomètre. Elles consistent à mettre en oeuvre 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).

## Partie bibliographique

---

Plusieurs auteurs ont utilisé les laccases comme biomolécule dans les biocapteurs pour déterminer l'efficacité de la microencapsulation et pour modéliser son comportement dans des microréacteurs enzymatiques (Gusetu, 2010).

### 2.2.9.6. Traitement des eaux usées

Dans certaines industries (boissons, pétrolières, textile, pâte à papier), les effluents industriels contenant des composés toxiques (hydrocarbures aromatiques, phénols, chlorophénols, etc) peuvent être décontaminés par l'action des laccases ((Levavasseur, 2007). Les polymères insolubles sont ensuite éliminés par filtration ou sédimentation (Torres *et al.*, 2003).

### 2.2.9.7. Autre applications

Plus récemment, la laccase de *Trametes hirsuta* a été également largement utilisée pour la fonctionnalisation de biocathodes (Vaz-dominguez *et al.*, 2008 ; frasconi *et al.*, 2010) et pour la réalisation de biopiles en fonction de leur site actif (Tingry *et al.*, 2013).

La laccase est connue pour le rôle important qu'elle joue dans la dégradation des phénols ce qui la rend très utile dans la décontamination des eaux industrielles (Riva, 2006).

Les laccases sont également utilisées pour délignifier des complexes lignocellulosiques et améliorer la production du bioéthanol obtenu à partir de ces complexes (Mayer *et Staples*, 2002).

Elles semblent aussi être impliquées dans les processus de production de la biomasse mycélienne (Mansur *et al.*, 2003) et d'inhibition du développement des moisissures comme les *Trichoderma* (Velazquez-Cedeño *et al.*, 2008).

Kobayashia *et Higashimurab*, (2003) décrivent la synthèse d'un plastique thermostable (poly phénylène éther) par polymérisation oxydative de 2,6-diméthoxyphénol.

Tableau 2. Synthèses des différentes applications de la laccase

Secteur d'application	Source de laccase	Référence
Industrie du textile (Décoloration des encres)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Cerrena unicolor</i> <i>Trametes. hirsuta</i> <i>Trametes villosa</i>	Soares <i>et al.</i> , (2002) Michniewicz <i>et al.</i> , (2003) Rodriguez Couto <i>et al.</i> , (2006) Zille <i>et al.</i> , (2003)
Industrie de l'alimentation (Applications variées)	<i>Pycnoporus. cinnabarinus</i> <i>T. hirsuta</i>	Georis <i>et al.</i> , (2003) Kuuva <i>et al.</i> , (2003)
Industrie papetière (Mise en pâte biologique)	<i>T. hirsuta</i> , <i>T. versicolor</i> <i>Pleurotus. eryngii</i> , <i>P.cinnabarinus</i> ,	Kandioller <i>et al.</i> , (2001) Balakshin <i>et al.</i> , (2001)
(Bioblanchiment)	<i>T. versicolor</i> <i>P. cinnabarinus</i>	Camarero <i>et al.</i> , (2004) Georis <i>et al.</i> , (2003)



## Partie bibliographique

Industries variées (Traitement des eaux usées)	<i>Lentinula. Edodes</i> <i>Pleurotus. ostreatus</i> <i>Pycnoporus coccineus</i> <i>Rhus. Vernicifera</i>	Casa <i>et al.</i> , (2003) Aggelis <i>et al.</i> , (2003) Jaouani <i>et al.</i> , (2005) Durante <i>et al.</i> , (2004)
Synthèse organique	<i>T. versicolor</i> <i>T. versicolor</i> <i>T. villosa</i>	Schafer <i>et al.</i> , (2001) Akta <i>et Tanyolaç</i> (2003) Uchida <i>et al.</i> , (2001)

### 2.3. Les mycètes

#### 2.3.1. Généralités

Les mycètes ou fungi sont des organismes eucaryotes qui constituent un groupe autonome au sein du monde vivant, indépendant des Bactéries, des organismes naguère regroupés sous le nom de Protistes, des Végétaux et des Animaux. Leur structure primordiale est un thalle dépourvu de pigment assimilateur, dénommé « mycélium » chez les Champignons (Rispaïl, 2008). Elles sont principalement des organismes terrestres (Prescott *et al.*, 2007).

En plus des moisissures, les mycètes regroupent aussi les levures. Les moisissures sont des champignons pluricellulaires (filamenteux), alors que les levures sont des champignons unicellulaires (Madigan *et Martinko*, 2007).

#### 2.3.2. Les mycètes des laccases

La grande quantité de laccases a été largement rapportée à l'intérieur de la pourriture blanche (Mayer *et Staples*, 2002). Parmi ces champignons : *Phanerochaete. chrysosporium* (Martinez *et al.*, 2004), *Trametes versicolor* ou encore *Pleurotus ostreatus*.



Figure 8. Mycélium de *P. chrysosporium* en train de coloniser des copeaux de bois. (Martinez *et al.*, 2004)



Figure 9. La croissance de *Trametes pubescens* dans la nature (Faccello *et Cruz* 2009)

## Partie bibliographique

---

La plupart des laccases sont produites à partir du champignon *Trametes versicolor* (Lanteigne roch, 2010).

De nombreux composés phénoliques et aromatiques structurellement liés à la lignine étaient calculé pour leur capacité à susciter laccase la production par *P. pulmonarius*. (Solden et Dobson, 2001).

Quatre laccases ont été mises en évidence chez *P. ostreatus* (Mansur et al., 2003), 17 gènes de laccases sont présents chez *C. cinerea* (Kilaru et al., 2006).

La production de laccase de *P. pulmonarius* pourrait être considérablement améliorée en incluant un équimolaire combinaison de l'acide férulique et la vanilline comme inducteur. La construction de différents laccase isoforme répondre aux composés phénoliques implique une tâche possible de cette enzyme dans les processus de désintoxication (Souza et al., 2002).

### 2.3.3. *Trametes sp.*

*Trametes sp.* appartenant au phylum Basidiomycota, classe des basidiomycetes, sous-classe Agaricomycetidae, ordre Polyporales et de famille Polyporaceae, est assumé pour être l'un des producteurs principaux de laccase (Faccelo et Cruz, 2009). Il représente un champignon de la pourriture blanche (Gonzalez et al., 2003) cosmopolite de blancs polypores de putréfaction, y compris « la queue », il est caractérisé par des basidiocarps sessiles pileate et des systèmes hyphal trimitique (Carlson et al., 2014).

*Trametes* est probablement un du Basidiomycota le plus largement étudié pour la production et l'application d'enzymes ligninolytiques (Nyanhongo et al., 2007).



Figure 10. La morphologie du *Tametes sp.* : **A**, *Trametes versicolor*; **B**, hymenophore de *Trametes suaveolens* (Justo et Hibbett 2011).

## Partie bibliographique

---

### 2.3.4. *Chaetomium sp.*

*Chaetomium Sp.* est un champignon appartenant du phylum Ascomycota et d'ordre Sordariales et de la famille Chaetomiacées (Zareb, 2014). Ce genre a été signalées présentant une activité antagoniste contre certains pathogènes (El-Tarabily *et Sivasithamparam*, 2006).

Toutefois, les concentrations de leur spores dans l'air extérieur ne sont pas très élevées (Khan *et Wilson*, 2003).

Le *Chaetomium* se développe bien sur la plupart des matériaux de construction contenant de la cellulose, dans les bâtiments endommagés par l'eau (Fogle *et al.*, 2007).

La température létale du *C. globosum* est de 55 à 57 °C. Cependant, les ascospores sont bien plus résistantes aux conditions environnementales: elles peuvent survivre à une température de 60 °C pendant 60 minutes (Pieckova, 2003).

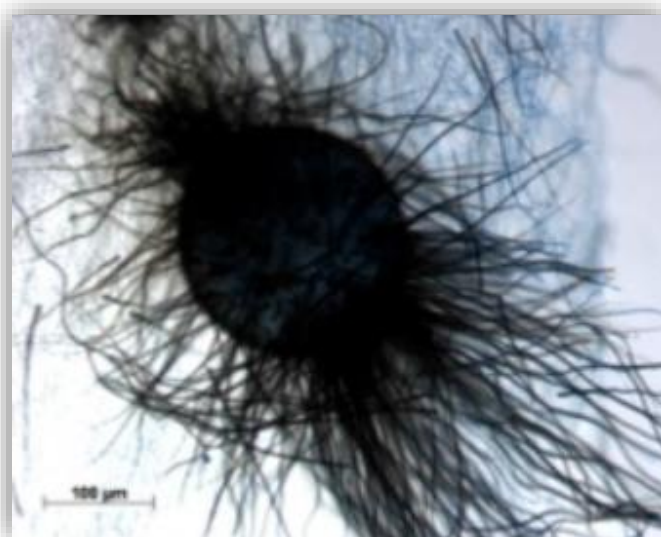


Figure 11. Aspect microscopique de *Chaetomium.sp* (Dromer *et al.*, 2013)

## 2.4. La citrouille

### 2.4.1. Généralité sur le genre *curcubita.sp*

Les cucurbitacées sont des plantes herbacées, monoïques ou dioïques, en général pourvues de vrilles et des feuilles alternes sans stipules, dicotylédone à fortes tiges rampantes munies de vrilles et dont certaines sont cultivées pour leurs gros fruits comestibles, comme la citrouille, le melon, la pastèque... ect. (Belattar, 2007 ; Pascault, 2012).

