



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 الاخوة 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:

Intérêt biotechnologique des souches fongiques sécrétant de la laccase

Présenté et soutenu par : **SEDRATI Soumia**

Le : **26/06/2016**

HARRAG Manal

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme Mihoubi. I (Professeur-UFM Constantine).

Rapporteur : Mr Kacem chaouche. N (Professeur- UFM Constantine).

Examinatrice : Mme Kara ali. M (Maitre de Conférences - UFM Constantine).

Tutrice : Mme Benhassine. S (Doctorante - UFM Constantine).

Année universitaire
2015 - 2016

Remerciements

Avant toute chose

Nous remercions DIEU

Le tout puissant, l'omniscient et le miséricordieux

De nous avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.

*Nous exprimons nos plus vifs remerciements à notre encadreur **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.*

*Nos remerciements s'adressent également à **Madame. Benhassine .S** pour sa disponibilité permanente et pour ses orientations et remarques pointues, tout au long de cette étude.*

*Nous sommes très sensibles à l'honneur que nous fait **madame professeure Mihoubi. I** en acceptant de présider le jury de notre soutenance. Notre remerciements s'adressent aussi à **madame Kara ali. M** pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail en acceptant de l'examiner.*

*Nous remercions toute l'équipe du laboratoire d'analyse du Centre de Recherche en Biotechnologie (**CRBT**)*

Dédicace

*Je remercie tout d'abord mon Dieu de m'avoir donné courage ; patience et conscience
afin de bien rédiger ce modeste travail*

Je dédie ce travail à :

Mes parents pour leur soutien moral et physique et a toute ma famille

*A mon mari pour ces encouragements, sa patience et son réconfort dans les moments
de découragement*

A mes petits enfants Nehla et Mouhamedislem (je vous aime beaucoup)

A toute ma belle famille et mes collègues

Soumia

Dédicace

Je remercie tout d'abord mon Dieu de m'avoir donné courage ; patience et conscience afin de bien rédiger ce modeste travail.

Je dédie ce travail :

A ma très chère mère Hadjira, merci pour les sacrifices de tous les instants que vous m'avez consenti pour mon éducation et mon bien être, merci pour votre prière, votre soutien dans les moments difficiles, pour votre courage et patience...

A mon très cher oncle Abderrahmane, merci pour tout l'enseignement que vous m'avez transmis, pour vos sacrifices, vos prières et pour l'encouragement sans limites que vous ne cessez de m'offrir...

Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à :

Ma chère grande mère : Cherifa.

A Mes chers tantes : Louiza, hafida surtout nadia.

Et a mon cheroncle : charrafe.

A mes très chères amies : Meriem, Hayat, Sara, Azza, Hayet, Halima et mon binôme Soumia.

Manal

Table des matières

Remerciements et dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

1. Introduction	01
2. Revue bibliographique	03
2.1 Les laccases.....	03
2.1.1 Généralité	03
2.1.2 Distribution et caractérisation des laccases.....	03
2.1.2.1 Chez les plantes supérieures	03
2.1.2.2 Chez les mycètes	04
2.1.3 Les mycètes des laccases.....	04
2.1.3.1 <i>Trametes versicolor</i>	05
2.1.3.2 <i>Chaetomium sp</i>	06
2.1.4 Structure de la laccase	06
2.1.5 Le cycle catalytique des laccases.....	08
2.1.6 Le système laccase- médiateur	08
2.1.7 Application biotechnologique des laccases	10
2.1.7.1 Bioremédiation et traitements de déchets	10
2.1.7.2 Industrie cosmétique	10
2.1.7.3 Industrie alimentaire.....	10

2.1.7.4 Décontamination des sols.....	11
2.1.7.5 Industrie du textile	11
2.1.7.6 synthèses chimiques.....	11
2.2 Généralité sur les colorants.....	12
2.2.1 Historique des colorants.....	12
2.2.2 Définition de la matière colorante	12
2.2.3 Classification des colorants	13
2.2.4 Colorants azoïques.....	14
2.2.4.1 Définition	14
2.2.5 Toxicité des colorants du textile.....	15
2.2.5.1 Généralités	15
2.2.5.2 Colorants textiles, Environnement et santé.....	15
2.2.5.3 Les dangers potentiels.....	16
2.2.5.4 Toxicité des colorants azoïques.....	17
3. Matériel et méthodes	19
3.1 Réactivation des souches fongiques sélectionnées.....	19
3.2 Test de production de la laccase.....	19
3.3 Etude de la dégradation des colorants.....	19
3.3.1 Test sur milieu solide.....	19
3.3.2 Test sur un milieu liquide.....	20
3.3.3 Le dosage laccasique.....	20

3.4	Analyse de la dégradation des colorants.....	20
3.4.1	Analyse par spectrophotométrie.....	20
3.4.2	Analyse de la dégradation par HPLC.....	20
4.	Résultats et discussion.....	22
4.1	Réactivation des souches sur gélose MEA	22
4.2	Test de la production de la laccase.....	22
4.3	Etude de la dégradation des colorants.....	23
4.3.1	Test sur milieu solide	23
4.3.2	Test de dégradation sur milieu submergé.....	25
4.3.2.1	le dosage laccasique	25
4.3.3	Analyse de la dégradation des colorants par spectrophotomètre.....	26
4.3.4	Analyse de la dégradation par HPLC.....	27
5.	Conclusion	29
6.	Résumé	30
7.	Références bibliographique.....	31
8.	Annexes	

Liste des abréviations

HAP hydrocarbures aromatiques polycycliques

pH Potential d'hydrogène

ABTS 2,2- azino-bis-(3-ethylbenzoline-6-sulfonate)

MEA Gélose à l'extrait de malt

PPM partie par million

DO densité optique

ϵ coefficient d'extinction moléculaire

UV Ultra-violet

HPLC chromatographie en phase liquide à haute performance

RG Rouge Congo

VM Vert de malachite

t_r temps de rétention

CWBI Centre Wallon de Bioindustrie

Liste des figures

Figure 01 Aspect d'un morceau de bois probablement attaqué par un champignon de pourriture blanche et présentant un aspect blanc fibreux	05
Figure 02 Photo de la <i>Trametes versicolor</i>	05
Figure 03 Aspect microscopique de <i>Chaetomium sp.</i>	06
Figure 04 Représentation de la structure 3D de la laccase de <i>Trametes versicolor</i>	07
Figure 05 Environnement des 4 atomes de cuivre du site actif de la laccase de <i>Trametes versicolor</i>	07
Figure 06 Cycle catalytique des laccases.....	08
Figure 07 Représentation des oxydations enzymatiques catalysées par la laccase A. en absence ou B. en présence de médiateurs chimiques.....	09
Figure 08 Principaux médiateurs utilisés.....	09
Figure 09 Structure du colorant Rouge Congo.....	14
Figure 10 Présentation d'un procédé d'ennoblissement textile.....	16
Figure11 Aspect macroscopique de <i>Chaetomium sp.</i>	22
Figure12 Aspect macroscopique de <i>Trametes sp.</i>	22
Figure 13 Test de la production de la laccase par <i>Trametes sp.</i>	23
Figure14 Test de la production de la laccase par <i>Chaetomium sp.</i>	23
Figure 15 Test de la dégradation sur milieu submergé.....	25
Figure 16 L'activité laccasique de la souche <i>Trametes sp</i> à différentes concentrations de VM et RC	25
Figure 17 L'activité laccasique de <i>Chaetomium sp</i> à différentes concentrations de VM et RC.....	25
Figure 18 Spectre du Rouge Congo, <i>Chaetomium sp.</i> + RC et <i>Trametes sp.</i> + RC....	26

Figure19 Spectre du Vert de Malachite ; <i>Chaetomium sp.</i> + VM et <i>Trametes sp.</i> +VM.....	26
Figure 20 Chromatogramme du Rouge Congo ($\lambda=498$ nm).....	27
Figure 21 Chromatogramme du Rouge Congo + <i>Trametes sp.</i> ($\lambda=498$) nm).....	28
Figure 22 Chromatogramme du Rouge Congo + <i>Chaetomium sp.</i> ($\lambda =498$ nm).....	28
Figure 23 Chromatogramme du Vert de malachite ($\lambda=623$ nm), (VM+ <i>Chaetomium</i> <i>sp.</i> et VM+ <i>Trametes sp.</i>).....	28

Liste des tableaux

Tableau 01 Principaux groupes chromophores et auxochromes, classés par intensité Croissante	13
Tableau02 Classification des colorants.....	14
Tableau 03 Colorants azoïques révélés mutagènes et/ou carcinogènes.....	18
Tableau 4 La dégradation des colorants sur milieu solide.....	24

Introduction

Introduction

1. Introduction

Les colorants sont largement utilisés dans les imprimeries, les produits alimentaires, cosmétiques et cliniques, mais en particulier dans les industries textiles pour leur stabilité chimique et la facilité de leur synthèse et leur variété de couleurs. Cependant, ces colorants sont à l'origine de la pollution une fois évacués dans l'environnement. La production mondiale des colorants est estimée à plus de 800 000 t/an et les colorants azoïques sont majoritaires et représentent 60-70 %. Compte tenu de la composition très hétérogène de ces derniers, leur dégradation conduit souvent à la conception d'une chaîne de traitement physique-chimique par des réactions d'oxydations (Benmansor *et al.*, 2010), mais la plupart des technologies conventionnelles ont des inconvénients majeurs car la plupart des réactions sont non-spécifiques et ils utilisent des produits chimiques dommageables pour l'environnement. Ces inconvénients ont incité la recherche de nouvelles technologies d'oxydation basées sur des systèmes biologiques tels que des réactions enzymatiques. Ces biotechnologies ont l'avantage de ne pas avoir les inconvénients des technologies d'oxydation chimiques: les enzymes sont spécifiques et biodégradable.

La laccase est une enzyme particulièrement intéressante et prometteuse pour l'avenir des biotechnologies. Cette enzyme a reçu beaucoup d'attentions de la part des chercheurs pour sa capacité à oxyder des composés phénoliques et non-phénoliques de lignine, avec l'aide de médiateurs, ainsi que certains polluants persistants dans l'environnement (Thurston, 1994; Xu, 1996 ; Jolival et *al.*, 1999; Rodriguez Couto et *al.*, 2006). Cette enzyme est sécrétée essentiellement par les basidiomycètes ligninolytiques (Gianfreda *et al.*, 2004). L'importance biotechnologique de cette enzyme peut être également attribuée à sa capacité à maintenir une activité substantielle dans des solvants organiques, ouvrant ainsi la porte à des applications en synthèse organique (Burton, 2003). Elle a des utilisations très variées telles que la décoloration et la détoxification des effluents, le blanchiment de la pâte à papier, la réduction des composés phénoliques dans le vin et la décoloration du denim dans l'industrie du textile, certaines de ces applications ayant déjà été brevetées (Yaver *et al.*, 2001 ; Mayer et Staples, 2002; Rodriguez Couto *et al.*, 2006).

De ce fait l'objectif de ce travail s'articule sur la recherche d'intérêt biotechnologique des souches fongiques sécrétant de la laccase dans le domaine de l'industrie du textile et

Introduction

la dégradation des colorants synthétiques. Pour ce faire, plusieurs étapes ont été réalisées, à savoir :

- Test de la production de laccase sur gélose MEA ;
- Etude de la dégradation des colorants sur milieu solide et milieu submergé ;
- Analyses de la dégradation des colorants par spectrophotomètre et par HPLC.

Revue
Bibliographique

2. Revue bibliographique

2.1 Les laccases

2.1.1 Généralité

La laccase (EC 1.10.3.2, p-diphénol oxydase) fait partie des rares enzymes à avoir été étudiée au 19^e siècle. Yoshida a été le premier à exposer cette enzyme en 1883 après l'avoir extrait de la souche *Rhus vernicifera*, un arbre originaire du Japon (Levine, 1965; Thurston, 1994; Dubé, 2008). En 1896, la laccase fut décrite pour la première fois comme étant une enzyme d'origine fongique (Levine, 1965; Thurston, 1994; Dubé, 2008).

