



**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE**

**PAR**

**OUSMANE TOURÉ**

**ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION DU PHÉNOL PAR  
*PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* (ATCC-24725) ET  
*PLEUROTUS SAJOR-CAJU* (NRRL-18757).**

**AOÛT 1996**

**TABLE DES MATIÈRES**

TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
SOMMAIRE.....	xiii
1. INTRODUCTION.....	2
2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
2.1. LE PHÉNOL.....	7
2.1.1. Sources.....	7
2.1.1.1. Sources naturelles.....	7
2.1.1.2. Sources humaines.....	7
2.1.2. Dangers liés au phénol.....	8
2.1.3. Dégradation abiotique du phénol.....	9

2.1.3.1. Dans l'air.....	9
2.1.3.2. Dans l'eau.....	9
2.1.4. Autres Méthodes d'élimination du phénol.....	10
2.1.4.1. Méthodes physico-chimiques.....	10
2.1.4.2. Méthodes biologiques.....	12
2.1.5. Les voies de dégradation du phénol.....	13
2.1.6. Microorganismes impliqués dans la dégradation du phénol.....	18
2.2. LES LIGNINASES.....	20
2.2.1. Les lignines.....	20
2.2.2. Le processus ligninolytique et les ligninases.....	21
2.2.2.1. Les lignines peroxydases (LiP).....	21
2.2.2.1.1. Mécanisme d'action des LiPs.....	22
2.2.2.2. Les manganèse Peroxydases (MnP) et les laccases.....	23

2.2.2.2.1. Mécanisme d'action des MnPs.....	23
2.3. Les ligninases de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	24
2.3.1. Conditions de production des ligninases.....	25
2.3.1.1. Dans la nature.....	25
2.3.1.2. En culture.....	25
2.4. Facteurs influçant la production de ligninases et la ligninolyse.....	26
2.4.1. La température.....	26
2.4.2. Le pH.....	26
2.4.3. La limitation en nutriments.....	26
2.4.4. L'oxygène.....	27
2.4.5. L'agitation.....	27
2.5 Les ligninases de <i>Pleurotus sajor-caju</i> .....	29
2.5.1. L'activité ligninolytique de <i>Pleurotus sajor-caju</i> .....	29

2.6. Les ligninases et leur rôle dans la biodégradation des	
Composés toxiques.....	31
3. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	34
3.1. MATÉRIELS.....	35
3.1.1. Microorganismes.....	35
3.1.2 Milieux de culture.....	35
3.1.2.1. Milieu liquide.....	35
3.1.2.2. Milieu solide.....	37
3.1.3. Substrat à dégrader et autres produits chimiques.....	37
3.1.4. Matériels d'incubation.....	37
3.1.5. Dessiccateur sous vide.....	37
3.1.6. Broyeur Sonic dismembrator.....	38
3.1.7. Appareils.....	38
3.2. MÉTHODE.....	39
3.2.1. Identification et vérification de la pureté des cultures.....	39

3.2.2. Stérilisation des milieux de culture.....	39
3.2.3. Ajout du phénol aux milieux de culture.....	39
3.2.4. Préparation du préinoculum.....	40
3.2.5. Préparation de l'inoculum.....	40
3.2.6. Ensemencement des milieux de culture.....	41
3.2.7. Mesure de l'extension mycéliale.....	41
3.2.8. Mesure du poids sec de la biomasse.....	42
3.2.9. Dosage quantitatif du phénol.....	43
3.2.9.1. Chromatographie liquide à haute performance.....	43
3.2.9.1.1. Préparation des échantillons.....	44
3.2.10. Identification des produits de la dégradation du phénol...	45
3.2.10.1. CG-MS.....	45

3.2.10.1.1. Extraction du phénol.....	45
3.2.10.1.2. Silylation du phénol.....	46
3.2.11. Détermination de l'adsorption mycéliale.....	46
3.2.11.1. Écrasement du mycélium aux ultrasons.....	48
3.2.12. Adaptation des microorganismes au phénol.....	48
3.2.13. Évaluation de la dégradation du phénol <i>in vitro</i> .....	49
4. RÉSULTATS.....	50
4.1. Tolérance des microorganismes au phénol.....	51
4.1.1. Évaluation du seuil de tolérance au phénol.....	51
4.2. Dégradation du phénol.....	60
4.2.1 Effet du pH sur la dégradation du phénol.....	60
4.2.2. Effet de l'âge de la culture sur la dégradation du phénol...	65
4.2.3. Effet de la concentration en azote sur la dégradation du phénol.....	70