La citrouille est une légume classifiés en tant que « courges d'hiver » ou « potirons», très volumineuse, un peu allongée, de couleur jaune orangé ((Brancucci, 2009) appartient à la famille des cucurbitacées (Bachmann, 2010 ; Hallouin, 2012).

## Partie bibliographique

---

Les termes « citrouille » et « courge d'hiver » (« potiron ») ne correspondent à aucun taxon de la classification des espèces végétales et n'ont donc pas de validité scientifique (Goldman, 2004).



Figure 12. Musquée de Provence - *cucurbita moschata* (Pascault, 2012).

### 2.4.2. Origine de la citrouille

*Cucurbita*, courge, potiron, squash etc... sont toutes américaines mais originaires de lieux différents; on en connaît environ 25. Elles arrivent en Méditerranée dès la fin du XVe siècle où on leur donne des noms déjà existants en Méditerranée: français "citrouille", espagnol "calabaza", italien "zucca", arabe "qar'a" (Aubaile Sallenave, 2001).

### 2.4.3. Classification de la citrouille

La citrouille est une courge d'hiver appartient à la famille des cucurbitacées et au genre *Cucurbita* (Dornan, 2004 ; Hallouin, 2012).

La famille des cucurbitacées comprend 119 genres et quelque 825 espèces (Brancucci, 2011) et les courges représentent un genre parmi les 130 genres qui composent cette famille (Pascault, 2012). Le genre *Cucurbita* se divise en 5 grandes catégories (espèces) qui comprennent la majorité des citrouilles et des courges. (Pascault, 2012; Bodnar *et* Fitts, 2000). Ces espèces sont principalement les plus cultivées dans le monde entier : *Cucurbita pepo*, *Cucurbita mixta* et *cucurbita moschata*, *Cucurbita moschata* et *Cucurbita ficifolia*. (Pascault, 2012) Chacune de ces espèces compte au moins un type appelé « citrouille » dans le langage courant (Bachmann, 2010).

### 2.4.4. Production de la citrouille en Algérie

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












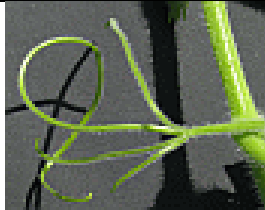
## Partie bibliographique

consommées dans la région de Ghardaïa, elles sont cultivées comme plante potagère dans la plupart des jardins familiaux de la wilaya, qui s'est forgée une réputation pour la production de la citrouille (Benseddik *et al.*, 2014). Dans la région de Touggourt, la culture de citrouille occupe une surface de 1704 m<sup>2</sup> (Allam *et al.*, 2013).

### 2.4.5. Composants de citrouille

Les courges sont des plantes à fortes tiges rampantes munies de vrilles et des feuilles (Pascault, 2012; Belattar, 2007). Elles sont aussi riches en pépins (graines) qui représentent une source de protéine et d'huile (Beavers *et al.*, 2008 ; Pascault, 2012).

Tableau 3. Les différents éléments de quelques espèces du genre *curcubita* : (Pascault, 2012)

Espèce	Feuille	Tige	Fleur	Vrille
<i>Cucurbita maxima</i>				
<i>Cucurbita pepo</i>				
<i>Cucurbita moschata</i>				

La citrouille est un légume économique et nutritif. Reconnue comme une bonne source de fibres, de potassium et de vitamines du complexe B (Sylvain *et* Charron, 2009)

Elle possède des vertus diurétiques, laxatives, sédatives et vermifuges. Elle est riche en carotène, contient presque 95% d'eau, des glucides, du calcium, du fer, des vitamines A, B1, B2, B3, C, D, E et F ainsi que de nombreux oligo-éléments.

La proportion des différents composants varie énormément en fonction de la variété et du mode de culture. Les jeunes feuilles de courge sont riches en vitamine C et en carotène (Brancucci, 2011).

## Partie bibliographique

Tableau 4. Les informations nutritionnelles pour 100 g de citrouille :

Nutriments principaux	Energie	Sels minéraux	Vitamines
protéines 1g	108 kJ	Sodium 1 mg	A 0,127mg
lipides 0,1g		potassium 383 mg	B1 0,05mg
glucides 5g	26 kcal	calcium 22 mg	B2 0,07mg
fibres alimentaires 2,2g		phosphore 44mg	C 12mg
		magnésium 8mg	E 1,1mg
		fer 0,8mg	

### 2.4.6. Utilisation de déchets de citrouille

D'après le CTA (2008), Les feuilles de citrouille sont largement consommées en Afrique. Elles sont nutritives (riches en bêta-carotène et en sels minéraux), délicieuses et bon marché. Elles peuvent ainsi contribuer à réduire la faim et la malnutrition.

Au Kenya, les feuilles fraîches de citrouille sont traditionnellement mélangées avec de la purée de pomme de terre pour préparer un plat local très populaire dénommé *mukimo* (CTA, 2008).

Les graines ou les pépins de la citrouille aussi sont utilisées pour l'extraction des huiles. elles peuvent être pressés en vue d'obtenir une huile d'un vert foncé à fort rapport économique qui affiche une teneur élevée en zinc, en vitamine E et en acides gras non saturés. (Wyss *et* Thönen, 2012, Beavers *et al.*, 2008). Elles constituent une source appréciable de protéine et d'huile (Pascault, 2012).

Les graines sont également appréciées dans les Chapias au Mexique ; elles y sont utilisées avec du miel pour confectionner un dessert connu sous le nom de palanquetas (Pascault, 2012).

Pour le genre *cucurbita moschata* (courges musquées) toute la plante est consommée (les tiges, les fleurs, les fruits immatures et les fruits mûrs (Pascault, 2012).

# **Matériel**

## **Et**

# **Méthodes**

### 3. Matériel et Méthodes

L'objectif de ce travail est la mise en évidence de l'activité laccasique produite sur milieu à base de déchets de citrouille par deux souches fongiques appartenant aux genres : *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* Ces dernières ont été fournies par le Laboratoire. Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frère Mentouri Constantine, situé à Chaabarsas.

#### 3.1. Test de développement des souches sur différents milieux de culture

##### 3.1.1. Réactivation des souches

La réactivation des souches *Chaetomium sp.* et *Trametes sp.* est effectuée sur gélose PDA (Annexe1). Le pH du milieu est ajusté à 6 et l'incubation est réalisée à 28°C pendant 7 jours.

##### 3.1.2. Préparation du substrat à base de déchets de citrouille à différentes concentrations

Cette étude consiste à tester le développement de *Chaetomium sp.* et de *Trametes sp.* sur différentes concentrations des milieux à base de déchets de citrouille.

La citrouille a été recueillie à partir de divers régions; Msila et la région de Mzaïer, Wilaya de JIJEL.

Les déchets sont séchés à l'air libre pendant 20 jours puis broyés à l'aide d'un moulin électrique ménager de manière à obtenir une poudre.

Le milieu de culture est préparé à partir de déchets de citrouille composé de feuilles, de tiges, des fibres et de peau. Plusieurs concentrations ont été préparées (2%,5%,7%) (g/L) et 2% d'agar a été additionné à chaque substrat : le substrat 1 (S1) représente un mélange de peau et de fibres 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 (50%) avec le substrat 2 (50%). Le pH des milieux a été ajusté à 6,5 et ce, par l'ajout de HCl 1N. Les milieux préparés sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 15min.

##### 3.1.3. Inoculation des souches sur les milieux gélosés

L'ensemencement est réalisé par repiquage d'une bouture d'hyphe terminal. La souche a été ensemencée au centre d'un milieu gélosé. L'incubation des boîtes de pétri est réalisée à 28°C jusqu'à apparition d'un développement mycélien (Bousseboua, 2005; Botton *et al.*, 1990).

#### 3.2. Test de production de laccase sur les différents milieux de culture

Afin de mettre en évidence la présence d'une activité laccasique sécrétée par les souches en utilisant les déchets de citrouille, un test a été effectué. Pour ce faire, *Chaetomium sp.* et *Trametes sp.* ont été ensemencées par la méthode des disques sur PDA additionné du gaïacol (0,01%). L'incubation a été



## Matériel et méthodes

---

effectuée à 28°C pendant 7 jours. L'apparition d'un halo rouge bordeaux est considérée comme une réaction positive résultant de l'oxydation du gaïacol (Budolla *et al.*, 2008).