La laccase fait partie des enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine, Les enzymes lignolytiques ont principalement été décrites comme étant extracellulaires, cependant, dans la littérature, il a été mentionné qu'il y a des laccases intracellulaires qui sont principalement secrétées par des mycètes de type pourritures blanches (Schlosser *et al.*, 1997).

2.1.2 Distribution et caractérisation des laccases

Les laccases ont aussi été mises en évidence chez quelques bactéries comme *Azospirillum* et leurs souches mutantes (Givaudan *et al.*, 1993; Uma *et al.*, 1994; Alexander *et al.*, 1996; Malliga *et al.*, 1996). L'activité laccasique a aussi été trouvée dans le sol (Ruggiero et Radogna, 1984; Leonowicz et Bollag, 1987) et chez quelques insectes comme *Drosophila melanogaster*, *Luciliacuprina*, *Sarcophago bullata* (Barrett, 1987; Binnington et Barrett, 1988; Miessner *et al.*, 1991).

2.1.2.1 Chez les plantes supérieures

La présence de laccase 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. D'ailleurs, Huttermann *et al.* (2001) ont rapporté la présence de laccases dans toute la famille des Anacardiaceae. Par culture cellulaire, il a été montré la production et la sécrétion de laccase chez *Acer pseudoplatanus* (Sato *et al.*, 2001).

Revue bibliographique

Les informations restent limitées en ce qui concerne la présence et la caractérisation de laccases chez les autres espèces. Généralement, la détection des activités laccasique chez les plantes est difficile pour plusieurs raisons (Mayer et Staples, 2002).

2.1.2.2 Chez les mycètes

L'activité laccasique a été trouvée dans plus de 60 espèces fongiques (comme *Trametes*, *Agaricus*, *Polyporus*, *Botrytis*, *Neurospora* et *Aspergillus*) (Gianfreda *et al.*, 1999) et l'enzyme a été purifiée dans des dizaines d'espèces fongiques. Les laccases fongiques sont des enzymes extracellulaires la plupart du temps. Ce sont les basidiomycètes qui sont les plus importants producteurs de laccases intra et /ou extracellulaire. Cette classe de champignon participe activement à la biodégradation de la lignine (Gianfreda *et al.*, 1999). De nombreux mycorhiziens excrètent dans le milieu environnant des laccases (Mayer, 1987).

2.1.3 Les laccases des mycètes

Les laccases ont été isolées à partir de champignons de type Ascomycètes, Deutéromycètes et Basidiomycètes (Assavanig *et al.*, 1992). Les études démontrent qu'une souche de champignon peut exprimer plusieurs isoenzymes de laccase dépendamment des conditions de culture (Bouag et Leonowicz, 1984; Wahleitner *et al.*, 1996; Palmieri *et al.*, 1997; Famet *et al.*, 2000). Les mycètes de type Basidiomycètes, spécifiquement les pourritures blanches, ont été ciblés comme principaux responsables de la dégradation de la lignine dans la nature. Parmi ces champignons : *Phanerochaete*, *Chrysosporium* (Martinez *et al.*, 2004), *Trametes versicolor* ou encore *Pleurotus ostreatus*.



Figure 01 Aspect d'un morceau de bois probablement attaqué par un champignon de pourriture blanche et présentant un aspect blanc fibreux (Blanchette, 2000).

2.1.3.1 *Trametes versicolor*

Les *Trametes versicolor* comptent parmi les champignons macroscopiques les plus courants et les plus répandus dans les forêts tempérées et boréales qui nous environnent (Justo, 2014), *Trametes versicolores* appartenant au phylum Basidiomycota, classe des basidiomycetes, sous classe Agaricomycetidae, ordre Polyporales et de famille Polyporaceae, genre *Trametes* et le nom scientifique *Trametes versicolor*, 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).

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



Figure 02 Aspect macroscopique de *Trametes versicolor* (Justo, 2014).

Revue bibliographique

2.1.3.2 *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-Tarabilyet 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).

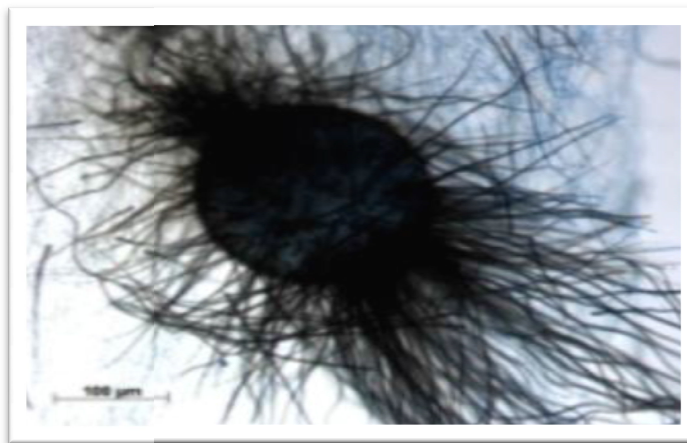


Figure 03 Aspect microscopique de *Chaetomium sp.* (Dromer *et al.*, 2013)

2.1.4 Structure de la laccase

Les laccases sont des protéines globulaires cuivrées monomériques ou multimériques (Figure 04). Elle possède une structure tetramérique composée de sous-unités identiques. Une laccase typique possède une masse moléculaire variant entre 60 et 80 kDa et est glycosylée à 15-20% (Thurston, 1994; Luisa *et al.*, 1996). Par contre, il y a des exceptions comme les laccases de *Monocillium indicum* (100kDa), *Agaricus bisporus* (100 kDa), et *Aspergillus nidulans* (110 kDa) (Thakker *et al.*, 1992; Perry *et al.*, 1993; Thurston, 1994).

Revue bibliographique

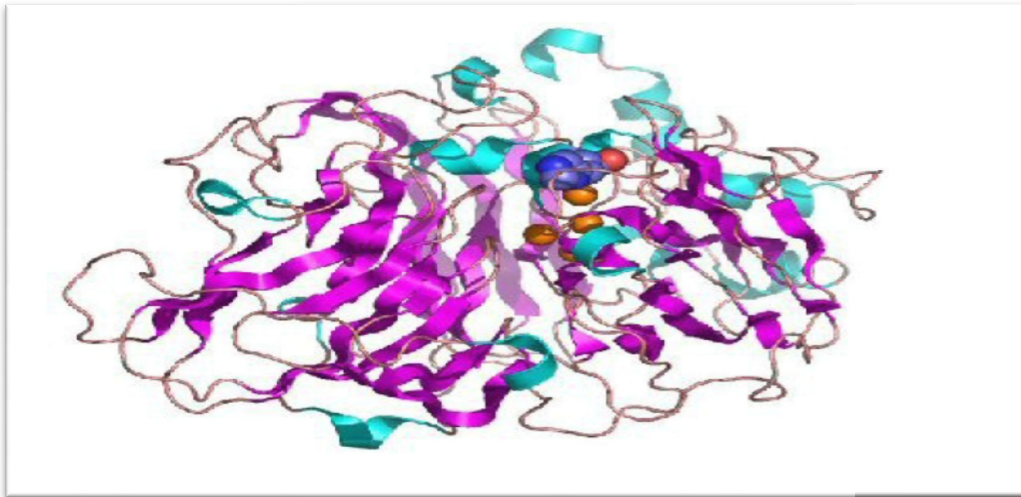


Figure04 Représentation de la structure 3D de la laccase de *Trametes versicolor* (Issa, 2009).

Les laccases appartiennent au groupe des phenoloxydases contenant des atomes de cuivre dans le centre catalytique et sont souvent appelées oxydases à multiples atomes de cuivre (Baldrian, 2006). Le site actif de l'enzyme comporte quatre ions cuivriques qui dépendent de leurs ligands sur l'enzyme et de leur fonction, ils sont classés en trois types T1 qui est responsable de la couleur bleu de l'enzyme ; T2 et T3 (Claus, 2004).

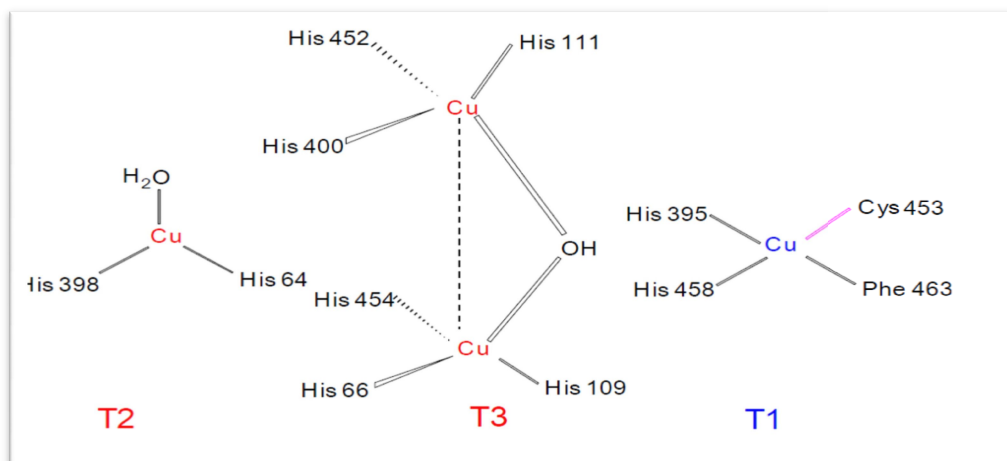


Figure 05 Environnement des 4 atomes de cuivre du site actif de la laccase de *Trametes versicolor* (piontek *et al.*, 2002)

Revue bibliographique

2.1.5 Le cycle catalytique des laccases

D'après Thurston, (1994); Messerschmidt, (1997); et Mougin *et al.*(2003); le mécanisme catalytique des laccases fongiques est de type « donneur-accepteur », comprenant trois étapes(figure 06) qui sont : l'oxydation du substrat par la laccase ; le transfert interne d'électrons du Cu^+ de T1 au « cluster-trinucléaire » qui contient Cu^{2+} de T2 et T3 et enfin, après complète réduction du centre trinuéaire, les cuivres de type (2 et 3) réduisent l'oxygène d'oxydation du Cu^+ en Cu^{2+} de T2 et T3.

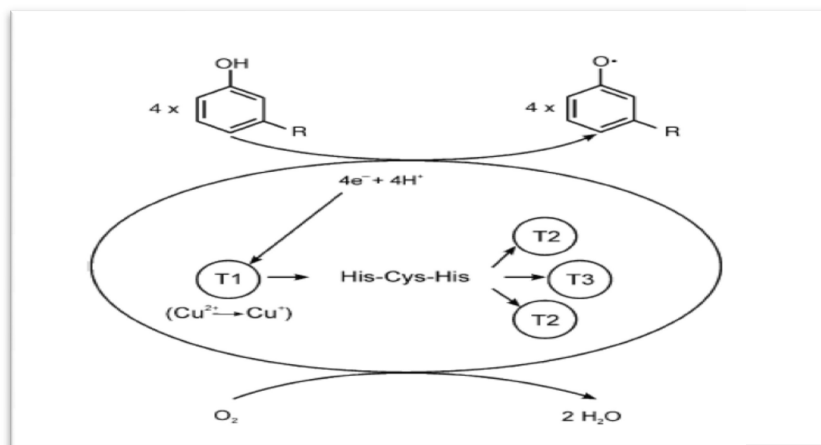


Figure 06 Cycle catalytique des laccases (Messerschmidt, 1997).

2.1.6 Le système laccase- médiateur

L'oxydation laccasique de certains substrats non phénoliques ou phénoliques ne peut pas toujours être réalisée directement, soit parce qu'ils ne peuvent pas pénétrer jusqu'au site actif de l'enzyme, soit parce qu'ils possèdent un potentiel redox trop élevé. Ils peuvent cependant être oxydés indirectement en présence de produits appelés « médiateurs chimiques » qui agissent comme des substrats intermédiaires pour les laccases (Riva, 2006). La laccase oxyde le médiateur en radical. Qui à son tour, réagit avec le substrat (figure 07). Le médiateur a en fait un rôle de transporteur d'électrons entre le substrat et l'enzyme (Burton, 2003).