4.2.4. Effet de la concentration en glucose sur la dégradation du phénol.....	75
4.2.5. Effet de l'adaptation au phénol sur sa dégradation.....	80
4.2.6. Effet de la nature du substrat sur la dégradation.....	85
4.2.7. Effet de la température sur la dégradation du phénol.....	87
4.2.8. Effet de l'agitation sur la dégradation du phénol.....	87
4.2.9. Étude de la dégradation <i>in vitro</i> .....	96
4.3. Étude des intermédiaires de dégradation du phénol.....	96
4.3.1. Chromatographie en phase gazeuse.....	96
4.3.2. Spectrophotométrie de masse (SM).....	97
5.DISCUSSION.....	102
6.CONCLUSION.....	114
7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	117
8. REMERCIEMENTS.....	134

9.	ANNEXE.....	136
----	-------------	-----

### LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Méthodes physico-chimiques d'élimination du phénol.....	11
Tableau 2	Quelques microorganismes impliqués dans la dégradation du phénol.....	19
Tableau 3	Effet de la nature du substrat sur la dégradation du phénol par <i>P. Sajor-caju</i> et <i>P.chrysosporium</i> .....	86

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Évaluation du seuil de tolérance au phénol de *P. sajor-caju* sur milieu solide..... 53
- Figure 2.** Évaluation du seuil de tolérance au phénol de *P. chrysosporium* sur milieu solide..... 55
- Figure 3.** Évaluation du seuil de tolérance au phénol de *P. sajor-caju* sur milieu liquide..... 57
- Figure 4.** Évaluation du seuil de tolérance au phénol de *P. chrysosporium* sur milieu liquide..... 59
- Figure 5.** Effet du pH sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*.  
.....62
- Figure 6.** Effet du pH sur la dégradation du phénol par *P. chrysosporium*..... 64
- Figure 7.** Effet de l'âge de la culture sur la dégradation du phénol par *P. chrysosporium*.....67
- Figure 8.** Effet de l'âge de la culture sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*. .....69

- Figure 9.** Effet de la concentration en azote sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*.....72
- Figure 10.** Effet de la concentration en azote sur la dégradation du phénol par *P. chrysosporium*.....73
- Figure 11** Effet de la concentration en glucose sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*.....77
- Figure 12.** Effet de la concentration en azote sur la dégradation du phénol par *P. chrysosporium*.....79
- Figure 13.** Effet de l'adaptation au phénol sur sa dégradation par *P. sajor-caju*.....82
- Figure 14.** Effet de l'adaptation au phénol sur sa dégradation par *P.chrysosporium*. .... 84
- Figure 15.** Effet de la température sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*..... 89
- Figure 16.** Effet de la température sur la dégradation du phénol par *P.chrysosporium*..... 91
- Figure 17.** Effet de l'agitation sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*..... 93
- Figure 18.** Effet de la température sur la dégradation du phénol par *P.chrysosporium*..... 95

## SOMMAIRE

L'Agence de Protection de l'Environnement des États Unis (USEPA) considère le phénol comme polluant majeur de l'eau et des sols, soit directement, soit comme intermédiaire de dégradation d'autres composés phénoliques. Il existe de nombreux procédés de détoxification du phénol, mais la plupart de ces procédés sont le plus souvent onéreux et introduisent dans la nature d'autres produits généralement plus toxiques que le phénol lui même, exposant ainsi notre écosystème et notre santé à des risques majeurs et parfois irréversibles de détérioration. La dernière décennie a vu la vulgarisation des procédés biologiques de dégradation des xénobiotiques. Ces procédés biologiques, même s'ils sont plus sécuritaires et constituent un champ d'investigation et de recherche prometteur offrant d'immenses potentialités , demeurent cependant relativement sous-exploités, ils ne représentent que 6% des procédés de détoxification utilisés. D'où la recherche constante de microorganismes toujours plus performants dans la biodégradation.