### 3.3. Production de laccase sur milieu submergé

#### 3.3.1. Préparation du substrat

##### 3.3.1.1. *En absence d'inducteur*

La fermentation a été réalisée dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 150 ml du milieu à base de déchets de citrouille, choisi pour chaque souche, à une concentration de 2%. Après agitation pendant 10 min, Le pH du milieu a été ajusté à 6,2 avec du HCL 1N. Les milieux sont, ensuite, répartis en Erlenmeyer, puis autoclavés à 120°C pendant 15 min.

##### 3.3.1.2. *En présence d'inducteur*

100 µmol de CaCl<sub>2</sub> a été additionné à chaque Erlenmeyer préparés de la même façon expliqué au paravent (Nadeem *et al.*, 2014).

#### 3.3.2. Préparation de la suspension sporale

La suspension sporale est préparée par addition de 10 ml d'eau distillée stérile contenant 0,1% de Tween 80 à la souche cultivée sept jours sur PDA en boîte de Pétri. Les spores sont aseptiquement raclées superficiellement en utilisant une anse de platine (Sandhya *et al.*, 2005).

#### 3.3.3. Dénombrement des spores

Avant chaque inoculation, le nombre de spores est estimé par référence à la courbe d'étalonnage puis, la suspension est diluée de manière à obtenir un nombre de spores de 10<sup>7</sup>cellules/ml (Sumantha *et al.*, 2008; Paranthaman *et al.*, 2009; Murthy *et Naidu*, 2010).

#### 3.3.4. Conduite de fermentation

Les Erlenmeyer contenant le substrat sélectionné sont inoculés avec des disques de diamètre de 1 cm (5 disques pour chaque Erlenmeyer) et incubés à 30°C sous agitation à 120 rpm dans un incubateur agitateur. L'activité enzymatique a été mesurée après le troisième jour d'incubation.



Figure13. Fermentation liquide en Erlenmeyer

### 3.3.5. Prélèvement des extraits enzymatiques

Après fermentation, des extraits enzymatiques ont été prélevés à l'aide d'une micropipette et versés dans des tubes de conservation en plastique, puis ils ont été conservés à 4 C°.

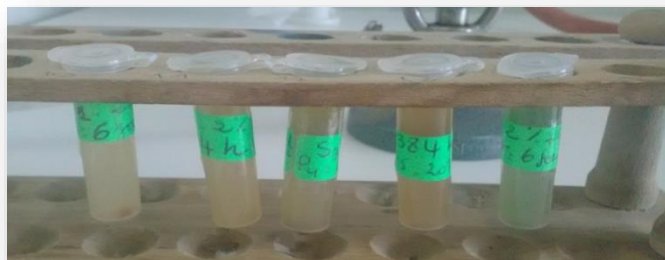


Figure14. Extraits laccasique

### 3.3.6. Dosage laccasique

Afin de déterminer l'activité laccasique, le dosage spectrophotométrique dans le visible des produits de l'oxydation d'un substrat phénolique a été mise en œuvre (Issa, 2009). Pour ce faire, l'ABTS a été choisi comme substrat. L'activité enzymatique des laccases est dosée à 30°C en utilisant 100µL de l'extrait enzymatique additionné à 1mL de milieu réactionnel (Annexe 2). La variation de la DO au spectrophotomètre à 420 nm est suivie pendant 1 minute, avec un coefficient d'extinction moléculaire  $\epsilon = 34450 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$  et exprimée par  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$ .

# **Résultats Et discussion**

### 4. Résultat et discussion

Ce travail est basé sur la mise en évidence de l'activité laccasique secrétée sur milieu à base de déchets de citrouille à différentes concentrations par *Chaetomium sp.* et *Trametes sp.* .

#### 4.1. Test de développement des souches sur les différents milieux de culture

##### 4.1.1. Réactivation des souches

Après 7 jours d'incubation, les souches *Chaetomium sp.* et *Trametes sp.* ont montré une bonne croissance sur milieu PDA (figure 16, 17).



Figure 15. Aspect macroscopique de *Chaetomium sp.* sur milieu PDA








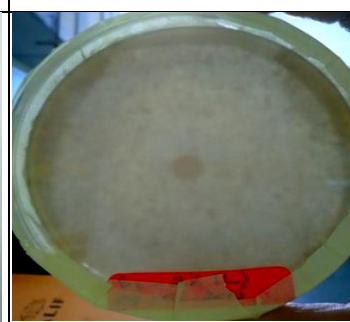
Figure 16. Aspect macroscopique de *Trametes sp.* sur milieu PDA

##### 4.1.2. Test de développement des souches sur les différents milieux de culture

Ce test a révélé que les deux souches testées ont pu se développer sur les trois différents milieux. Les souches *Chaetomium sp.* et *Trametes sp.* ont montré un bon développement sur milieu S2, qui est à base de feuilles et de tiges, par rapport aux autres milieux S1 et S3 (Tableau 5). Ce résultat peut être expliqué par la composition satisfaisante du milieu par rapport aux exigences des deux souches étudiées.

## Résultat et discussion

Tableau 5. Le développement de *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* sur les différents milieux de culture à base de déchets de la citrouille.

milieu souche	S1	S2	S3
<i>Chaetomium sp.</i>			
<i>Trametes sp.</i>			

Facello *et* Cruz (2007); ont utilisé la peau de banane comme substrat pour mettre en évidence la croissance de *Trametes sp.* et ils l'ont expliqués par la présence de facteurs importants dans le milieu causant l'attachement du champignon à la peau de banane. Par ailleurs, Gonzalez *et al.*, (2013) ont montré la capacité de *Trametes sp.* à se développer sur milieu à base de déchet de café, de soja et de cèdre sciure.

Ces résultats révèlent que les souches productrices de laccases ont la capacité de se croître sur différents déchets agroalimentaires.

### 4.2. Test de production de laccase sur les différents milieux

Ce test a pour but de démontrer la capacité de *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* à produire de la laccase en utilisant les déchets de citrouille comme étant la seule source de carbone (tableau 6).

Les résultats obtenus montrent que l'activité laccasique observée chez *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* varie d'un milieu à un autre.

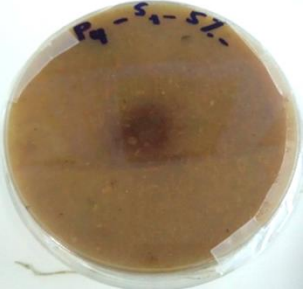
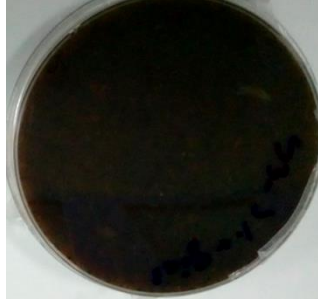
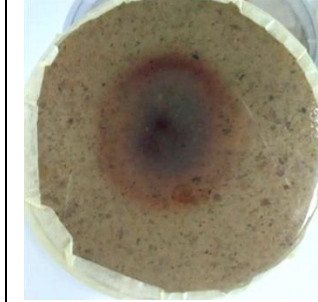
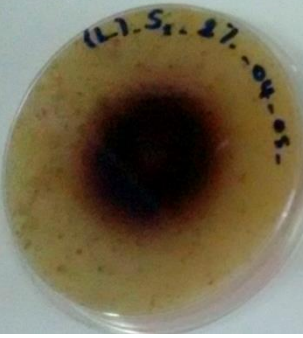

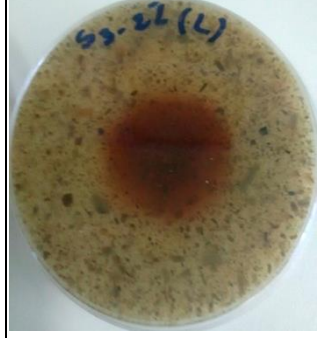
En effet, malgré la faible concentration de ce milieu, une bonne activité laccasique sécrétée par *Chaetomium sp.* a été observée sur milieu S3- 2% par rapport aux autres milieux. Par ailleurs, *Trametes sp.* a donné une activité laccasique importante sur milieu S1- 2%.

## Résultat et discussion

Ces résultats corroborent avec ceux de Faccelo *et* Cruz, (2007), qui ont obtenu une activité laccasique sécrétée par *Trametes sp.* en utilisant des déchets de banane et ceux de Moldes *et al.*, (2004) qui ont aussi eu une activité laccasique sur milieu à base de pépins de raisin.

Ces résultats ont permis de sélectionner la concentration optimale de déchets, ainsi que le milieu adéquat, à savoir : S3 à 2% pour *Cheatomium sp.* et S1 à 2% pour *Trametes sp.*

Tableau 6. L'activité de laccase sur les différents milieux à base de déchets de citrouille

Milieu \ Souche	S1	S2	S3
<i>Chaetomium sp.</i>			
<i>Trametes sp.</i>			

### 4.3. Production de laccase sur milieu submergé

#### 4.3.1. Dénombrement des spores

Le comptage des spores sur cellule de Thomas, a été estimé à  $12 \times 10^6$  cellule/ml, ce qui n'est pas suffisant, ceci peut être expliqué par la non sporulation des souches sélectionnées. De ce fait, la méthode d'inoculation du milieu par des disques a été réalisée afin de poursuivre le travail.