Revue bibliographique

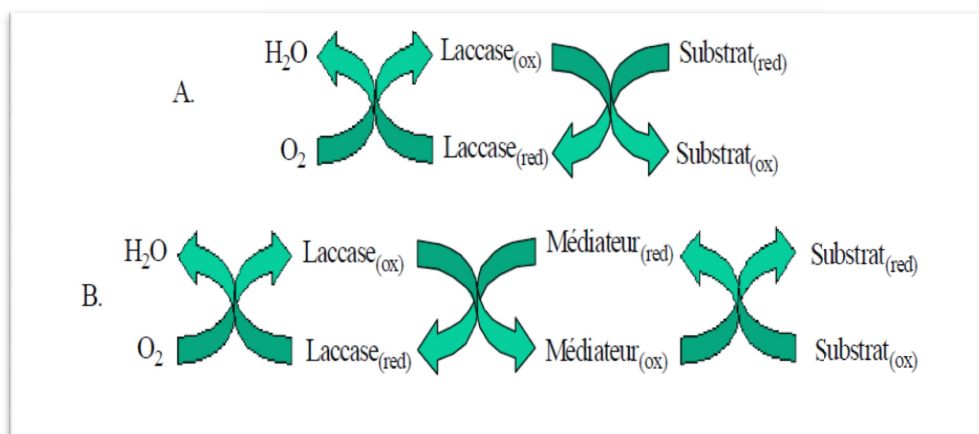


Figure 07 Représentation des oxydations enzymatiques catalysées par la laccase A. en absence ou B. en présence de médiateurs chimiques (Gusetu, 2010).

L'activité du système médiateur/laccase envers les substrats dépend du potentiel d'oxydation de l'enzyme, de la stabilité et de la réactivité du radical formé au cours de l'oxydation du médiateur (Issa, 2009).

Les médiateurs les plus souvent utilisés sont l'ABTS (acide 2,2-azino-bis (3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)), l'acide violurique et le HOBt (1 hydroxybenzotriazole) (figure 08) (Barbat, 2009).

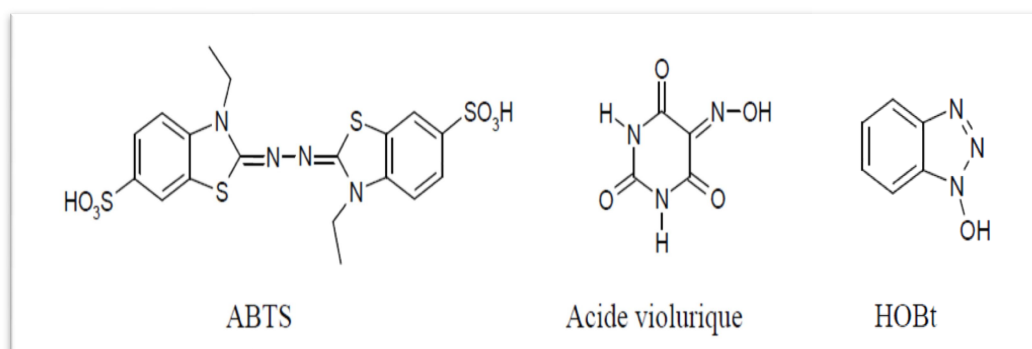


Figure 08 Principaux médiateurs utilisés (Barbat, 2009).

Revue bibliographique

2.1.7 Application biotechnologique des laccases

Les laccases sont particulièrement intéressantes d'un point de vue industriel grâce à leur habileté à oxyder une vaste gamme de substrats phénoliques. Diverses recherches sont effectuées dans différents secteurs d'intérêts industriels ou environnementaux: le textile, la bioremédiation et les traitements de déchets, l'alimentation, la cosmétique, la décontamination des sols et de l'eau, 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).

2.1.7.1 Bioremédiation et traitements de déchets

Les laccases de *Corioloopsis gallica* dégradent plusieurs polyphénols responsables de la couleur brune des eaux résiduelles des brasseries (Yague *et al.*, 2000), alors que celles de *Trametes versicolor*, de *Pyricularia oryzae* et de *Rhizoctonia praticola* sont efficaces dans la polymérisation de plusieurs polluants halogénés et alkylés dérivés de l'aniline présents dans les eaux résiduelles de certaines industries textiles. De plus, les laccases obtenues à partir de nombreuses autres espèces de moisissures présentent une activité notable (via des réactions d'oxydation et/ou de polymérisation) vis-à-vis de plusieurs colorants azoïques employés par ces industries (Duran *et al.*, 2002; Dec *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2003).

2.1.7.2 Industrie cosmétique

Le monde des cosmétiques utilise également la laccase dans certains de ses produits. Par exemple, la laccase est utilisée comme agent oxydant dans certains produits de formulation de colorants pour cheveux. La laccase remplace ainsi le peroxyde d'hydrogène dans ce type de produit et rend ainsi ce dernier moins irritant (Roure *et al.*, 1992; Aaslyng *et al.*, 1996; Lang et Cotteret, 1999). Plus 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).

2.1.7.3 Industrie alimentaire

Les laccases peuvent aussi être utilisées dans certains procédés alimentaires pour améliorer ou modifier l'apparence de la couleur de la nourriture et/ou des boissons ainsi que pour traiter les composés phénoliques des effluents industriels. Par exemple, la

Revue bibliographique

laccase est utilisée dans l'élimination de composés phénoliques indésirables, responsable du brunissement, de la turbidité dans certains jus de fruits, bières et vins (Mathiasen, 1996; Mayer et Staples, 2002; Georis *et al.*, 2003). 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 diminuer son extensibilité.

2.1.7.4 Décontamination des sols

Les propriétés catalytiques des laccases peuvent être utilisées pour dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), ainsi que d'autres composés xénobiotiques. (Pointing, 2001), elles sont aussi capables de détoxifier des résidus de munitions composés de 2, 4,6-trinitrotoluène (Duran et Esposito, 2000).

2.1.7.5 Industrie du textile

Le développement de procédés enzymatiques, à base de laccase, est une solution attrayante étant donné les capacités de cette enzyme à dégrader diverses structures chimiques similaires aux encres employées dans cette industrie qui sont très résistantes à la dégradation et la plupart sont difficiles à décolorer (Abadulla *et al.*, 2000; Blanquez *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2004; Rodriguez Couto *et al.*, 2004a; Rodriguez Couto *et al.*, 2005b).

2.1.7.6 synthèses chimiques

Beaucoup de travaux ont montré que les laccases sont intéressantes pour la synthèse chimique : elles sont utilisées comme auxiliaires pour la polymérisation de complexes et d'agents médicaux (Xu, 1999; Kurisawa *et al.*, 2003; Nicotra *et al.*, 2004).

Ainsi, Aaslyng *et al.* (1999), ont breveté leur procédé de synthèse des mélanines pour teindre les cheveux. Ils ont mis au point un mélange basé essentiellement sur l'association de deux composés : le premier est une laccase et le deuxième est un précurseur phénolique.

Revue bibliographique

2.2 Généralité sur les colorants

2.2.1 Historique des colorants

Les êtres humains ont depuis toujours utilisés les colorants qui ont été appliqués dans pratiquement toutes les sphères de la vie quotidienne telles que la peinture et la teinture du papier, de la peau et des vêtements, etc. Jusqu'à la moitié du 19^{ème} siècle, les colorants appliqués étaient d'origine naturelle. Des pigments inorganiques tels que l'oxyde de manganèse, l'hématite et l'ancre étaient utilisés. Par ailleurs, des colorants naturels organiques ont été appliqués, surtout dans l'industrie du textile. Ces colorants sont tous des composés aromatiques qui proviennent essentiellement des plantes, tel que l'alizarine et l'indigo (Hammami *et al.*, 2008).

L'industrie des colorants synthétiques est née en 1856 quand le chimiste anglais W.H.Perkin, dans une tentative de synthèse de la quinine artificielle pour soigner la malaria, a obtenu le premier colorant synthétique qu'il appela «mauve» (aniline, colorant basique. Perkin a breveté son invention et a installé une chaîne de production, qui sera bientôt suivie par d'autres. De nouveaux colorants synthétiques commencent à paraître sur le marché. Ce processus a été stimulé par la découverte de la structure moléculaire du benzène en 1865 par *Kekulé*. Finalement, les colorants synthétiques ont presque complètement supplantés les colorants naturels dès le début du 20^{ème} siècle (Welham, 2000).

On dénombre environ 8000 colorants synthétiques chimiquement différents, répertoriés dans le colour index (Colour Index, 1975) sous 40000 dénominations commerciales. Chaque colorant y est classé sous un nom de code indiquant sa classe, sa nuance ainsi qu'un numéro d'ordre (par exemple : CI Acide Orange 7).

2.2.2 Définition de la matière colorante

Les matières colorantes sont un assemblage de groupements chromophores, auxochromes et des structures aromatiques conjuguées (cycles benzéniques, anthracène, perylene, etc.). Ces groupements sont capables de transformer la lumière blanche dans le spectre visible (de 380 à 750 nm), en lumière colorée. Le tableau 1 présente les groupements chromophores et auxochromes classés par intensité décroissante. (Perrin, Pierre, 1999).

Revue bibliographique

Tableau 01 Principaux groupes chromophores et auxochromes, classés par intensité Croissante (Perrin, pierre, 1999; Van der Zee, 2002; Zille, 2005; Bizani *et al.*2006)

<i>Groupes chromophores</i>	<i>Groupes auxochromes</i>
Azo (-N=N-)	amine primaire (Amino -NH ₂)
Nitroso (-N=O ou -N-OH)	amine secondaire (Methylamino -NHCH ₃)
Carbonyle (>C=O)	amine tertiaire (Dimethylamino -N (CH ₃) ₂)
Vinyl (-C=C-)	Hydroxyl (-HO)
Nitro (-NO ₂ OU =NO-OH)	Alkoxy (-OR)
Methine (-CH=, -CR=)	Groupes donneurs d'electrons
Azomethine (-CH=NH)	NH ₃ , -COOH, -SO ₃ H.
Azomethine N substitue (-CH=N-)	Iodi (I-)
	Bromo (Br-)
	Chloro (Cl-)

2.2.3 Classification des colorants

Les colorants peuvent être rangés dans différentes catégories selon des classifications chimique ou tinctoriale. La classification chimique est basée sur la structure chimique du colorant, plus précisément, elle tient compte de la nature de son groupement chromophore (Swamy, 1998), alors que la classification tinctoriale est basée sur le mode d'utilisation et d'application de colorant qui dépend à son tour du groupe auxochrome. Le tableau2 regroupe les colorants selon les deux types de classification.

Revue bibliographique

Tableau02 Classification des colorants (Guettari *et al.*, 2014)

Classification chimique	classification tinctoriale
Les colorants anthraquinoniques	Les colorants acides ou anioniques.
Les colorants indigoïdes	Les colorants basiques ou cationiques
Les colorants xanthene	Les colorants de cuve
Les phtalocyanines	Les colorants directs
Les colorants nitrés et nitrosés	Les colorants à mordants
	Les colorants réactifs
	Les colorants ou azoïques insolubles
	Les colorants dispersés

2.2.4 Colorants azoïques

2.2.4.1 Définition

Les colorants azoïques constituent la famille la plus utilisée dans l'industrie du textile (60-70%). Les colorants azoïques sont des composés caractérisés par le groupe fonctionnel azo (-N=N-), unissant deux groupements alkyle ou aryles identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique). Suivant le nombre de groupement **azo** trouvé dans la structure du colorant, on distingue les monoazoïques, les bisazoïques et les polyazoïques. Ces colorants, sont en général produits suivant deux voies :

- Par réaction de diazotation ;
- Par réaction de condensation.