C'est dans cette optique que nous avons choisi d'étudier l'activité biodégradante du phénol de deux Basidiomycètes ligninolytiques: *Phanerochaete chrysosporium* ATCC # 24725 et *Pleurotus. sajor-caju* NRRL # 18757. Les ligninases sont des enzymes qui, en plus de leur potentiel de dépolymérisation de la lignine, ont une grande activité non spécifique leur permettant de dégrader un

très grand nombre de produits toxiques. Le choix de *P. chrysosporium* se justifie par le fait qu'il a été largement étudié comme agent biodégradeur, celui de *P. sajor-caju* se justifie par le fait qu'une étude antérieure faite dans notre laboratoire lui reconnaissait le pouvoir de transformer la lignine en oligolignols de faible poids moléculaire. Mais aucune étude n'a jusqu'à date utilisé *P. sajor-caju* pour la biodégradation du phénol.

La présente étude porte donc sur la dégradation du phénol par ces deux microorganismes sous diverses conditions physiques et chimiques. *P. sajor-caju*, bien que n'ayant pas une très grande activité ligninolytique connue, a pu, dans nos conditions expérimentales, dégrader plus de phénol et cela en moins de temps que *P. chrysosporium*. Il ressort de notre étude que les deux microorganismes étudiés présentent une très bonne tolérance à de fortes concentrations de phénol (jusqu'à 800 ppm) sur milieux liquide et solide. Le pH optimal de dégradation du phénol des deux champignons sont assez proches même si dans le cas de *P. sajor-caju*, le pH optimum de dégradation ne correspond pas à celui de croissance. En ce qui concerne l'âge de la culture au moment de l'addition du phénol, nous avons observé des comportements tout à fait différents. En effet, plus les cultures de *P. chrysosporium* étaient âgées, plus tôt commençait la dégradation et plus importante était la quantité

de phénol dégradée, tandis que chez *P. sajor-caju*, les cultures fraîches se sont montrées plus performantes que celles âgées. La concentration en azote ne nous a pas semblé jouer de rôle très important sur la capacité de dégradation du phénol par *P. sajor-caju* contrairement à *P. chrysosporium*, même si un certain rapport C:N est nécessaire pour les deux microorganismes. Nous avons toutefois noté qu'un excès d'azote dans le milieu de culture avait un effet inhibiteur sur la croissance et le potentiel de dégradation des deux champignons. L'adaptation à de fortes concentrations de phénol a été bénéfique pour les performances de dégradation du phénol par les deux microorganismes, mais, même dans ces conditions, celles de *P. sajor-caju* étaient de loin meilleures. Nous avons aussi testé l'effet de diverses sources de carbone sur la dégradation du phénol, et, c'est la paille de blé délignifiée (substrat le moins dispendieux) qui a donné les meilleurs résultats. Nous avons noté que la température optimale de dégradation du phénol par *P. sajor-caju* ne correspond pas à sa température optimale de dégradation de la lignine. Les deux champignons se sont avérés inefficaces en cultures stationnaires, la vitesse optimale d'agitation a été de 200 tpm. *P. sajor-caju* a très peu dégradé le phénol *in vitro* (moins de 20% en 7 jours) tandis que *P. chrysosporium* a dégradé dans ces conditions, 60% du phénol en 7 jours. Le principal intermédiaire de la dégradation, le pyrocatechol, est identique à celui

habituellement reconnu aux champignons et aux bactéries. Quelles que soient les conditions expérimentales, *P. sajor-caju* a été de loin le plus efficace, hormis la dégradation *in vitro*. *P. sajor-caju* constitue un bon choix lorsque l'on s'intéresse à la bioremédiation de sites contaminés au phénol par des champignons.

## 1. INTRODUCTION

L'industrialisation à outrance que le monde actuel connaît, aggravée par les nouvelles exigences du consommateur sur les critères de qualité, constituent des phénomènes qui vont de plus en plus exiger l'utilisation de produits xénobiotiques pour la conservation et l'amélioration des conditions de culture dans l'agro-alimentaire. Cette recrudescence de l'utilisation de produits chimiques d'origine anthropogénique épargnera à n'en pas douter, très peu de secteurs industriels. Parmi ceux qui seront les plus affectés, figurent les pâtes et papiers, le bois, l'agriculture, le élevage, pour ne citer que ceux-là . Cette situation aura pour corollaire l'exposition de notre santé et de notre écosystème à des dangers graves de détérioration parfois malheureusement irréversibles. Malgré l'existence de nombreux moyens de traitement de ces polluants, il faut noter que d'un point de vue d'innocuité et de conservation de la qualité de notre environnement, ces moyens existants sont de peu de secours pour la simple et bonne raison qu'ils introduisent dans notre cadre de vie des produits parfois plus toxiques que ceux qu'ils sont supposés éliminer.