#### 4.3.2. Cinétique de production de laccase

*Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* ont montré des résultats variables lors du dosage de l'activité laccasique.

## Résultat et discussion

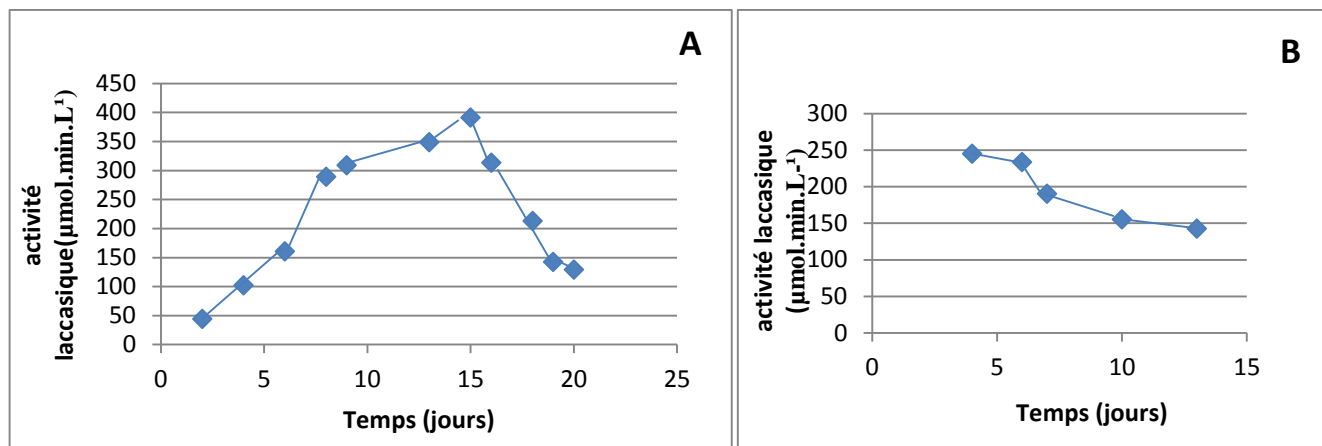


Figure 17. Evolution de l'activité laccasique de la souche *Chaetomium sp.* A. sans inducteurs et B. avec inducteurs.

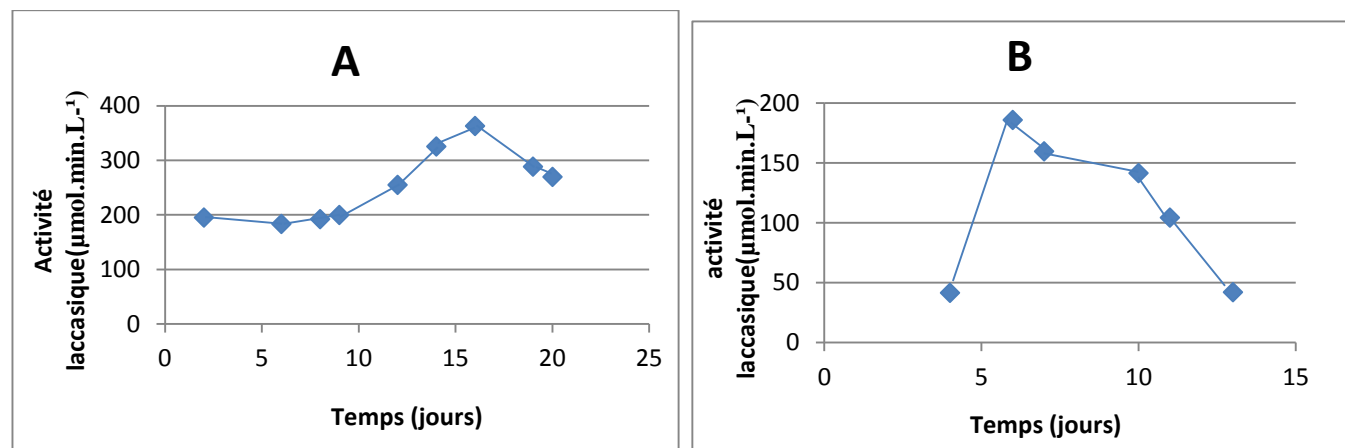


Figure 18. Evolution de l'activité laccasique de la souche *Trametes sp.* : A. sans inducteur, B. avec inducteurs

Les figures 17 et 18 représentent l'évolution de l'activité laccasique de *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* sans et avec inducteur.

Les résultats montrent que l'activité laccasique en présence d'inducteur est plus importante qu'en absence d'inducteur.

La production de laccase par *Chaetomium sp.* en absence de CaCl<sub>2</sub> a débuté dès le 2<sup>ème</sup> jour, après, une augmentation progressive de l'activité laccasique est observée jusqu'à atteindre son maximum (400 U/L). Au-delà de 15 jours d'incubation, l'activité laccasique a diminué. Ces résultats concordent à ceux établis par Hossain *et* Anantharaman (2006) qui ont obtenu une activité avoisinant 410 U/L produite par *Trametes sp.* sur milieu à base de bagasse. Cependant, Mendoza *et al.*, (2014) ont eu une activité moins importante (250U/L) en utilisant un milieu basal.

Le profil cinétique montre que l'activité laccasique chez *Trametes sp.* en absence d'inducteur CaCl<sub>2</sub> a été détecté au 2<sup>ème</sup> jours et a augmenté jusqu'à atteindre son maximum après 15 jours de fermentation

## Résultat et discussion

---

(393 U/L). D'autre part, en présence de  $\text{CaCl}_2$ , une activité laccasique est observée après 4 jours d'incubation (41,5 U/L), elle atteint son maximum après 6 jours (186 U/L).

En conclusion, en présence de  $\text{CaCl}_2$ , une diminution de l'activité laccasique est observée, ce qui signifie que le  $\text{CaCl}_2$  n'induit pas la production de laccase. Ces résultats ne corroborent pas avec ceux de Nadeem *et al.*, (2014) qui ont confirmé que l'utilisation de  $\text{CaCl}_2$  comme inducteur augmente de manière significative l'activité laccasique.



# Conclusion

## Conclusion

---

### 5. Conclusion

Le travail présenté dans cette étude consiste à la mise en évidence de l'activité laccasique produite sur milieu à base de déchets de citrouille par deux souches fongiques appartenant aux genres : *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* .

D'après la littérature consultée, aucune étude n'a montré qu'un milieu à base de déchets de citrouille peut être utilisé afin de produire la laccase. De ce fait, *Chaetomium sp.* et *Trametes sp.* étaient cultivées sur différents milieux à base de déchets de citrouille et les résultats montrent qu'il y a eu une croissance, ainsi qu'une activité laccasique sécrétée par les deux souches sur les trois milieux.

Par ailleurs, la recherche du milieu adéquat pour la production de laccase a révélé que le milieu S1 - 2% (un mélange de peau et de fibres) est le plus adéquat pour la souche *Trametes sp.* et le milieu S3 - 2% est celui le plus approprié pour *Chaetomium sp.*.

Une fermentation afin de produire la laccase a été réalisée. En effet, l'activité laccasique en absence d'inducteur a atteint une valeur maximale avoisinant 400 U/L après 15 jours d'incubation. Cependant, l'ajout de  $\text{CaCl}_2$  au milieu de culture n'induit pas la production de laccase.

La fermentation liquide sur milieu de faible concentration (uniquement 2%) a permis d'avoir une activité laccasique sans amélioration.

Ces résultats sont juste un pas dans la recherche des mycètes développant une activité laccasique. D'autres études doivent être accomplies pour compléter ces résultats.

De ce fait, et au terme de cette recherche nous pouvons nous fixer les points suivants en perspectives:

Au terme de cette étude, il serait peut être intéressant de faire:

- Identification moléculaire des souches fongiques;
- Optimisation du milieu afin d'améliorer le rendement;
- Production à grande échelle;
- Purification et caractérisation de laccase.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

### 6. Références bibliographiques

AKTAS, N; TANYOLAC, A. *Kinetics of laccase-catalyzed oxidative polymerization of catechol*. J Mol Catal B: Enz; 22. 2003, 61-69.

ALJAWISH, Abdulhadi .*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. 08 juillet 2013,321 p.

ALLAM, A; TIRICHINE, A ; CHELOUFI, H ; ARIF, Y; TAMA, M 1; MIMOUNI, M A. *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, 2013, 64-71.

ARORA, D S; SHARMA, R K. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Appl Biochem Biotechnol* , 2010, 160: 1760–1788.

ASTHER,M ; CAMARERO, S ; COLOM, J.F; MARTINEZ, A.T; MARTINEZ, M.J ; PEREZ-BOADA, M ; RECORD, E., SIGOILLOT, C., SIGOILLOT, J.-C. ET VIDAL, T., Comparaison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J. Biotechnol.* 2005,115: 333-343.

AUBAILE SALLENAVE, F. The *Cucurbitaceae* in Mediterranean from Babylonian to present days: the courgette and al-faqqiis case. - *Bocconea* 13. 2001, 239-250 - ISSN 1120-4060.