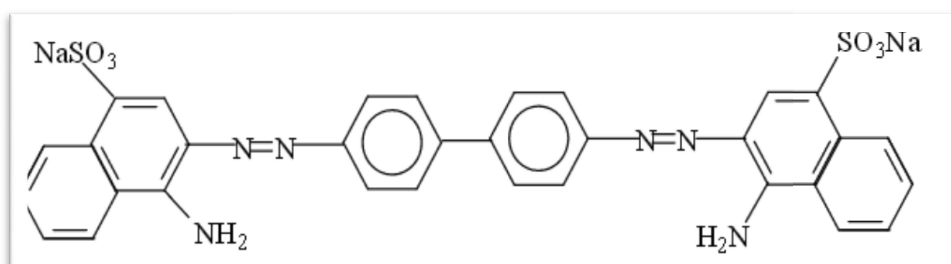


Figure 09 Structure du colorant Rouge Congo
(Baghriche *et al.*, 2005)

Revue bibliographique

2.2.5 Toxicité des colorants du textile

2.2.5.1 Généralités

La toxicité des colorants vient de l'ignorance des chercheurs ou des utilisateurs de leurs structures chimiques qui diffèrent d'un type à un autre. Ainsi que du mode de l'emploi lors de l'utilisation (Oubagha, 2011). Beaucoup d'étude sont montrés les effets toxiques et/ou carcinogéniques des colorants azoïques, ce qui signifie que les effluents contenant ces colorants doivent être traités avant d'être rejetés en milieu naturel (Zollinger, 1987). Leur toxicité est en fait due à la teneur en groupements cancérigènes tels que les groupements aromatiques, phtalogènes, cyanurés, sel de barium et de plomb. Ces groupements cancérigènes (sous forme électrophile ou radicalaire) attaquent les bases pyrimidiques de l'ADN et de l'ARN et causent par conséquent, une altération du code génétique avec mutation et risque de cancer. Miller, (1998) s'est intéressé particulièrement à la toxicité des colorants azoïques, lesquels sont caractérisés par la présence de groupe azo ($-N=N-$). La rupture des liaisons azoïques de ces dernières entraîne la formation d'amines primaires qui causent la méthémoglobinémie, caractérisée par un empêchement du transport d'oxygène dans le sang. L'allergie respiratoire aux colorants réactifs a été rapportée pour la première fois en 1978 par Alanko ; chez des sujets employés à la pesée et au mélange de ces colorants en poudre depuis deux ans et présentant un asthme et / ou rhinite d'origine professionnelle.

2.2.5.2 Colorants textiles, Environnement et santé

Un colorant doit posséder, outre sa couleur propre, la propriété de teindre. Cette propriété résultant d'une affinité particulière entre le colorant et la fibre est à l'origine des principales difficultés rencontrées lors des traitements. En effet, selon le type d'application et d'utilisation, les colorants synthétiques doivent répondre à un certain nombre de critères afin de prolonger la durée de vie des produits textiles sur lesquels ils sont appliqués : résistance à l'abrasion, stabilité photolytique des couleurs, résistance à l'oxydation chimique (notamment les détergents) et aux attaques microbiennes. L'affinité du colorant pour la fibre est particulièrement développée pour les colorants qui possèdent un caractère acide ou basique accentué. Ces caractéristiques propres aux colorants organiques accroissent leur persistance dans l'environnement et les rendent peu disposés à la biodégradation (PGGA et Brown, 1986).

Revue bibliographique

Le principal problème environnemental qui se pose dans l'industrie textile est celui des quantités d'eau rejetées et de leur charge chimique.

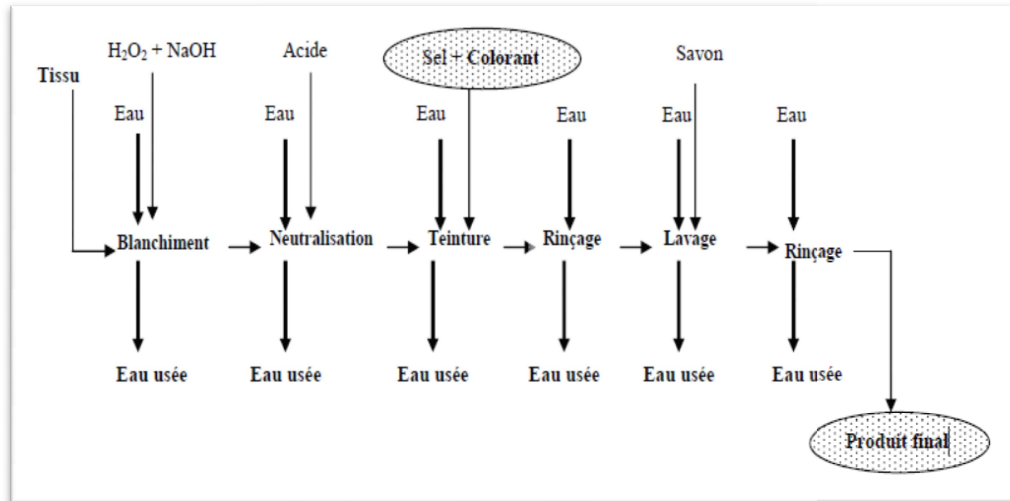


Figure 10 Présentation d'un procédé d'ennoblissement textile (Hao *et al.* 2000)

2.2.5.3 Les dangers potentiels

Eutrophisation : Sous l'action des microorganismes, les colorants libèrent des nitrates et des phosphates dans le milieu naturel. Ces ions minéraux introduits en quantité trop importante peuvent devenir toxiques pour la vie piscicole et altérer la production d'eau potable. Leur consommation par les plantes aquatiques accélère leur prolifération anarchique et conduit à l'appauvrissement en oxygène par inhibition de la photosynthèse dans les strates les plus profondes des cours d'eau et des eaux stagnantes (Kaushik *et al.*, 2010)

Sous-oxygénation : lorsque des charges importantes de matière organique sont apportées au milieu via des rejets ponctuels, les processus naturels de régulation ne peuvent plus compenser la consommation bactérienne d'oxygène. (Manahan, 1994) estime que la dégradation de 7 à 8 mg de matière organique par des microorganismes suffit pour consommer l'oxygène contenu dans un litre d'eau.

Couleur, turbidité, odeur : l'accumulation des matières organiques dans les cours d'eau induit l'apparition de mauvais goûts, prolifération bactérienne, odeurs pestilentielles et colorations anormales. (Willmott *et al.*, 1998) ont évalué qu'une coloration pouvait être

Revue bibliographique

perçue par l'œil humain à partir de $5 \cdot 10^{-6}$ g/L. En dehors de l'aspect inesthétique, les agents colorants ont la capacité d'interférer avec la transmission de la lumière dans l'eau, bloquant ainsi la photosynthèse des plantes aquatiques.

2.2.5.2 dangers à long terme

La persistance : les colorants organiques synthétiques sont des composés impossibles à épurer par dégradations biologique naturelle (PAGGA et Brown, 1986). Cette persistance est due principalement à leur réactivité chimique :

- les aromatiques sont plus persistants que les alcanes
- Les composés saturés sont plus persistants que les insaturés
- La persistance des aromatiques augmente avec le nombre de substituants
- Les substituants halogènes augmentent plus la persistance des colorants que les groupements alkyles.

La bioaccumulation : Certaines substances non ou peu dégradables comme les colorants sont persistantes dans les organismes (bio-persistance) vivants car elles ne sont pas métabolisées. Leur possibilité d'accumulation est d'autant plus importante que les organismes n'ont pas d'autres alternatives que de les éliminer (processus long) ou de les stocker. (Benmansour *et al.*, 2010).

Cancer : si la plupart des colorants ne sont pas toxiques directement, une portion significative de leurs métabolites l'est (Brown et DeVito, 1993) effets mutagènes, tératogènes ou cancérigènes apparaissent après dégradation de la molécule initiale en sous-produits d'oxydation: amine. Le comité scientifique de la toxicité, de l'écotoxicité et de l'environnement (CSTEE), a confirmé que les risques cancérigènes présentés par les articles en tissu et en cuir teints au moyen de certains colorants azoïques sont préoccupants ; par conséquent, pour protéger la santé humaine, l'emploi des colorants azoïques dangereux (en concentrations détectables, c'est-à-dire supérieures à 30 ppm).

2.2.5.4 Toxicité des colorants azoïques

La toxicité des azoïques par exposition aux colorants et à leurs métabolites n'est pas un fait nouveau. Dès 1895, l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile, est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques (Rehn, 1895). La toxicité des azoïques est accrue par la présence de substituants sur le noyau aromatique notamment des groupes nitro (-NO₂) et halogènes

Revue bibliographique

(particulièrement Cl). Selon l'EPA ,2000 l'estimation des risques de cancer impose de fixer une concentration limite de 3,1µg/L en colorant azoïque dans l'eau potable.

Tableau 03 Colorants azoïques révélés mutagènes et/ou carcinogènes

Colorants azoïques	Effet mutagène et/ou carcinogène	Référence
Soudan I : mono azoïque	Mutagène et carcinogène	Chen (2006)
Soudan II	Carcinogène	
Soudan III diazoïque	Carcinogénicité non évaluée	
Soudan IV	Mutagène	
Rouge de Para	Mutagène et carcinogène	
Colorant azoïques à base de benzidine : vert direct1 ; Noire directe 38 ; Rouge direct 17 ;Rouge directe 28 ; bleue directe 2	Carcinogènes	(Golka <i>et al.</i> , 2004)
Rouge de méthyle et Jaune de méthyle	Très mutagènes	(Chung <i>et al.</i> , 1981)
Acide violet 7	Mutagène et carcinogène	(Ben mansour <i>et al.</i> , 2009b,c) ; (Ben mansour <i>et al.</i> , 2010)

*Matériel Et
Méthodes*

3. Matériel et méthodes

L'objectif de ce travail est la mise en évidence d'un intérêt biotechnologique de la laccase sécrétée par des mycètes, en l'occurrence la dégradation des colorants synthétiques, à savoir, ceux utilisés dans l'industrie du textile. Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie RDC, Université Frères Mentouri, Constantine.

3.1 Réactivation des souches fongiques sélectionnées

Deux souches ont été utilisées dans ce travail appartenant au genre : *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.*, elles ont été fournies par le Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM). Ces souches ont été réactivées par repiquage d'une bouture d'hyphe terminal sur le milieu de culture gélosé MEA(Annexe01), dont le pH du milieu est ajusté à 6 et l'incubation a été effectuée à 28°C durant une semaine (Bouaouine *et al.*, 2015).

3.2 Test de production de la laccase

Afin de mettre en évidence la présence d'une activité laccasique, *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* ont été ensemencées par la technique de disques sur des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture MEA additionnée du gaïacol (0.01%), permettant la révélation de la laccase. L'incubation a été effectuée à 28°C pendant 07 jours. L'apparition d'un halo rouge bordeaux est considéré comme une réaction positive résultant de l'oxydation du gaïacol (Buddolla *et al.*, 2006).

3.3 Etude de la dégradation des colorants

3.3.1 Test sur milieu solide

La capacité de dégradation par les souches sélectionnées en sécrétant la laccase a été testée sur cinq différents colorants, à savoir : Le Rouge Congo ; le Vert de Malachite ; le Bleu Bromothymol ; le Tétracoton rouge6B, BASF.FBB-coll et le Lb4GF coll 28883641. Pour chaque colorant, différentes concentrations ont été testées (05ppm, 10ppm, 15ppm, 20ppm et 25ppm). Pour ce faire les deux souches ont été ensemencées par la méthode de disques sur gélose MEA additionnée des différents colorants. L'incubation a été effectuée à 28°C et la lecture peut aller jusqu'à 30 jour, afin d'observer un éventuel changement de la couleur du milieu.

Matériel et méthodes

3.3.2 Test sur milieu liquide

La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyer de 1000 ml contenant 250ml du milieu ME additionné des deux colorants : le Rouge Congo et le Vert de Malachite, avec des concentrations variantes, allant de 5ppm à 20ppm, avec un intervalle de 5ppm. L'inoculation est faite avec des disques de 01 cm de diamètre, l'incubation est effectuée à 28°C jusqu'à l'obtention d'une bonne activité laccasique.