Aussi, l'alternative la plus tentante serait l'utilisation de moyens environnementalement sûrs, économiquement abordables et techniquement facilement réalisables. L'un des moyens qui obéissent à ces exigences est l'utilisation de microorganismes capables de croître sur

ces composés toxiques, de les dégrader et de les utiliser comme sources de carbone. C'est pour cela que nous avons choisi dans notre étude deux champignons connus pour leur activités ligninolytiques: *Phanerochaete chrysosporium* et *Pleurotus sajor-caju*. Ces deux champignons, responsables de la pourriture du bois, produisent des enzymes extracellulaires, les ligninases, capables de dépolymériser la lignine, un des matériaux constitutifs du bois et la substance aromatique naturelle la plus abondante à côté de la cellulose (Kirk et Nakatsubo, 1983; Hammel et al., 1993). Cette propriété de dégradation de la lignine a amené les chercheurs à tester ces microorganismes sur des composés récalcitrants tels les organopolluants (Valli et Gold, 1991, Kennes et al., 1994). La très forte activité lignine-peroxydase (LiP) et manganèse peroxydase (MnP) ligninolytique de *P. chrysosporium*, s'est avérée être due à l'oxydant à deux électrons directement impliqué dans la dégradation des organopolluants (Bumbus et al., 1985). Habituellement, l'activité ligninolytique intervient au cours du métabolisme secondaire (Jeffries et al., 1981). *P. sajor-caju*, qui est un autre basidiomycète qui est l'objet principal de notre étude, produit peu d'enzymes ligninolytiques (Bourbonnais et Paice, 1988, Chahal et al., 1995). Cependant, ce champignon s'est avéré être très efficace dans la dépolymérisation de la lignine en oligolignols de faible poids moléculaire (Chahal et Hachey,

1990). Il y a des évidences, bien que non expliquées jusqu'à date, qu'il existe des situations où l'implication directe d'enzymes ligninolytiques n'est pas indispensable pour la dégradation de la lignine.

La présente étude avait donc pour objectifs, de déterminer l'aptitude de *P. sajor-caju* à dégrader le phénol, de savoir si la dégradation du phénol par ce champignon intervenait dans des conditions favorisant la ligninolyse ainsi que l'effet de différentes conditions physico-chimiques sur le potentiel de dégradation du phénol. Nous avons introduit *P. chrysosporium* dans notre étude comme témoin parce que c'est le champignon le plus étudié et le plus utilisé pour la dégradation des composés toxiques

## **2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **2.1. LE PHÉNOL**

L'Agence de Protection de l'environnement des États Unis a classé le phénol comme polluant majeur (USEPA). Il se présente sous la forme d'un solide cristallin, incolore, blanc ou rosé, soit comme un liquide à forte odeur, semblable à celle du goudron ou des médicaments, soit sous forme de solution. Sa solubilité dans l'eau est partielle à la température de la pièce et entière au-delà de 68°C. C'est un acide faible, modérément volatile à la température de la pièce.

### **2.1.1. Sources**

#### **2.1.1.1. Sources naturelles**

Le phénol est un constituant du goudron de houille et est formé durant la décomposition de matériaux organiques. Les feux de forêt peuvent en augmenter la quantité dans l'environnement (Hubble et al. , 1981). Il est présent dans le purin (Spoelstra, 1978) et dans le lisier de porc.

#### **2.1.1.2. Sources humaines**

La méthode de production la plus courante du phénol est celle qui utilise le cumène (isopropylbenzène), cette méthode est utilisée aux É.U

pour la production de 98% du phénol (IARC, 1989). Le phénol est aussi produit à partir du chlorobenzène et du toluène. Lorsqu'il est produit à partir du cumène, pour chaque Kg de phénol produit, il y a 0.16 g de phénol émis dans l'environnement (UBA, 1981). Le phénol est employé comme matière de base dans la fabrication de nombreux matériaux de grande valeur commerciale tels que les contre-plaqués, les résines phénoliques, les bisphénols, les phénols alkylés ainsi que les chlorophénols comme le PCP (IARC, 1989). D'autres sources humaines peuvent être les tuyaux d'échappement des automobiles (Verschueren, 1983), les fumées de cigarettes (Groenen, 1978), la combustion du bois (Den Boeft et al., 1984), la dégradation du benzène sous l'influence de la lumière (Hoshino et Akimoto, 1978), les aliments fumés (Bruce et al., 1987).