BACHMANN, Janet. Mise en marché et production de citrouilles et courges d'hiver biologiques. Spécialistes agricoles du National Center for Appropriate Technology (NCAT).2010, no IP371.

BAILEY, MR; WOODARD, SL; CALLAWY, E; BEIFUSS, K; LUNDBACK, MM;LANE, J. Improved recovery of active recombinant laccase from maize seed. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63.2004, 390–397.

BALAKSHIN M, CHEN C-L, GRATZL JS, KIRKMAN AG, JAKOB H. Biobleaching of pulp with dioxygen in laccase-mediator system--effect of variables on the reaction kinetics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2001 ; 16:205-215.

BALDRIAN, P. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63 (5).2004 ,560-563.

BALDRIAN, P. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*,30.2006, 215–242.

BARRIERE, F; KAVANAGH, P; LEECH, D. A laccase-glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer. *Electrochimica Acta.* 51 (24). 2006,5187- 5192.

## Références bibliographiques

---

BATAILLE, Gwenaël ; COSTER, Quentin ; GILET, Monique ; ROBISE, Aurélie. La chimie du vert ou comment allier industrie des couleurs et écologie. Université catholique de Louvain. , 2011.

BEAVERS, Roxanne ; MACKENZIE, Joanna; HAMMERMEISTER, Andy. production d'huile de pépins de citrouille : fertilité et lutte contre les ravageurs : Rapport de recherche intermédiaire, centre d'agriculture biologique(CABC),Canada. 2008, 38.

BELATTAR, Hakima, Diversité dans la végétation cultivée de la région de Mila: inventaire et caractéristiques biologiques. Mémoire en biologie végétale. Université Mentouri Constantine, 2007. 118p.

BELMESSIKH, Aïcha, *Optimisation de la production de la protéase neutre par Aspergillus oryzae sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide.* Thèse de magister en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine, Soutenu le : 03/05/2011.129p.

BENSEDDIK, A; AZZI, A; ALLAF, A K. *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, 2014.

BEZAWADA, Jyothi *.production améliorée, récupération et application d'une protéase alcaline produite en utilisant les boues D'épuration comme substrat ;* Thèse de Doctorat en sciences en sciences de l'eau ; Université du Québec. 2010.

BODNAR,J ; FITTS, M. Culture de la citrouille et de la courge, Fiche de données originale. 2000, 00-032,256, ISSN 1198-7138.

BOTTON ;BRETON,A ;FEVRE,M ;GUY,PH ;LARPENI,J ;P ;Veau *.Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle.*2<sup>o</sup>Edition Massan,Paris,New york, Million, Barcelone, Mixico,Saopawlo. 1990.

BRANCUCCI Michel. la courge. Agence d'information agricole romande (AGIR), Saint-Paul, Fribourg. 2009.

BUDOLLA, V ; SUBOSK, C ; PALLAVI, H ; RAJASEKHAR, R. Screening and assesment of laccase producing fungi isolated from environmental samples. *African journal of biotechnologie.* Vol .2008. Pp1129-1133.

CAMARERO, S ; GARCIA, O ; VIDAL, T ; COLOM ,J; DEI RIO, JC; GUTIERREZ, A. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology.* 2004, 35:113-20.

## Références bibliographiques

---

CAMARERO, S L D; MARTINEZ, M J; MARTINEZ, A T. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* , 2005,71(4): 1775-1784.

CARLSON, Alexis; JUSTO, Alfredo; HIBBETT, David S. *Species delimitation in Trametes: a comparison of ITS, RPB1, RPB2 and TEF1 gene phylogenies*. Biology Department Mycologia, Clark University, 950 Main Street, Worcester, Massachusetts 01610. 2014, 11p.

CASA, R; D'ANNIBALE, A; PIERUCCETTI, F; STAZI, SR, GIOVANNOZZI, SG; LO CASCIO, B. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*. 2003; 50:959-966.

CHEN, H T; CALABRESE BARTON, S; BINYAMIN, G; GAO, Z; ZHANG, Y; KIM H H; HELLER, A. A miniature biofuel cell. *Journal of the American Chemical Society*. 2001. (123) 8630-8631.

CLAUS, H; FABER, G; KONIG, H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungallaccases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002; 59:672-678.

CLAUS, H., Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol*. 2003,179: 145–150

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 2004, 35 (1-2): 93-96

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

COUTO, SR; Herrera, JLT. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Advances*. 2006, 24: 500–513.

CTA, *Conservation des légumes feuilles et des fruits* : Collection Guides pratiques du CTA, No 8, Centre technique de coopération agricole et rurale- Postbus 380, 6700 AJ Wageningen, Pays-Bas (financé par l'Union européenne). 2008, ISSN 1874-8864.

DORNAN, Jean. *La citrouille : un légume en plein essor*. Division de l'agriculture Immeuble Jean Talon, 12e étage, Ottawa, K1A 0T6 Canada, 2004, 11-621, ISBN: 0-662-78141-4.

DROMER Françoise, BRETAGNE Stéphane, LORTHOLARY Olivier, *Mycoses Invasives et Antifongiques* ; Rapport annuel d'activité, Centre national de référence, 2013 ;47p.

DROUIN, M. Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de *Maître ès sciences* (M.Sc.). Canada. 2005.

## Références bibliographiques

---

DURANTE D, CASADIO R, MARTELLI L, TASCOG, PORTACCIO M, DE LUCA P. Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2004; 27:191-206.

ELSHAFEI, AM, HASSAN Mm, HAROUN Bm, ELSAYED Ma et OTHMAN Am. Optimisation de laccase production à partir de *Penicillium martensii* NRC345. *Advanc dans la vie Sci*. 2012, 2: 31-37.

EL-TARABILY K.A; SIVASITHAMPARAM K., Potencial of yeast as bicontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* .2006, 47:25-35.

ENGUITA, F J; MARTINS L M ; HENRIQUES,A O; CARRONDO,M.A .crystalle structure of a bacterial endospore coat componet. A laccase with enhanced thermostability propertries ; *joumal of biological chimistrie* . 2003, 278 :19416-19425.

FACCELO, Johann; CRUZ Osma. *Banana skin : a novel material for a low-cost production of laccase*. Master thesis, graduate studies in chemical, environmental And process engineering, *Rovira i Virgili University*: Ecole Technique Supérieur d'Enginyeria Química, spain. 2007, 28p.

FACCELO, Johann; CRUZ Osma . « *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. 2009.ISBN: 978-84-692-7932-8.

FARNE, A M; CRIQUET, S, TAGGER, S., GIL AND, G J. Le petit, Canadian *.Journal of Microbiology* 2000,46, 189.

FOGLE, M R; DOUGLAS,D R; JUMPER, C A; STRAUS, D C . Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia*. 2007, 164[1], 49-56.

FORGACSA E, CSERHATIA T, OROS G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environ Int*. 2004, 30: 953–971.

FRASCONI, M.; FAVERO, G.; BOER,H.; KOIVULA, A.; MAZZEI, F. Kinetic and biochemical properties of high and low redox potencial laccases from fungal and plant origin . *Biochimi. Biophys Acta*. 2010, 1804, 899-908.

GEORIS J; LOMASCOLO A; CAMARERO S; DORGEO V; HERPOEL L; ASTHER M. *Pycnoporus cinnabarinus* laccases: an interesting tool for food or non-food applications. *Meded Fac Landbouwkwd Toegep Biol Wet* 2003; 68:263-266.

## Références bibliographiques

---

GIANFREDA, L; RAO M A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004. 35(4): 339-354.

GODIN, B ; AGNEESSENS R ; GOFFLOT S ; LAMAUDIÈRE S ; SINNAEVE G ; GUERIN P A ; DELCARTE J. *Revue sur les Méthodes d'Analyse des Polysaccharides Structuraux des Biomasses Lignocellulosiques*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2011, Vol. 15, pp. 165 – 182,.

GODIN, B ; GHYSEL, F ; AGNEESSENS, R ; SCHMIT T., GOFFOT S., LAMAUDIÈRE S., SINNAEVE G., GOFFART J.P., GERIN P.A., STILMANST D. et DELCARTE J., 'Détermination de la Cellulose, des Hémicelluloses, de la Lignine et des Cendres dans Diverses Cultures Lignocellulosiques Dédiées à La Production de Bioéthanol de Deuxième Génération', *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2010, Vol. 14, pp. 549 - 560.

GOLDMAN, Amy. *The Complete Squash: A Passionate Grower's Guide to Pumpkins, Squash, and Gourds*. Artisan Books, NY. [Note: Amy Goldman is president of the BOD of Seed Savers Exchange, Decorah, IA], 2004.

GOLZ-BERNER K. WALZEL B. ZASTROW L. DOUCET O. (04.03.2004). Cosmetic and dermatological preparation containing copperbinding proteins for skin lightening. International Patent Application W02004017931.