A la fin de la fermentation, une filtration sur papier Wattman 1 a été effectuée pour chaque erlenmeyer et ce, afin de récupérer l'extrait brut supposé contenir la laccase, ensuite, des échantillons ont été prélevés à l'aide d'une micropipette et versés dans des tubes de conservation afin d'être conservés à 04°C pour des utilisations ultérieures (Gharfi *et al.*, 2015).

3.3.3 Le dosage laccasique

Afin de déterminer l'activité laccasique, le dosage spectrophotométrique dans le visible a été mis 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 02). La variation de la DO au spectrophotomètre à 420 nm est suivie pendant 01minute, avec un coefficient d'extinction moléculaire :

$$\varepsilon = 34450 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ et exprimée par } \mu\text{mol} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}, \text{ (CWBI, 2012).}$$

3.4 Analyse de la dégradation des colorants

3.4.1 Analyse par spectrophotométrie

Afin d'étudier une éventuelle dégradation des colorants testés par la laccase sécrétée par les deux souches sélectionnée, une analyse par spectrophotomètre a été réalisée pour chaque échantillon prélevé issu de la fermentation et ce, avec un spectre à balayage (UV/Visible) (Shimadzu) allant de 350nm jusqu'à 800nm, (Baghriche, 2005).

3.4.2 Analyse de la dégradation par HPLC

3.4.2.1 L'analyse du Rouge Congo

L'analyse est réalisée par HPLC (JASCO) dont:

Matériel et méthodes

- la phase mobile est constituée d'un mélange eau-acétonitrile 50:50 v/v, elle est distribuée avec un débit de 20 μ l/min ;
- la colonne est en phase inversée (C18.5 μ m 250 mmx4.6mm) (Benaissa ,2011)
- la détection est effectuée à 498 nm.

3.4.2.2 Analyse du Vert de Malachite

L'analyse quantitative de la dégradation du Vert de Malachite est faite par HPLC(JASCO) dont :

- la colonne est en phase inversée (C18.5 μ m 300 mmx4.6 mm) ;
- La phase mobile est constituée d'un mélange eau- acétonitrile additionné de 0.1%acide formique (40v/60v), elle est distribuée avec un débit de 10 μ l/min ;
- la détection est effectuée à 623 nm (Naoto, 2014).

*Résultats Et
discussion*

4. Résultats et discussion

Ce travail est basé sur la dégradation des colorants synthétiques et du textile par le phénomène d'oxydation enzymatique de la laccase qui est sécrétée par *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.*.

4.1 Réactivation des souches sur gélose MEA

Après 07 jours d'incubation à 28°C, les deux souches sélectionnées comme étant productrices de laccase, en l'occurrence *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* ont montré une bonne croissance sur milieu MEA.



Figure 11 Aspect macroscopique de *Chaetomium sp.*

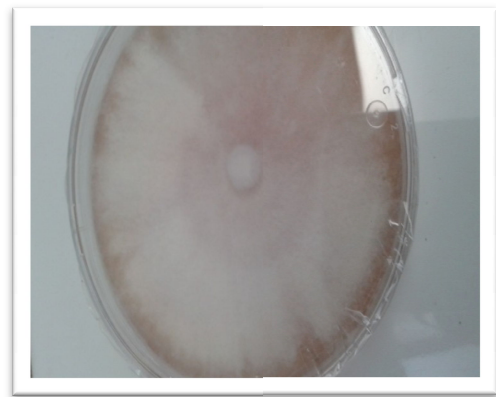


Figure 12 Aspect macroscopique de *Trametes sp.*

4.2 Test de la production de la laccase

Ce test a pour but de révéler la présence de la laccase sécrétée par les souches fongiques sur milieu solide.

Après incubation à 28°C pendant 07 jours ; l'apparition d'un halo rouge bordeaux est observée sur les deux boîtes contenant les deux souches sélectionnées, ce qui est considéré comme une réaction positive résultante de l'oxydation du gaïacol. Ce résultat corrobore à celui de Buddolla *et al.* (2006) qui ont utilisé le gaïacol comme substrat oxydé et polymérisé par la laccase sécrétée par *Stereum ostreae* et *Phanerochaete chrysosporium*.

Résultats et discussion



Figure 13 Test de la production de la laccase par *Trametes sp.*

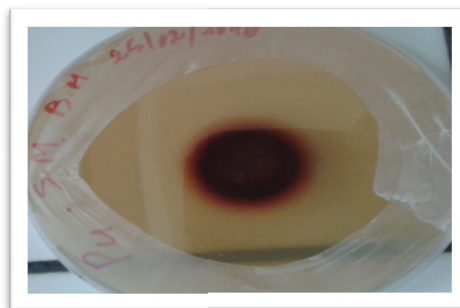


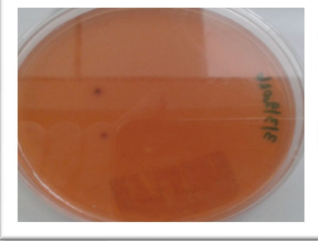

Figure 14 Test de la production de la laccase par *Chaetomium sp.*

4.3 Etude de la dégradation des colorants

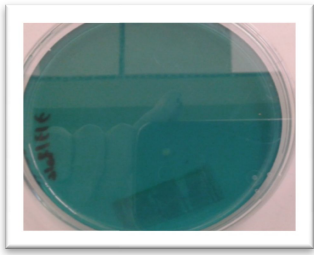
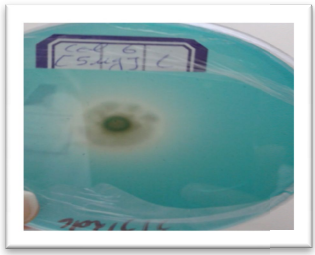
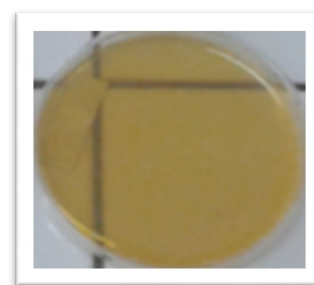

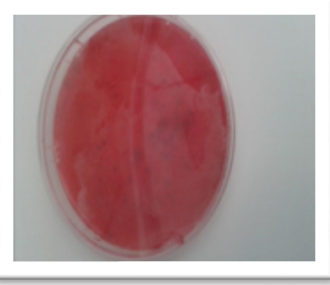
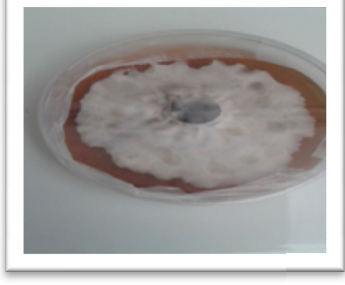
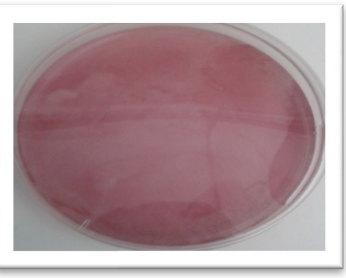
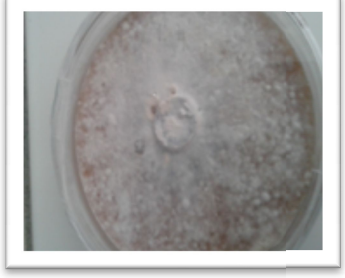
4.3.1 Test sur milieu solide

Après 15 jours d'incubation à 28°C, une zone claire est apparue autour des souches fongiques testées sur les boîtes contenant MEA ; additionné des colorants Rouge Congo et Vert de Malachite. Cette zone peut être expliquée par la dégradation de ces colorants par la laccase qui est sécrétée par *Chaetomium sp.* et *Trametes sp.*; cette dégradation atteint son maximum au 30^{ème} jour d'incubation. Ces résultats corroborent à ceux de Santhishkumar *et al.* (2010) qui ont testé la dégradation du réactif Bleu 198 par *Pleurotus florida* sécrétrice la laccase. Cependant, pour les autres colorants : TetraCoton rouge 6B, Bleu de Bromotymol et BASF.FBB-coll ; *Chaetomium sp.* et *Trametes sp.* ont montré un développement sur toute la surface de la boîte, ce qui peut expliquer la difficulté à observer une éventuelle zone de dégradation.

Tableau 4 La dégradation des colorants sur milieu solide

colorant	Témoin	Echantillon
Rouge Congo		

Résultats et discussion

Vert de Malachite		
Bleu de Bromothymol		
Tétracoton rouge 6B		
BASF.FBB-coll		

Résultats et discussion

4.3.2 Test de dégradation sur milieu submergé

La fermentation a été réalisée en additionnant les deux colorants qui ont donné un résultat visible à l'œil nu sur milieu solide, à savoir le RC et le VM. Après incubation à 28°C pendant 07 semaines, un changement de la couleur des milieux a été observé. Ce changement résulte de la dégradation des colorants par la laccase sécrétée par les deux souches sélectionnées (figure 15).

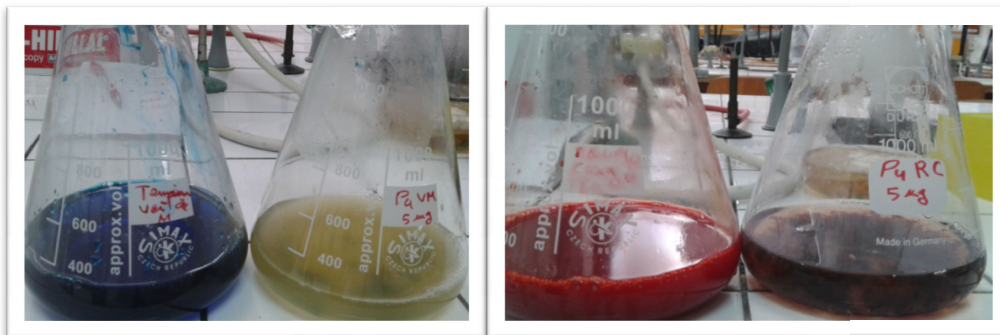


Figure 15 Test de la dégradation sur milieu submergé

4.3.2.1 le dosage laccasique

Après fermentation et lors du dosage de l'activité laccasique ; les résultats montrent la présence d'une bonne activité laccasique sur les deux échantillons.

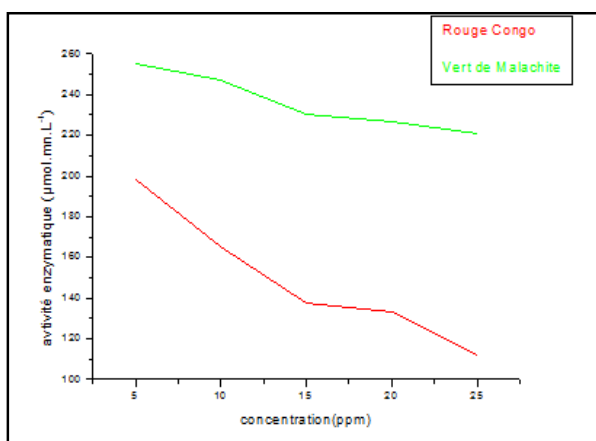


Figure 16 L'activité laccasique de la souche *Trametes sp* à différentes concentrations de VM et RG

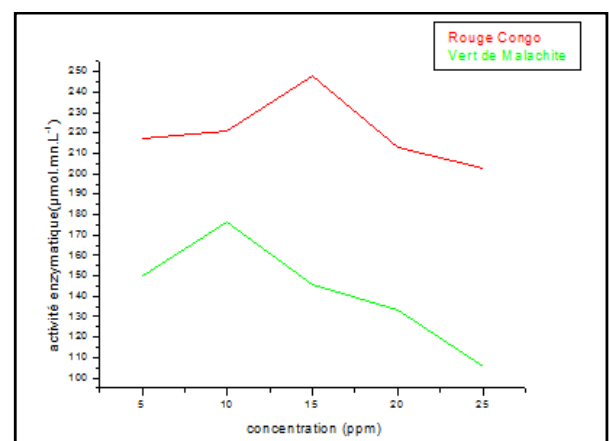


Figure 17 L'activité laccasique de la souche *Chartomium sp* à différentes concentrations de VM et RG

Résultats et discussion

Les figures (16 et 17) représentent l'activité laccasique de *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* au cours de la dégradation du Rouge Congo et le Vert de Malachite avec différentes concentrations de 05ppm jusqu'à 25ppm.