### **2.1.2. Dangers liés au phénol**

Dans l'environnement, le phénol est nuisible à la vie aquatique où sa dégradation très rapide peut provoquer un manque local d'oxygène. Il peut aussi, dans les sols et les eaux se lier au chlore et former des phénols chlorés. En milieu alcalin, le phénol peut subir une oxydation pouvant entraîner la formation quinones. Le phénol constitue un grand danger pour la santé humaine, il a été démontré que ce composé

présente des propriétés cancérigènes et tératogènes (IARC, 1989).

### **2.1.3. Dégradation abiotique du phénol**

#### **2.1.3.1. Dans l'air**

Le phénol peut réagir avec les radicaux hydroxyles et  $\text{NO}_2$  et subir d'autres réactions photochimiques pour former des dihydroxybenzènes, des nitrophénols et des produits issus du clivage du noyau aromatique (Bruce et al., 1987). La demi-vie de la réaction du phénol avec les radicaux hydroxyles est estimée à 15 heures (Howard, 1989).

#### **2.1.3.2. Dans l'eau**

Il a été démontré expérimentalement que le phénol s'oxyde en gaz carbonique à 50°C, dans l'eau, en présence d'oxygène et de lumière (Knoevenagel et Himmerlich, 1976) à un taux de 11% par jour. Il peut réagir avec les ions nitrates en milieu aqueux et former des dihydroxybenzènes, des nitrophénols, des nitrosophénols et des nitroquinones (Niessen et al., 1988). Il peut agir aussi avec l'acide nitreux des eaux usées pour former des cyanures (Adachi et al., 1987), avec le chlore de l'eau de consommation courante pour former des chlorophénols (Jarvis et al., 1985).

#### **2.1.4. Autres méthodes de dégradation du phénol**

##### **2.1.4.1. Méthodes physico-chimiques**

Elles sont nombreuses et sont presque toutes physiques ou chimiques.

(Voir tableau page suivante)

**Tableau 1: Méthodes physico-chimiques d'élimination du phénol**

MÉTHODES D'ÉLIMINATION	SOURCES
Élimination par résines échangeuses d'ions	Pilie <u>et al.</u> , 1975
Destruction par le peroxyde	OGJ, 1975
Dégradation par le $\text{KMnO}_4$	Spiecher et Skrinde 1975
Oxydation	Spiecher et Skrinde 1975
Réduction	Bauer, W. F. 1975
Oxydation de la phase gazeuse	Bauer, W. F. 1975
Osmose inverse	Fang, 1976

#### 2.1.4.2. Méthodes biologiques

La dernière décennie a vu la vulgarisation des méthodes biologiques d'élimination des composés xénobiotiques d'une manière générale. Ces méthodes, même si elles sont sécuritaires et offrent d'énormes potentiels d'investigation demeurent toutefois relativement peu utilisées et ne représentent que 6% des procédés de détoxification (Berkovitz et Farka, 1992). Les microorganismes peuvent jouer un rôle important dans la dégradation du phénol contenu dans les sols, les sédiments et l'eau. Cependant, seul un petit nombre des bactéries présentes dans le sol peuvent dégrader le phénol (Hickman et Novak, 1989). Le pouvoir dégradant du phénol peut être acquis par suite d'expositions répétées au produit toxique (Wiggins et Alexander, 1988; Tibbles et Baeker, 1989). Le phénol peut être minéralisé en aérobiose en CO<sub>2</sub> (Dobbin et al., 1987; Aquino et al., 1988) ou en méthane en anaérobiose (Ehrlich et al., 1982; Fedorak et Hruday, 1986). Dans la biodégradation du phénol, les intermédiaires suivants ont été identifiés: benzoate, cathéchol, cis-cis muconate,  $\beta$ -keto adipate, succinate et acétates (Paris et al., 1982; Knoll et Winter, 1987). Il faut cependant noter que la dégradation du phénol par les bactéries peut être affectée par la concentration du phénol (Ursin, 1985 ; Hwang et al., 1989), la