GONZALEZ JC, MEDINA SC, RODRIGUEZ A, OSMA JF, ALMECIGA-DIAZ CJ, SANCHEZ . Production de *Trametes pubescens* Laccase sous submergées et semi-solides conditions de culture sur l'agro-industriels déchets. 2013. doi: 10.1371 / journal.pone.0073721.

GONZALEZ Tania , TERRON Maria del Carmen, ZAPICO Ernesto , YAGUE Susana, TELLEZ Alejandro, JUNCA Howard et GONZALEZ Aldo, *Identification of a new laccase gene and confirmation of genomic predictions by cDNA sequences of Trametes sp. I-62 laccase family*, Centro de Investigaciones Biológicas, Velazquez 144, E-28006 Madrid, Spain, 2003.

GUSETU, Georgiana. *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. 2010.

HALLOUIN, Isabelle. Courges, Potimarrons, Butternuts, en Provence. Fiche Culturelle Courge. Chambre d'agriculture des Bouches-du-Rhône. Décembre 2012.



## Références bibliographiques

---

- HOSSAIN SM, ANANTHARAMAN N. Activité amélioration d'enzymes ligninolytiques de *Trametes versicolor* avec de la poudre de bagasse. *Afr J Biotechnol.* 2006,5: 189-194.
- HUTTERMANN. A.C., A. MAI and A. KHARAZIPOUR ., *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001,55, 387.
- INTRA A, NICOTRA S, RIVA S, DANIEL B. Significant and unexpected solvent influence on the selectivity of laccase-catalyzed coupling of tetrahydro-2-naphthol derivatives. *Adv Synth Catal.* 2005, 347: 973-977.
- ISSA Nizar. *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, (2009).
- JAOUANI A, GUILEN F, PENNINCKX MJ, MARTINEZ AT, MARTINEZ MJ. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology.* 2005; 36: 86 ~ 478.
- JAIN A, MORLOK CK, HENSON JM. Comparaison de l'état solide et l'état submergé fermentation pour la biotransformation du panic raide à l'éthanol et de l'acétate par *phytofermentans Clostridium* . *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013,97: 905-917.
- JEANNEAU Alexandra. Etude sur la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*. DEA , 2005.
- JIMENEZ-JUAREZ. N, Roman-Miranda. R, A. Baeza, A. Sánchez-Amat, R. Vazquez-Duhalt and B. Valderrama. *Journal of Biotechnology.* 2005,117, 73.
- JOHANNES, C. et MAJCHERCZYK, A., 2000. *Laccase activity tests and laccase inhibitors.* *J. Biotechnol.* 78 (2): 193-199.
- JUSTO Alfredo & Hibbett David S., *Phylogenetic classification of Trametes (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset*, TAXON 60 (6) • Clark University, Biology Department, 950 Main St., Worcester, Massachusetts 01610, U.S.A. 2011, 1567–1583.
- KANDIOLLER G, CHRISTOV L. Evaluation of the delignification and bleaching abilities of selected laccases with HBT on different pulps. In: Argyropoulos DS, editor. *Oxidative delignification chemistry fundamentals and catalysis.* ACS symposium series, Vol. 785. USA: Oxford University Press; 2001. p. 427-443.

## Références bibliographiques

---

- KHAN, N. N. AND WILSON, B. L. . *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. 2003, 38[12], 2759-2772.
- KIISKINEN LL, RATTO M, KRUUS K. Screening for novel laccase-producing microbes. *J Appl Microbiol.* 97, 2004, 640–646
- KILARU S, HOEGGER PJ, KÜES U, *The laccase multi-gene family in Coprinopsis cinerea has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies*. *Current Genetics* 50.2006, 45-60.
- KIM .Y.S, CHO.N.S,EOM.T.J, SHIN.W. Purification and characterization of a laccase from *Cerrena unicolor* and its reactivity in lignin degradation. *Bulletin Chemical Society*, 2002,23, 985-989
- KIRK O, BORCHERT TV, FUGLSANG CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*; 13. 2002, 345-351.
- KNAPP, J., E. VANTOCH-WOOD and F. ZHANG. Use of Wood – rotting fungi for the decolorization of dyes and industrial effluents, In: *Fungi in Bioremediation 2001*.
- KNUTSON, K. et RAGAUSKAS, A.,. Laccase-mediator biobleaching applied to a direct yellow dyed paper. *Biotechnol. Prog* 2004 ,20 (6): 1893 -1896.
- KOBAYASHIA, S. ET HIGASHIMURAB, H.. Oxidative polmerization of phenols revisited. *Progress in Polymer Science.* 2003, 28: 1015-1048.
- KUNAMNENI Adinarayana , ANTONIO Ballesteros, FRANCISCO J. Plou ; MIGUEL Alcalde; *Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications* ; Departamento de Biocatálisis, Instituto de catálisis y Petroleoquímica, la SCCI, 28049-Madrid, Espagne .2007,233.
- KURISAWA M, CHUNG JE, UYAMA H, KOBAYASHI S. Laccase-catalyzed synthesis and antioxidantproperty of poly(catechin). *Macromol Biosci.* 2003, 3: 758-764
- KUUVA T, LANTTO R, REINIKAINEN T, BUCHERT J, AUTIO K. Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocoll.* 2003; 17:679-684.
- LANTEIGNE ROCH LISA-MARIE, *Utilisation des enzymes lipase et laccase pour améliorer la blancheur d'une pâte désencrée de papier journal*, mémoire de recherche en science de l'environnement, Université du Québec à trois-rivières, 2010. p 30.

## Références bibliographiques

---

LEVAVASSEUR Loïc. *Suivi simultané de la consommation d'oxygène et de la Consistance des pâtes de farine de blé à l'aide d'un pétrin Instrumenté (le sitoxygraphe) : tentative d'explication Biochimique et rhéologique. Application à l'ajout de Laccases.* Thèse de doctorat en sciences alimentaires. Université Paris VII et Paris XI, Soutenue le 3 Avril 2007.

MADAD Nidal , *Fractionnement et polymérisation enzymatique des lignosulfonates de sodium : études structurale, chimique, physico-chimique et cinétique*, thèse de doctorat Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Nancy : Institut National Polytechnique De Lorraine, 23 Septembre 2011.

MADHAVI , Vernekar ; LELE S.S. « Laccase properties, use », *BioResource* 4(4) .2009,1694-1717. 1694

MADIGAN M.T., MARTINKO J.M. *Biologie des microorganismes.* 11<sup>ème</sup> édition. *Pearson Education.* Broek. France.2007,pp. 478; 479.

MAHAJAN Ruchika, SHARMA Neeta Raj, MAHAVIR JOSHI Ans. Optimization of Lignocellulose Degrading Enzyme Laccase from Basidiomycetes Using One Variable at a Time Approach. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.*2015, 275-285, ISSN: 0975-8585.

MANOLE, Alina; HEREA, D ; CHIRIAC, H ; MELNIG,V. *laccase activity determination ; Scientific Annals of "alexandru ioan cuza din iași" university ;* 2008, 24p.

MANSUR M, ARIAS ME, COPA-PATINO JL, FLARDH M, GONZALEZ AE , The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia* 2003.95: 1013-1020.

MANZANARES.P, FAJARDO.S AND MARITN.C , *Journal of Biotechnology.* 2001,43, 125.

MARTINS. L.O, C.M. SOARES, M.M. PEREIRA, M. TEIXERA, T. COSTA, G.H. JONES AND A.O. HENRIQUES, *Journal of Biological Chemistry.* 2002 ,277, 18 849.

MARTINEZ D, LARRONDO LF, PUTNAM N, SOLLEWIJN GELPKE MD, HUANG K, CHAPMAN J, HELFENBEIN KG, RAMAIYA P, DETTER JC, LARIMER F, COUTINHO PM, HENRISSAT B, BERKA R, CULLEN D, ROKHSAR D. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology* .2004, 22: 695-700.

MAYER A.M.; STAPLES R.C.,. *Laccase: new functions for an old enzyme.* *Phytochemistry.* 2002, 60: 551-565.

## Références bibliographiques

---

MENDOZA, Laura ; Ibrahim, Victor ; Alvarez, Maria Teresa ; Hatti-Kaul, Rajni ; Mamo, Gashaw. Laccase production by *Galerina sp.* and its application in dye decolorization. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 2014. ISSN 2141-2413 ; pp. 13-22.

MEZA Juan Carlos, LOMASCOLO Anne, CASALOT Laurence, SIGOILLOT Jean-Claude, AURIA Richard -Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse : Influence of ethanol vapours as inducer, *Process Biochemistry*, 2005, 40 p. 3365-3371.

MICHNIEWICZ A, LEDAKOWICZ S, JAMROZ T, JAROSZ-WILKOLAZKA A, LEONOWICZ A. Decolorization of aqueous solution of dyes by the laccase complex from *Cerrena unicolor*. *Biotechnologia* 2003; 4:194-203.

MINUSSI RC, PASTORE GM, DURAN N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 2002; 13: 205-216.

MINUSSI RC, PASTORE GM, DURAN N. Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresource Technology* 2007; 98:158-164.