Les résultats montrent que l'activité laccasique de *Chaetomium sp.* atteint son optimum ($248 \mu\text{mol.mn.L}^{-1}$) à une concentration de 15ppm du Rouge Congo, cependant, pour le Vert de Malachite l'optimum est obtenu à 10ppm avec une valeur de ($178 \mu\text{mol.mn.L}^{-1}$).

Par ailleurs, l'activité laccasique sécrétée par *Trametes sp.* est au maximum à 05ppm des deux colorants testés, avec une valeur de $250 \mu\text{mol.mn.L}^{-1}$ en additionnant le Vert de Malachite et $200 \mu\text{mol.mn.L}^{-1}$ en additionnant le Rouge Congo.

4.3.3 Analyse de la dégradation des colorants par spectrophotomètre

Après les analyses par spectrophotomètre ; les résultats montrent la dégradation

Des deux colorants par la laccase.

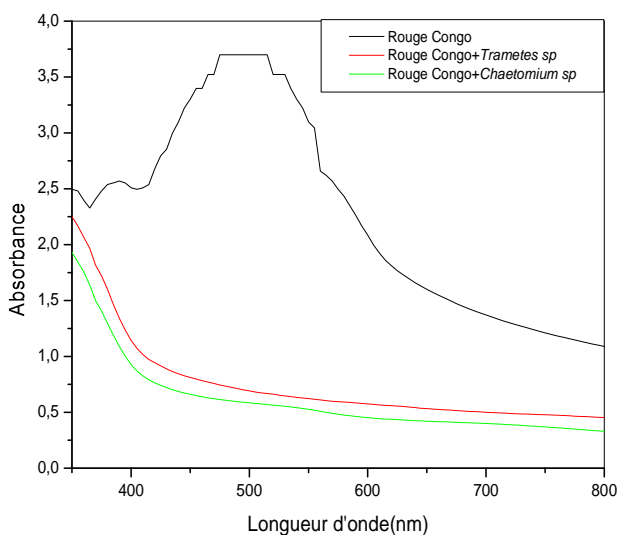


Figure 18 Spectre du Rouge Congo,
Chaetomium sp +RC et *Trametes sp* +RC

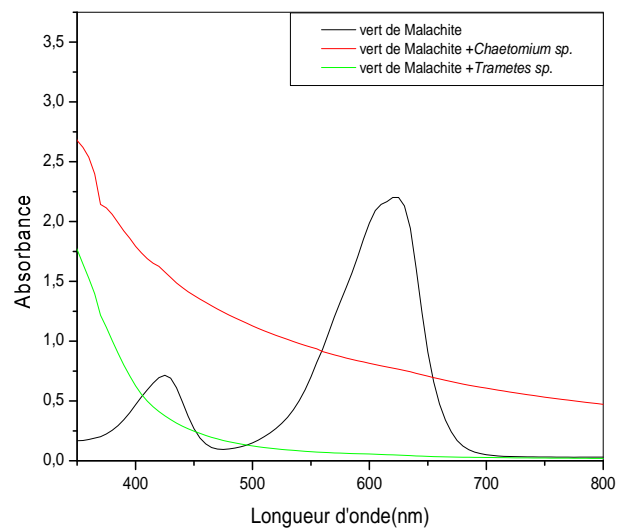


Figure 19 Spectre du Vert de Malachite,
Chaetomium sp +VM et *Trametes sp* +VM

La figure (18) montre que le Rouge Congo possède une bande d'absorption très importante à 498nm relative à la liaison azoïque (N=N) en présentant un pic ; qui et après fermentation,

Résultats et discussion

diminue progressivement puis disparaît. La disparition de ce pic peut être assimilée à la coupure de la liaison N=Nce qui confirme la dégradation du RC par la laccase ; ces résultats sont concordés avec ceux de Yesiladaet *al.*(2014) lors de la dégradation du réactif Bleu (171) par *Funaliatrogii*sécrétrice de la laccase.

Le spectre (figure 19) montre une bande d'absorbance maximale du Vert de Malachite qui est obtenue à 623 nm. Par ailleurs, elle disparaît dans les échantillons issus de la fermentation. Cette disparition est due à la dégradation du VM par oxydation par la laccase qui est sécrétée par les deux souches, ces résultats corroborent à ceux de Balan et *al.* (2011) qui ont mis en évidence la dégradation du VM par la laccase sécrétée par *Pleurotus florida* et à ceux de Parshettiet *al.*(2006) qui ont obtenu une dégradation du VM par *Kocuria rosa*MTCC1532 sécrétrice DCIP réductase, laccase, tyrosinase et lignine Peroxydase.

4.3.4 Analyse de la dégradation par HPLC

Les analyses par HPLC ont été réalisées afin de confirmer les résultats obtenus par spectrophotométrie, et ce par la confirmation la dégradation du Rouge Congo et le Vert de Malachite par la laccase.

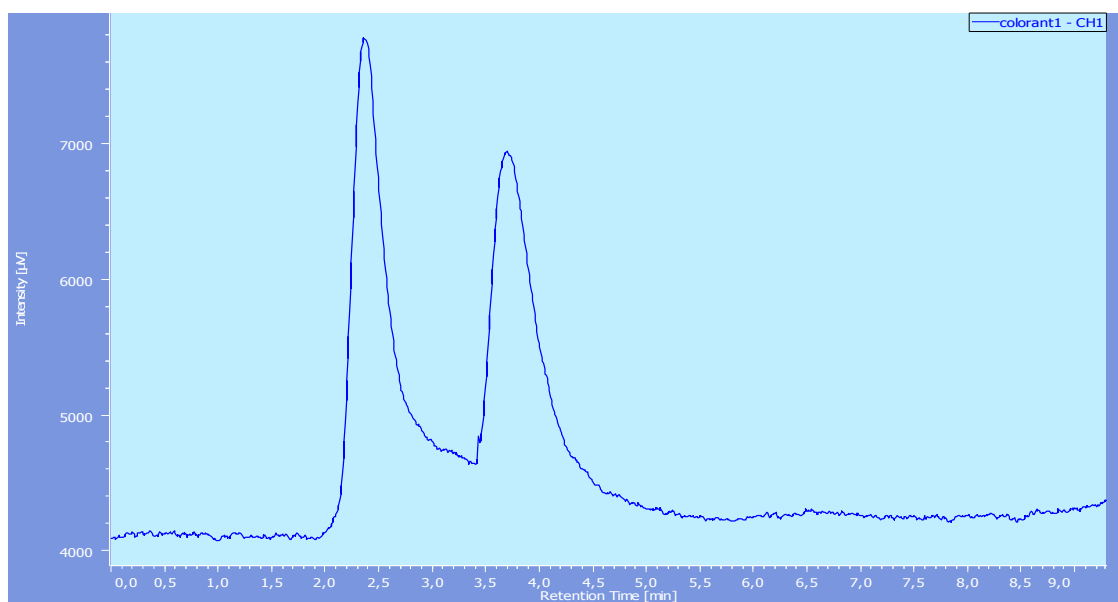


Figure 20 Chromatogramme du Rouge Congo
($\lambda=498$ nm)

Résultats et discussion

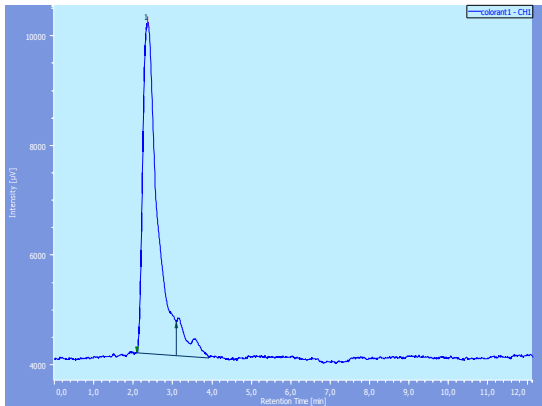


Figure 21 Chromatogramme du Rouge Congo + *Trametes sp.* ($\lambda=498$)

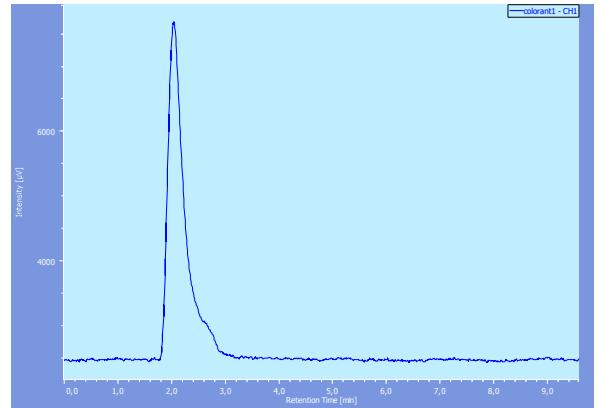


Figure 22 Chromatogramme du Rouge Congo + *Chaetomium sp.* ($\lambda=498$ nm)

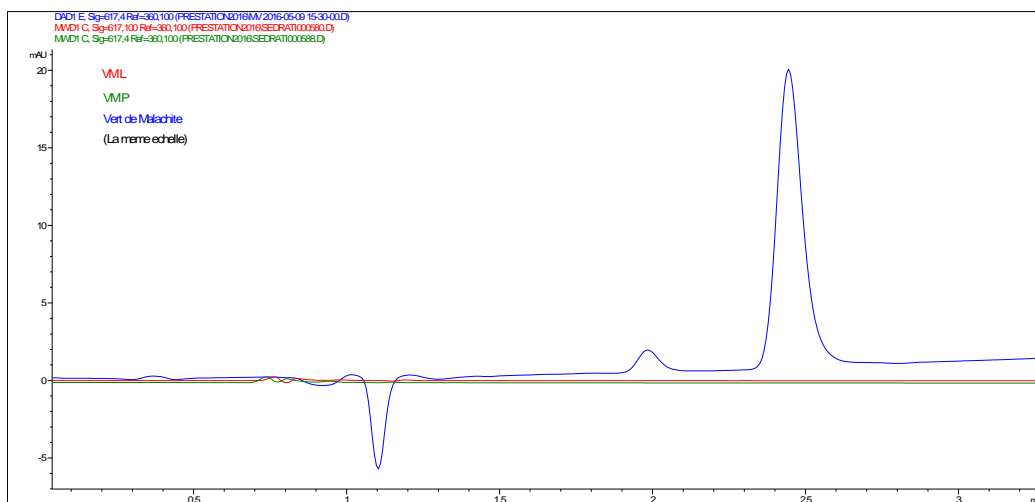


Figure 23 Chromatogramme du Vert de malachite ($\lambda=623$ nm), (VM+*Chaetomium sp.* et VM+*Trametes sp.*)

Le chromatogramme obtenu (figure 20), effectué à 498nm a permis l'apparition de deux pics successifs présentant RC; dont le premier à $t_r=2.4$ min et le deuxième à $t_r=3.8$ min. Par ailleurs, une disparition totale du deuxième pic a été remarquée sur les deux échantillons testés (figure 21, figure 22) ce qui peut confirmer la dégradation du Rouge Congo par la laccase sécrétée par *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.*.

En effet, Le chromatogramme (figure 23) réalisé à 623 nm du colorant Vert de Malachite a donné un pic à un temps de rétention de 2.5min qui disparaît totalement dans les échantillons issus de la fermentation, ce qui confirme que la laccase a dégradé ce colorant. Ces résultats

Résultats et discussion

corroborent à ceux de Parshetti *et al.* (2006); cependant la dégradation du colorant par *Kocuria rosa* est moins importante que celle faite par la laccase sécrétée par *Chaetomium sp.* et *Trametes sp.* Où une disparition totale du pic a été observée.