MISHRA A, KUMAR S, KUMAR S. Application of Box- Benhken experimental design for optimization of laccase production *Coriolus versicolor* MTCC138 in solid-state fermentation. *J Sci Indust Res.* 2008, 67: 1098-1107.

MOLDES D, LORENZO M, SANROMAN MA .Différentes proportions des isoenzymes de laccase produits par des cultures submergées de *Trametes versicolor* cultivés sur les déchets lignocellulosiques. *Biotechnol Lett.* 2004.26: 327-330.

MOROZOVA OV, SHUMAKOVICH GP, GORBACHEVA MA, SHLEEV SV, YAROLOV AI. Laccases "bleu". *J Biochem.* 2007,72 (10): 1136-1150.

MURTHY P.S., NAIDU M.M. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Appl. Sci. J.*, 8(2); 199-205.

NADEEM, A ; BAIG,S ; SHEIKH,N . *Mycotechnological production of laccase by Pleurotus Ostreatus-PI and its inhibition study.*the journal of Animal and Plant sciences, 24(2) : 2014, page :492-502.ISSN :1018-7081.

NICOLAS, J., BILLAUD, C., ROUET MAYER, M.A. ET PHILIPON, J.,. Enzymatic browning. 1.Biochemical aspects. *In Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition.* Caballero, B., Trugo, L. et Finglas, P. M., eds., Academic Press. London, 2003, 1: pp 678-686.

## Références bibliographiques

---

NYANHONGO. G.S., J. GOMES, G. GUBITZ, R. ZVAUYA, J.S. READ AND W. STEINER, *Bioresource Technology* .2002,84, 259.

NYANHONGO G. S., GÜBITZ G., SUKYAI P., LEITNER C., HALTRICH D., LUDWIG R. *Oxidoreductases from Trametes spp. in Biotechnology: A Wealth of Catalytic Activity*. Food Technology and Biotechnology 45 (3) (2007), 250–268.

NICOTRA S, CRAMAROSSA MR, MUCCI A, PAGNONI UM, RIVA S, FORTI L. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron*.2004, 60: 595-600.

OSMA JF, TOCA-HERRERA JL. l'analyse. Coût de Rodríguez-Couto dans la production de laccase. *J Environ Gérer*. 2011, 92: 2907-2912.

PALMIERI G, GIARDINA P, BIANCO C, FONTANELLA B, SANNIA G, Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol*. 2000, 66: 920-924.

PARANTHAMAN R., ALAGUSUNDARAM K., INDHUMATHI J., Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Agric. Sci.*, 5(3); 2009, 308-312.

PASCAULT Michel. Les courges. Association des jardins familiaux de Landser. 2012.

PATEL R., DODIA M., SINGH S.P. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.* : Production and optimization. *Proc. Biochem.*, 2005, 40; 3569–3575.

PIECKOVA, E. . In vitro toxicity of indoor *Chaetomium Kunze ex Fr.* *Ann Agric. Environ Med*. 2003, 10[1], 9-14.

PILZ R, HAMMER E, SCHAUER F, KRAG U. Laccasecatalyzed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 200, 360: 708-712.

PIONTEK K, ANTORINI M, CHOINOWSKI T., Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å... resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277: 37663-37669.

PRESCOTT , L.M ; HARLEY J.P ;KLEIN D ;A. *Microbiologie*. Bruxelles : de boeck. 2<sup>ème</sup> édition. 2007. ISBN : 978-2-8041-4256-8.

RISPAIL. P. *CHAMPIGNONS: Principaux Champignons impliqués en pathologie humaine Mycoses chez l'Homme*. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes. 2008.

## Références bibliographiques

---

- RIVA, S, *Laccases: blue enzymes for green chemistry*. Trends in Biotechnology.2006, 24(5): p. 219-226.
- ROBERT D, CATESSON A-M. Organisation végétative, Volume 2 de Biologie végétale: caractéristiques et stratégie évolutive des plantes, Editions Doin ROCHEFORT. D, *Étude des réactions enzymatiques et électrochimiques impliquées dans le bioblanchiment de la pâte à papier*, Thèse de doctorat, Université de Montréal, Département de chimie, Montréal. (2000).
- ROBLES, A., LUCAS, R., ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G. ET GALVEZ, A.,. Phenol oxidase (laccase) activity in strains of the hypomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enz. Microb. Technol.* 2000, 26: 484-490.
- RODRIGUEZ, C. Degradation of Pharmaceuticals in sewage sludge by *Trametes versicolor*. Departament d'Enginyeria Química. Barcelona, Thesis Universitat Autònoma de Barcelona. 2012.
- RODRIGUEZ COUTO S, SANROMAN Ma. Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourization ability. *Journal of Food Engineering*. 2006, 73:388- 393.
- RODRIGUEZ S. l'exploitation des déchets biologiques pour la production de produits à valeur ajoutée dans des conditions de fermentation à l'état solide. *Biotechnol J* 3: 2008, 859-870.
- ROCHEFORT. D, *Étude des réactions enzymatiques et électrochimiques impliquées dans le bioblanchiment de la pâte à papier*, Thèse de doctorat, Université de Montréal, Département de chimie, Montréal. (2001).
- SADHASIVAM S, SAVITHA S, SWAMINATHAN K, LIN FH. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochem.* 43: 736-742, (2008).
- SANDHYA C., SUMANTHA A., SZAKACS G., PANDEY A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 2005, 40; 2689–2694.
- SATO .Y., B. WULI, R. SEDEROFF AND R. WHETTEN , *Journal of Plant Research*. 2001, 114, 147.
- SAVITHA S. DESAI, GURURAJ B. TENNALI, NITYANAND CHANNUR, A.C. ANUP, GOURI DESHPANDE, B.P. AZHAR MURTUZA. *Isolation of laccase producing fungi and partial characterization of laccase*, Department of Biotechnology, B.V.B. College of Engineering and Technology, Hubli, Karnataka 580031, India 2011, 1(4):543-549, ISSN 2249-9075.
- SCHAFFER A, SPECHT M, HETZHEIM A, FRANCKE W, SCHAUER F. Synthesis of substituted

## Références bibliographiques

---

imidazoles and dimerization products using cells and laccase from *Trametes versicolor*. *Tetrahedron*.2001; 57:7693- 7699.

SCHLIEPHAKE, K., MAINWARING, D.E., LONERGAN, G.T., JONES, I.K. ET BAKER, W.L. Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enz. Microb. Technol.*2000, 27 (1-2): 100-107.

SELINHEIMO E, KRUIUS K, BUCHERT J, HOPIA A, AUTIO K. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 2006; 43: 152- 159.

SHLEEV, S., PERSSON, P., SHUMAKOVICH, G., MAZHUGO, Y., YAROLOPOV, A., RUZGAS, T. GORTON, L. Laccase-based biosensors for monitoring lignin. *Enz.Microb.Technol.* 2006; 39 (4): 835-840.

SHUMAKOVICH, G.P., SHLEEV, S.V., MOROZOVA, O.V., KHOHLOV, P.S., GAZARYAN, I.G. et YAROLOPOV, A.I.,. Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators. *Bioelectrochem.*2006, 69 (1): 16-24.

SOARES GMB, PESSOA AMORIM MT, HRDINA R, COSTA-FERREIRA M. Studies on the biotransformation of novel disazo dyes by laccase. *Process Biochemistry*. 2002; 37:581- 587.

SOLDEN DM AND DOBSON DW. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiol.* 147: 1755–1763, (2001).

SOUZA CGM, ZILLY A, PERALTA RM. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *J Bas Microbiol.* 42: 83–90, (2002).

SREBOTNIK, E; HAMMEL, K.E. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *J. Biotechnol.* 81 (2-3): 179-188. (2000).

SUMANTHA A., FONTANILLE P., LARROCHE C., PANDEY A. Exploration of fungal spores as a possible storehouse of proteolytic biocatalysts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 24; 2897–2901.

SUZUKI. T, ENDO. K, ITO .M, TSUJIBO. H, MIYAMOTO. J ; INAMORI. Y, *Bioscience Biotechnology andBiochemistry*. 2003,67, 2167.

SYLVAIN Nathalie. Dt.P ; CHARRON Marise Dt.P. *La citrouille sous toutes ses formes*:24-09-2009, <https://www.harmoniesante.com/HS/default.aspx?url=https://www.harmoniesante.com/HS/astuces.aspx?id=214>

TINGRY Sophie, MARC Cretin; INNOCENT Christophe. 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° 373.2013.

## Références bibliographiques

---

TORRES, E., BUSTOS-JAIMES, I. ET LE BORGNE, S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2003, 33: 47-54.

UCHIDA H, FUKUDA T, MIYAMOTO H, KAWABATA T, SUZUKI M, UWAJIMA T. Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 287:355- 358.

VASCONCELOS A.F, A.M. BARBOSA, R.F.H. DEKKER, I.S. SCARMINIO AND M.I. REZENDE, *Process Biochemistry*.2000, 35,1131.

VAZ-DOMINGUEZ, C.; CAMPUZANO, S.; RÜDIGER, O.; PITA,M.; GORBACHEVA, M.; GORBACHEVA, M.; SHLEEV, S.; FERNADEZV.M.; DE LACEY, A.L.. « Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition ». *Biosensors and Bioelectronics* 24, 531-537(2008).

WERTZ Jean-luc. la lignine. *Document FARRWal Avec le soutien de la Région Wallonne – DGO3/4*,2010.

WYSS Gabriela, THÖNEN Melanie. *Résidus dans les Cucurbitacées*, fiche technique n°comm.1487, Institut de recherche de l'agriculture biologique, CH-5070 Frick, Suisse, 2012; p 4.

XIAO YZ ; CHEN Q; HANG J ; SHI YY, WU J, HONG YZ, WANG YP. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes sp.* AH28-2.,*Mycologia*. 2004,96: 26-35.

XU, F., DEUSSEN, H.-J.W., LOPEZ, B., LAM, L. ET LI, K. Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds: Redox potential, electron-transfer kinetics and radical stability. *Eur. J. Biochem*. .2001, 268 (15): 4169-4176.

XU, F., KULYS, J.J., DUKE, K., KRIKSTOPAITIS, K., DEUSSEN, H.J.W., ABBATE, E., GALINYTE, V. SCHNEIDER, P. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds .*Applied and Environmental Microbiology*.2000, 66, 2052-2056.

ZAREB, AMINA. Contribution à l'étude des mycoendophytes foliaires du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) de dayata Aiat (Timzerth, Laghouat, Algérie). Mémoire de Magister en science Agronomique.Université Mouloude Mammerride tizi ouzou, le 12/ 11/ 2014,143p.

Zille, A; Tzanov, T; Guebitz, GM; Cavaco-Paulo, A. Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. *Biotechnology Letters*. 2003, 25: 1473-1477.



# Résumés

### 7. Résumé

L'objectif de ce travail est la mise en évidence de l'activité laccasique produite sur milieu à base de déchets de citrouille par deux souches fongiques appartenant aux genres : *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.*, qui ont été fournies par le Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frères Mentouri Constantine, situé à Chaabarsas.

Les souches sélectionnées ont été cultivées sur différents milieux à base de déchets de citrouille (S1: un mélange de fibres et de peau ; S2 : un mélange de tiges et de feuilles; S3: un mélange de S1 (50%) avec S2 (50%)) et les résultats montrent qu'il y a eu une croissance, ainsi qu'une activité laccasique sécrétée par les deux souches sur les trois milieux.

Par ailleurs, la recherche du milieu adéquat pour la production de laccase a révélé que le milieu S1 - 2% est le plus adéquat pour la souche *Trametes sp.* et le milieu S3 - 2% est celui le plus approprié pour *Chaetomium sp.*.

En effet, La production de laccase en milieu submergé a révélé que l'activité laccasique en absence d'inducteur atteint sa valeur maximale (400 U/L) après 15 jours d'incubation. Cependant, l'ajout de  $\text{CaCl}_2$  au milieu de culture n'induit pas la production de laccase.

Mots clés : activité laccasique, déchets de citrouille, *Trametes sp.* , *Chaetomium sp.* , milieu submergé.

# Abstract

---

## 8. Abstract

The objective of this work is to demonstrate of the laccasic activity produced on a medium containing pumpkin waste by two fungal strains belonging to the genus *Trametes sp.* and *Chaetomium sp.* that were provided by the Laboratory of Mycology, Biotechnology and Microbial Activity (LaMyBAM) Brothers Mentouri University Constantine, located in Chaabarsas.

The development test of *Trametes sp.* et *Cheatomium sp.* revealed that these two strains having the ability to grow and produce laccase activity.

Indeed, the fermentation of liquid medium in the absence of the inducer showed that laccasique activity was maximal after 15 days with a value of almost 400 U / L. However, the addition of CaCl<sub>2</sub> as an inducer did not induce the production of laccase. So the production of laccase without the inducer is more important than that with the inducer (CaCl<sub>2</sub>).

Keywords: laccasic activity, pumpkin scrap, *Trametes sp.* , *Chaetomium sp.* , liquid medium.

## 9. تلخيص

الهدف من هذا العمل هو إنتاج laccase في وسط محضر أساسا من بقايا اليقطين من قبل سلالتين فطريتين تنتمي إلى أجناس *Chaetomium sp.*, *Trametes sp.*, والتي تم توفيرها من قبل مخبر علم الفطريات الحيوية والميكروبية (LAMyBAM) جامعة الإخوة منتوري قسنطينة .

أثبتت هذه الدراسة قدرة كل من *Chaetomium sp.*, *Trametes sp.* على و النمو وإنتاج نشاط لاکازي في أوساط متعددة محضرة من بقايا اليقطين والمتمثلة في: الأوراق, السيقان, القشرة والألياف, و من خلالها ظهر أن أحسن وسط صلب للنمو هو الوسط S2 المحضر من السيقان والأوراق, بينما كان الوسطين S1- 2% و S3- 2% من حيث إفراز نشاط إنزيمي للـ laccase.

من جهة أخرى, كان إنتاج laccase في وسط سائل, بعد 15 يوما من الحضان يقدر بأقصى قيمة (400 U/L) وهذا في غياب المحفز  $CaCl_2$ , بينما كان هذا الإنتاج منخفضا في وجود  $CaCl_2$ .

مما يعني أنه لا يحفز إنتاج laccase, فكانت بذلك نسبة الإنتاج في غياب المحفز  $CaCl_2$  أكبر منها في وجوده.

الكلمات المفتاحية: النشاط اللاكازي, بقايا اليقطين, *Chaetomium sp.*, *Trametes sp.*, وسط سائل.

# **Annexe**

# *Annexes*

## **Annexe 1 :**

### **Le milieu PDA : (Zareb 2014)**

- 200 g de pomme de terre ;
- 20 g de glucose ;
- 20 g d'agar ;
- 1000 ml d'eau distillée.

Les pomme de terre sont pelées, lavées et coupées en tranches minces. Elles sont ensuite cuites dans 200 ml d'eau pendant 15 à 20 min. le mélange obtenu est filtré. Le filtrat est versé dans un erlen-meyer d'un litre placé sur un agitateur chauffant. On rajoute au filtrat le glucose et l'agar, puis le volume est complété à 1000 ml. L'Erlenmeyer retiré de la plaque lorsque le milieu est homogène.

Le milieu prêt stérilisé à l'étuve à une température de 120 C°.

## **Annexe 2 :**

### **Préparation de mélange réactionnel :**

- 1,5 g Acide tartrique  $C_4H_6O_6$  (MM= 150) dessous dans 100 ml d'eau distillé ;
- Le PH est ajusté à 4,5 par le NAOH (10N), puis rajouter 0,2 g d'ABTS.

Le mélange est versé dans un flacon et conservé dans la congélation.

**NOM et PRENOM****BOUAOUINE ADJIAL SOUMEYA****GHARFI MANEL**

Date de soutenance : 25/06/2015

**Thème: Production de la laccase par des mycètes filamenteux sur milieu à base de déchets de citrouille (*Cucurbita sp.*)**

**Résumé**

L'objectif de ce travail est la mise en évidence de l'activité laccasique produite sur milieu à base de déchets de citrouille par deux souches fongiques appartenant aux genres : *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.*, qui ont été fournies par le Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frères Mentouri Constantine, situé à Chaabarsas.

Les souches sélectionnées ont été cultivées sur différents milieux à base de déchets de citrouille (S1: mélange de fibres et de peau ; S2 : mélange de tige et de feuilles; S3: mélange de S1 (50%) avec S2 (50%)) et les résultats montrent qu'il y a eu une croissance, ainsi qu'une activité laccasique sécrétée par les deux souches sur les trois milieux.

Par ailleurs, la recherche du milieu adéquat pour la production de laccase a révélé que le milieu S1 - 2% est le plus adéquat pour la souche *Trametes sp.* et le milieu S3 - 2% est celui le plus approprié pour *Chaetomium sp.*.

En effet, La production de laccase en milieu submergé a révélé que l'activité laccasique en absence d'inducteur atteint son sa valeur maximale (400 U/L) après 15 jours d'incubation. Cependant, l'ajout de CaCl<sub>2</sub> au milieu de culture n'induit pas la production de laccase.

**Mots clés :** Activité laccasique, déchets de citrouille, *Trametes sp.* , *Chaetomium sp.* , milieu submergé.

**Laboratoire de recherche :** laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie, et de l'activité Microbienne (LaMyBAM), Département de Microbiologie. Faculté des sciences de la Nature et de la Vie.

Université Frères Mentouri Constantine.

**Jury d'évaluation :**

**Président de jury:** Mme MIHOUBI I.

**Rapporteur :** Mr KACEM CHAOUCHE N

**Examinatrice** Mme LAHLEH F.

**Tutrice :** Mme BENHASSINE S.

**MC. UFM Constantine.**

**Prof. UFM Constantine.**

**MC. UFM Constantine.**

**Doctorante. UFM Constantine.**