*Conclusion et
perspectives*

5. Conclusion

D'après la littérature, la laccase est une enzyme particulièrement intéressante et prometteuse pour l'avenir des biotechnologies, dont l'importance de cette enzyme est d'avoir des potentiels d'applications dans l'industrie du textile pour la dégradation des colorants synthétiques et le traitement des eaux usées issues de cette industrie. De ce fait, Le travail présenté dans cette étude consiste à la mise en évidence d'un intérêt biotechnologique de la laccase sécrétée par deux souches fongiques appartenant au genre : *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.*, à savoir : la dégradation des colorants synthétiques, en particulier, ceux utilisés en industrie du textile.

En effet, les deux souches sélectionnées ont montré leur capacité à dégrader deux colorants testés en l'occurrence: Rouge Congo et Vert de Malachite; sur milieu solide et sur milieu submergé.

Par ailleurs, les analyses effectuées par spectrophotomètre et HPLC sur les échantillons issus de la fermentation en additionnant les colorants testés ont confirmé la capacité de la laccase à les dégrader.

Ces résultats sont juste un pas dans la recherche des intérêts biotechnologiques des mycètes sécrétant la laccase pour la dégradation des colorants synthétiques et du textile. 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;
- Production de laccase à grand échelle;
- Caractérisation et purification de laccase.

Références

Bibliographiques

6. Références bibliographiques

- Aaslyng D, Rorbaek K, Sorensen NH. (1996). An enzyme for dyeing keratinous fibres. *International Patent Application* W09719998.
- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz G. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*.66:3357- 3362.
- Alexandre G, Zhulin I.B. (2000). Laccases are widespread in bacteria [1]. *Trends in Biotechnology*, vol. 18. n° 2. p. 41-42.
- Alxender G, Jacoud C, Faure D, Bally R. (1996). Population dynamics of a motile and a non-motile *Azospirillum lipoferum* strain during rice root colonization and motility variation in the rhizosphere. *Microbiol.Ecol.* 19,271-278.
- AssavanigA, AmornkitticharoenB, Ekpaisal N, MeevootisomV, Flegel T.M. (1992).Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.38: 198-202.
- Baghriche O. (2005). Contribution de méthodes destructives (photolyse et P.O.A 's) et non destructives à l'élimination de deux colorants (Bleu de Méthylène et Rouge Congo) en solution aqueuse. Université Mentouri Constantine.
- Baldrian P. (2006).fungal laccases. Occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*, 30, 215-242.
- Barbat A. (2009). Extraction, caractérisation chimique et valorisation biologique de glucuronoxylyanes de bois de châtaignier. Thèse de Doctorat. Université de Limoges.
- Barrett F.M. (1987). Characterization of polyphenol oxidases from larval cuticle of *sarcophaga bullata* and a comparison with cuticular enzymes from other species. *Can.J.Zool.* 65,1158-1166.
- Ben Mansour H, Corroler D, Bariller D, Ghedira K, Che kir- Ghedira L, Mosrati R. (2009). Influence of the chemical structure on the biodegradability of acids yellow 17, violet 7 and orange 52 by *Pseudomonas putida*. *Ann. Microbiol.*59, 1-7.
- Ben Mansour H, Mosrati R, Corroler D, Ghedira K, Bariller D, Chekir- Ghedira L. (2010). Acid violet 7 and its biodegradation products induce chromosome

Références bibliographiques

- aberration, lipid peroxidation and cholinesterase inhibition in mouse bone marrow. *Environ.Sci. Pollut. Res.*17, 1371-1778.
- Binnington K.C, Barrett F.M. (1988). Ultrastructural localization of phenoloxidase in cuticle and haemopoietic tissue of the blowfly *Lucilia cuprina*. *Tissue & cell.* 20,405-420.
 - Bizani E, Fytianos K, Poullos I, Tsiridis V. (2006). "Photocatalytic decolorization and degradation of dye solutions and wastewaters in the presence of titanium dioxide", *J.Hazardous Materials.* 136, 85–94.
 - Blanchette R. A. (2000). "A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments." *International Biodeterioration & Biodegradation* 46(3): 189-204.
 - Blaquez P, Casas N, Font X, Gabarrell M, Sarra M, Caminal G. (2004). Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*.*Water Research.*38:2166-72.
 - Bouaouine A.s, Gharfi M. (2015). Production de la laccase par des mycètes filamenteux sur milieu à base de déchets de citrouille (*cucurbita sp.*). Université des frères mentouri Constantine. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Département de microbiologie.
 - Brown M.A, Devito S.C. (1993). Predicting azo dye toxicity. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*12, 405-414.
 - Budolla V, Subosk C, Pallavi H, Rajasekhar R. (2008). Screening and assesment of laccase producing fungi isolated from environmental samples. *African journal of biotechnologie.* Vol. Pp1129-1133.
 - Chen H R, Wang F, Cerniglia C.E. (2004). Molecular cloning, overexpression, purification, and characterization of an aerobic FMN-dependent azoreductase from *Enterococcus faecalis*. *Protein Expr. Purif.*34, 302–310.
 - Chung KT, Ful k, Andrews A.Y. (1981). Mutagenicity testing of some commonly used dyes. *Appl.Environ. Microbiol.* 42, 641-648.
 - Claus H. (2004) Laccases: structure, réactions, distribution. *Micron.* 35 (1 2): 93-96. complement of coppers.*J Biol Chem.* 277,37663-37669.
 - Colour Index. (1975). The Society of Dyers and Colourists. *Revised third edition.* UK.
 - Dec J, Haider K, Bollage J.M. (2003). Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions chemosphere. 52,549-556.

Références bibliographiques

- DEPA (Danish Environmental Protection Agency). (2000). *Survey of azo-colorants in Denmark, Toxicity and fate of azo dyes*.
- Dubé E. (2008). Thèse présentée comme exigences partielle du doctorat en sciences de l'environnement. Université du Québec à Montréal.
- Duran N, Esposito E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*; 28:83-99.
- Duran N, Rosa M.A, Dannibale A, Gianfreda L. (2002). Application of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports : a review. *Enzyme Microb Technol* 31, 907-931.
- Faccelo J, Cruz O. (2009). « *Production of laccases by the white-rot fungus *trametes pubescens* for their potential application to synthetic dye Treatment* » thèse de Doctorat, Department of Chemical Engineering, Université de Rovira i Virgili, Tarragona, Spain. ISBN: 978-84-692-7932-8.
- Farnet A.M, Criquet S, Tagger S, Gil G, Le Petit J. (2000). Purification, partial characterisation, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Canadian Journal of Microbiology*. 46: 189-194.
- Fogle M.R, Douglas D.R, Jumper C.A, Straus D.C. (2007). Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia*. 164[1], 49-56.
- Ganesh P, Satish K, Ganesh S, Sanjay G. (2006). Biodégradation of Malachite Green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. Département de Biochimistry. Shivaji University. Kolhapur-416004. India.
- Georis J, Lomascolo A, Camarero S, Dorgeo V, Herpoel I, Asther M. (2003). *Pycnoporus cinnabarinus* laccases: an interesting tool for food or non-food applications. *MededFac Landbouwkd Toegep Biol Wet*, 68:263-266.
- Gianfreda L, Xu F, Bollag J.M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*. 3,1-25.
- Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P. (1993). Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere : evidence for laccase activity in non- motil strain of *Azospirillum lipoferum*. *Microbiol. Lett*, 108,205-210.
- Golka K, Kopps S, Mysla k. (2004). Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. *Toxicol. Lett.*, 151, 203-210.

Références bibliographiques

- Golz-Berner K. Walzel B. Zastrow L. Doucet O. (2004). Cosmetic and dermatological preparation containing copperbinding proteins for skin lightening. *International Patent Application W02004017931*.
- Gonzalez T, Terron M, Zapico E, Yague S, Tellez A, Junca H, Gonzalez A. (2003). Identification of a new laccase gene and confirmation of genomic predictions by *cDNA* sequences of *Trametes sp. I-62 laccase family*, Centro de Investigaciones Biologicas, *Velazquez 144, E-28006 Madrid, Spain*.
- Guettari S, Benkhatou K. (2014). élimination d'un mélange de colorants par les procédés d'oxydations avancées. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran - « Mohamed Boudiaf ».
- Guiraud J.P. (1998). Microbiologie Alimentaire. Paris.
- Gusetu G. (2010). Développement d'un microréacteur à base d'enzyme microencapsulée en vue d'un couplage en ligne à un système d'électrophorèse capillaire. Université de Montréal. Département de Chimie.
- Hammami S. (2008). Etudes de dégradation des colorants de textile par les procédés d'oxydation avancée, application à la dépollution des rejets industriels. Université Paris-Est. Institut Francilien des Sciences Appliquées.
- Hao O.J, Kim H, Chiang P.C. (2000). Decolorization of wastewater. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 30, 449-505.
- Huttermann A, Mai C, Kharazipour A. (2001). Modification of lignin for the production of new compound materials. *Applied Microbiology and biotechnology.* 55,387-394.
- Issa N. (2009). Etude de l'oxydation de différents composés phénoliques par la laccase de *Myceliophthora thermophila* : application à la fonctionnalisation du chitosane. Spécialité : procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Nancy- Université INPL.
- Jolival C, Raynal A, Caminade E, Kokel B, LeGoffic F, Mougin C. (1999). Transformation of N', N' -dimethyl-N (hydroxyphenyl)ureas by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 51 :676-681
- Justo A. (2014). The Taxonomy of Turkey Tails (*Trametes*) and Related Polypores: One Genus or Too Many? *The Mycophile* 54, 8-10.

Références bibliographiques

- Kaushi k.G, Gopal M, Thakur I.S. (2010). Evaluation of performance and community dynamics of microorganisms during treatment of distillery spent wash in a three stage bioreactor. *Bioresour. Technol.* 101,4296-4305.
- Kenealy WR, Jeffries TW. (2003). Enzyme Processes for Pulp and Paper: A Review of *Recent Developments*. In: Goodell B, Nicholas DD, Schultz TP (eds) Wood deterioration and preservation: advances in our changing world, *ACS symposium series 845. Washington. pp* 210-239.
- Khan N.N, Wilson B.L. (2003). An environmental assessment of mold concentrations and potential mycotoxin exposures in the greater Southeast Texas area. *J Environ Sci. Health A Tox. Hazard. Subst Environ Eng.* 38[12], 2759-2772
- Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. (2003). Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules.* 4:1394-1399.
- Lang G, Cotteret J. (1999). Hair dye composition containing a laccase.
- Leonowicz A, Bollag J.M. (1987). Laccase in soil and the feasibility of their extraction. *Soil Biol. Biochem.* 19,237-242.
- Levine W.G. (1965). Laccase, a review. In: The biochemistry of copper, *Academic Press Inc. New York.* 371-385.
- Luisa M, Goncalves FC, Steiner W. (1996). Purification and characterization of laccase from a newly isolated wood-decaying fungus. In: Jeffries TW, Viikari L (eds) Enzymes for pulp and paper processing. *American Chemical Society. Washington.* 258-265
- Malliga P, Uma L, Subramanian G. (1996). Lignolytic activity of the cyanobacterium *Anabaena azollae* ML2 and the value of coir waste as a carrier for BGA biofertilizer. *Microbios*, 86, 175-183.
- Manahan S.E. (1994). *Environmental chemistry*. Lewis publishing. 6^{ème} édition. Atlanta. GA. USA.
- Martinez-Inigo MJ, Gutierrez A, deI Rio JC, Martinez MJ, Martinez AT. (2000). Time course of fungal removal of lipophilic extractives from Eucalyptus globulus wood. *Journal of Biotechnology.* 84:119-126.
- Mathiasen TE. (1996). Laccase for improved beer storage. *Trends in Food Science & Technology.*
- Mayer A.M, Staples R.C. (2002). Laccase :new functions for an old enzyme. *Phytochemistry.* 60,551-565.

Références bibliographiques

- Mayer A.M. (1987). Polyphenoloxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*. 26,11-20.
- Messerschmidt A. (1997). Multi-copper oxidases. World scientific, Singapore.
- Miessner M, Crescenzi O, Napolitano A, Prota G, Andersen S.O, Peter M.J. (1991). Biophenyltetrols and dibenzofuranones from oxidative coupling of resorcinols with 4-alkylpyrocatechols : new clues to the mechanism of insect cuticle sclerotization. *Helvetica chimica Acta*. 74,1205-1212.
- Minussi RC, Pastore GM, Duran N. (2007). Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresource Technology*; 98:158-164
- Mougin C, Jolival C, Briozzo P. (2003). Fungal laccases : from structure-activity studies to environmental applications. *Environ Chem Lett*. 1,145-146.
- Naoto F. (2014). An isocratic toxic chemical-free mobile phase HPLC-PDA analysis of Malachite Green and Leuco-Malachite Green. Graduate school of Human Life Science. Osaka city University. Osaka 558-8585.Japan.
- Nyanhongog G.S, Gubitz G, Leitner C, Haltrich D, Ludwig R. (2007). *Oxidoreductases from Trametes spp. in Biotechnology: A Wealth of Catalytic Activity*. *Food Technology and Biotechnology* 45 (3). 250–268.
- Pagga U, Brown D. (1986). The degradation of dyestuffs part II: behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*. 15, 479-491.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sanna G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (50): 31301-31307.
- Perrin R, Pierre S.J. (1999). "Chimie industrielle " 2^{ème} édition.
- Perry C.R, Matcham S.E, Wood D.A, Thurston C.F. (1993). The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology*. 139: 171-178.
- Piontek K, Antorini M, Choinowski T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full.

Références bibliographiques

- Pointing SB. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57:20-33.
- Rehn L. (1895). Blasengeschwulste bei Fuschinarbeiten. *Arch. KlinChir.* 50 588.
- Riva S. (2006). Laccases : blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* 24,219-226.
- Rodriguez Couto S, López E, Sanroman MA. (2006). Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors. *Journal of Food Engineering*. 74:263-267.
- Rodriguez Couto S, Sanroman M.A. (2006). Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourization ability. *Journal of Food Engineering*. 73:388- 393.
- Roure M, Delattre P, Froger H.(1992). Composition for an enzymic coloration of keratin fibres. especially for hair and its use in a dyeing process. *European Patent Application EP0504005*.
- Ruggiero P, Radogna V.M. (1984). Properties of laccase in humus-enzyme complexes. *Soil sci.* 138, 74-87.
- Sato Y, Wuli B, Sederoff R, Whetten R. (2001). Molecular cloning and expression of eight cDNAs in loblolly pine (*pinus taeda*). *J.Plant Res.* 114,147-155.
- Schlosser D, Grey R, Fritsche W. (1997). Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbial Biotechnology*. 47: 412-418.
- Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*. 43: 152- 159.
- Sharrna P, Goel R, Capalash N. (2007). Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23:823-832.
- Solomon E.I, Sundaram U.M, Machonkin T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chimical reviews* .96, 2563-2605.

Références bibliographiques

- Swamy.J. (1998). "The biodecoloration of textile dyes by the white rot fungus *trametesversicolor*". thèse doctorat. University Kingston, Ontario. Canada March.
- ThakkerG.D, EvansC.S, RaoK.K. (1992). Purification and characterisation of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 37: 321-323.
- Thuillier A. (2013). Diversité fonctionnelle des Glutathion Transférases fongiques: caractérisation des classes Ure2p et GTT2 de *Phanerochaete chrysosporium*. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. Département de biologie Végétale et Forestière.
- ThurstonC.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*; 140:19-26.
- Torres E. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the détoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B : Environ.* 46,1-15.
- Uma L, Kalaiselvi R, Subramanian G. (1994). Isolation of a lignolytic bacterium for the degradation and possible utilization of a coir waste. *Biotechnol. Lett*, 16,303-308.
- Van der Zee F.P. (2002). "Anaerobic azo dye reduction", thèse doctorat. University the Netherlands.
- Vega K, M Kalkum. (2012). "Chitin, Chitinase Responses, and Invasive Fungal Infections." *International Journal of Microbiology*.
- WahleitnerJ.A, XuF, BrownK.M, BrownS.H, Golightly E.J, HalkierT, KauppinenS, PedersonA, SchneiderP. (1996). The identification and characterisation of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Cultent Genetics*.29:395-403.
- Welham A. (2000). The theory of dyeing (and the secret of life). *J. Soc. Dyers Colour*. 116, 140-143.
- Willmott N.J, Gutherie J.T, Nelson G. (1998). The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. *J. Soc. Dyers Colour*.114, 38-41.
- Xu F. (1999). Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production and applications. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. The encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. New York: *JohnWiley & Sons*-. p. 1545-1554.

Références bibliographiques

- Yague S, Terron M.C, Gonzalez T, Zapico E, Bocchini P, Galletti G.C, Gonzalez A.E. (2000). Biotreatment of tannin-rich beer- factory wastewater with white- rot basidiomycete *Coriolopsis gallica* monitored by pyrolysis / gas chromatography / mass spectrometry. *Rapid Communication Mass Spectrometry*. 14, 905-910.
- YaverD.S, BerkaR.M, BrownS.H, XuF. (2001). Cloning, characterisation, expression and commercialisation of fungal laccases. 8th symposium on recent advances in lignin biodegradation and biosynthesis. 40.
- Yesilada ö, Birhanli E, Ercan S, özmen N. (2014). Reactive dye decolorization activity of crude laccase anzyme from repeated-batch culture of *Funalia trogii*. İnönü University. *Turkish Jornal of Biology*.
- Zareb A. (2014). 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 ousou.143p.
- Zollinger H. (1987). VCH.

Résumés

7. Résumé

L'objectif de ce travail est la mise en évidence d'un intérêt biotechnologique des deux souches fongiques sécrétant de la laccase appartenant au genre *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* qui ont été fournis par le laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et l'activité Microbienne (LaMyBAM) ; Université Frères Mentouri Constantine.

Cette étude a pour but de montrer la capacité de la laccase à dégrader des colorants synthétiques, à savoir, ceux utilisés dans l'industrie du textile.

En effet, le test sur milieu solide a montré la capacité des souches à dégrader efficacement deux colorants, à savoir : Rouge Congo et Vert de Malachite. Par ailleurs, les analyses par spectrophotomètre des deux colorants ont montré que le Rouge Congo possède une bande d'absorption très importante à 498nm et le Vert de Malachite à 623nm; cependant, les résultats montrent la disparition des deux bandes en présence de la laccase pour les deux colorants.

D'autre part, Les analyses par HPLC montrent la disparition totale du pic représentant le vert de malachite après fermentation, alors que pour le rouge Congo, un des deux pics le distinguant disparaît en présence de laccase.

Mots clés : Laccase, *Trametes sp.*, *Chaetomium sp.* ; dégradation des colorants synthétiques ; industrie du textile ; Rouge Congo ; Vert de Malachite.

7 Abstract

The objective of this work is to apply a biotechnology avail of laccase enzyme witch secreted by *Trametes sp.* and *Chaetomium sp.* that provided by the laboratory of Mycology, Biotechnology and Microbial Activity (LaMyBAM), Brothers Mentouri University, Constantine.

This study proved the hight ability of laccase to degrade synthetic dyes, especially in textile industry; that illustrates by the analysis with spectrophotometer and HPLC.

The results show that the Congo Red is absorbed in $\lambda_{\max}=498$ nm and the Green Malachite in $\lambda_{\max}= 623$ nm, but this absorption wave was disappeared with the tow dyes in the existence of laccase enzyme. The HPLC analysis of Congo Red show the appearance of tow peaks; however with laccase enzyme there is a disappearance of the second peak, for the Green Malachite, there is one peak witch disappeared totally with laccase enzyme.

All these results confirm the capacity of laccase enzyme to degrade synthetics dyes.

Keywords : laccase , *Chaetomium sp.*, *Trametes sp.* degradation of synthetic dyes ; textile industry , Congo Red, Green Malachite.

8. تلخيص

الهدف من هذا العمل هو تطبيق فائدة من فوائد laccase من قبل سلالتين فطريتين تنتمي إلى أجناس *Chaetomium sp.* , و *Trametes sp.* التي تم توفيرهما من طرف مخبر (LAMYBAM) جامعة الإخوة منتوري قسنطينة.

أثبتت هذه الدراسة قدرة ال laccase على تحليل الألوان الاصطناعية و بالتحديد المستعملة في مجال صناعة الأنسجة , و هذا ما وضحته التحاليل بواسطة spectrophotomètre و HPLC حيث أظهرت النتائج أن مجال امتصاص أحمر الكونغو في $\lambda \text{ max} = 498 \text{ nm}$, و أخضر المالاثيت في $\lambda \text{ max} = 623 \text{ nm}$ لكن في وجود laccase هناك انعدام في موجة الامتصاص لكلا اللونين.

كما أوضحت نتائج التحاليل بـ HPLC ظهور سهمين قائمين (deux pics) على التوالي في $t_r = 2.4 \text{ min}$ و $t_r = 3.8 \text{ min}$ بالنسبة لأحمر الكونغو وحده و لكن في وجود ال laccase تم تسجيل اختفاء سهم قائم (pic) أما أخضر المالاثيت فظهر سهم قائم في $t_r = 2.5 \text{ min}$ لكن في وجود ال laccase تم اختفاء السهم تماما, كل هذه النتائج تبين قدرة laccase على تحليل الألوان الاصطناعية.

الكلمات المفتاحية : laccase ; *Trametes sp.* ; *Chaetomium sp.* ; تحليل الألوان الاصطناعية , صناعة النسيج ; أحمر الكونغو ; أخضر المالاثيت.

Annexes

Annexe 1

Le milieu mea : (Guiraud, 1998)

- Extrait de malt.....20g
- Agar agar.....20g
- Glucose..... 20g
- Peptone.....01g

Annexe 2

Préparation de mélange réactionnel : (Bouaouine et Gharfi, 2015)

- 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.

Intérêt biotechnologique des souches fongiques secrétant de la laccase

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie fongique
/ fermentation et production des substances fongiques

Résumé

L'objectif de ce travail est la mise en évidence d'un intérêt biotechnologique des deux souches fongiques secrétant de la laccase appartenant au genre *Trametes sp.* et *Chaetomium sp.* qui ont été fournis par le laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et l'activité Microbienne (LaMyBAM) ; Université Frères Mentouri Constantine.

Cette étude a pour but de montrer la capacité de la laccase à dégrader des colorants synthétiques, à savoir, ceux utilisés dans l'industrie du textile.

En effet, le test sur milieu solide a montré la capacité des souches à dégrader efficacement deux colorants, à savoir : Rouge Congo et Vert de Malachite. Par ailleurs, les analyses par spectrophotomètre des deux colorants ont montré que le Rouge Congo possède une bande d'absorption très importante à 498nm et le Vert de Malachite à 623nm; cependant, les résultats montrent la disparition des deux bandes en présence de la laccase pour les deux colorants.

D'autre part, Les analyses par HPLC montrent la disparition totale du pic représentant le vert de malachite après fermentation, alors que pour le rouge Congo, un des deux pics le distinguant disparaît en présence de laccase.

Mots clés : Laccase, *Trametes sp.*, *Chaetomium sp.* ; dégradation des colorants synthétiques ; industrie du textile ; Rouge Congo ; Vert de Malachite.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Microbiologie (RDC) UFM-Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme Pr. Mihoubi I	(Professeur- UFM Constantine).
Rapporteur : Mer Pr. Kacem chaouche. N	(professeur-UFM Constantine).
Examinatrice: Mme Kara ali. M	(Maitre de conférences- UFM Constantine).
Tutrice : Mme Benhassine S.	

Date de soutenance : 26/06/2016