température (Bark et Widdel, 1986; Gurujeyalashimi et Oriel, 1989), la lumière du soleil (Hwang et al., 1986), la profondeur du sol (Dobbins et al., 1987 ; Federle, 1988), la présence d'autres nutriments pour la croissance (Thornton Manning et al., 1987) la présence d'autres polluants (Southworth et al., 1985; Namkoong et al., 1989 ) et l'abondance des bactéries présentes (Tranvik et al., 1991). Une partie du carbone issu de la biodégradation du phénol peut être incorporé dans la biomasse bactérienne (Chesney et al., 1984). Le phénol peut être dégradé sous sa forme libre ainsi qu' après adsorption sur le sol ou les sédiments, bien que l'adsorption réduise la dégradation (Knezovitch et al., 1988). L'utilisation des champignons est relativement récente mais obéit quasiment aux mêmes conditions que la bactérie. Mais, dans le cas des champignons, la dégradation se fait surtout en aérobiose. Le champignon le plus utilisé jusqu'à date dans les expériences de biodégradation demeure *P. Chrysosporium*.

#### **2.1.5. Les voies de dégradation du phénol**

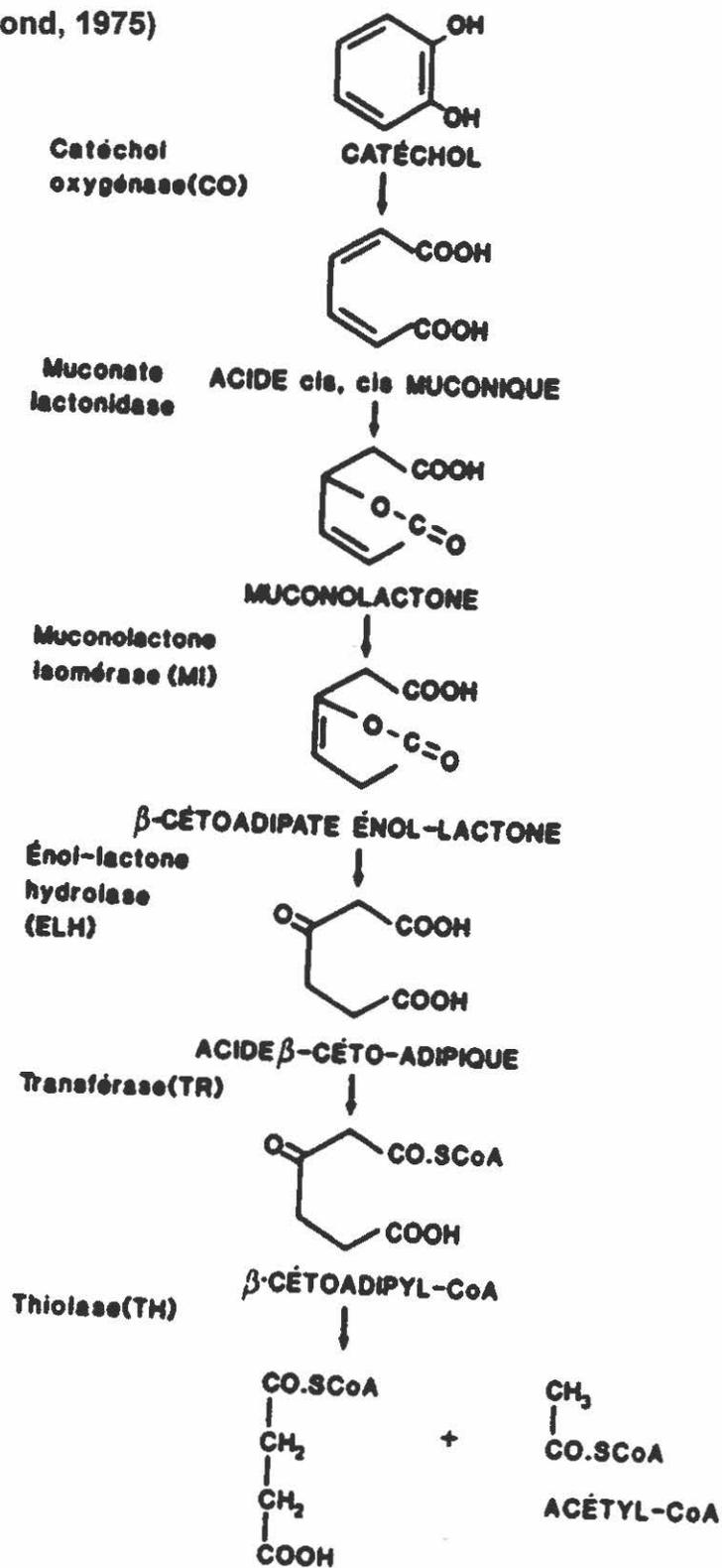
Deux grandes voies de dégradation du phénol et des composés phénoliques sont connues jusqu'à date. La dégradation se fait toujours selon le même processus qui a été décrit depuis plus de trente ans (Rogoff, 1961; Tabak et al., 1964). Ces deux voies majeures sont:

- la voie "ortho" ou  $\beta$ -ceto-adipique : Elle se caractérise par l'ouverture du cycle au niveau du lien entre les atomes de carbones voisins portant le groupement hydroxyle, ce qui a valu à cette voie l'appellation de scission intradiol.

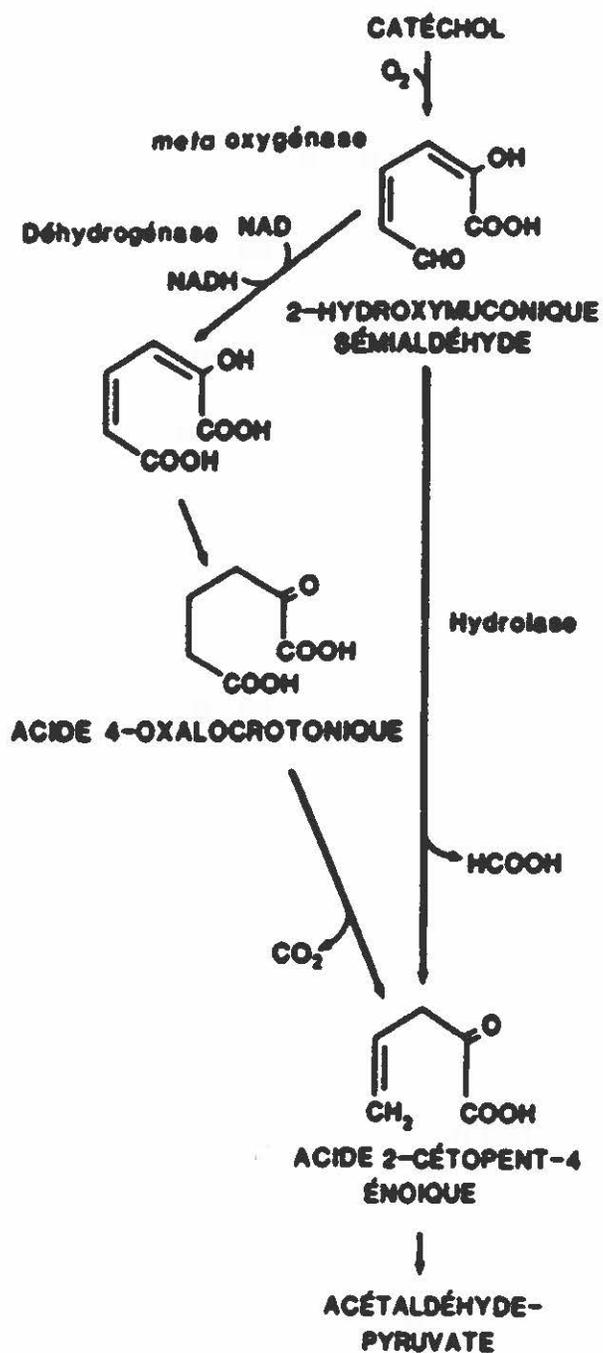
- la voie "méta": L'ouverture du cycle benzénique dans ce cas se fait entre deux atomes de carbone où seulement un des deux atomes est relié au groupement hydroxyle, l'autre étant non substitué ou substitué par un autre groupement (Chapman, 1972; Bayly et Barbour, 1984). La dégradation d'un grand nombre de polluants se fait par la voie méta qui, contrairement à la voie "ortho", nécessite une moins grande spécificité enzymatique (Bayly et Barbour, 1984). La dégradation par les deux voies "ortho" et "méta" entraîne toujours une oxydation du phénol en catéchol. Dans le premier cas, il y a ouverture du cycle benzénique en position "ortho" sous l'action de la 1,2 dioxygénase et formation de l'acide muconique, transformé à son tour en acide  $\beta$ -ceto-adipique. Ce dernier subit une hydroxylation en acétyl CoA et en acide succinique qui entrent dans le cycle de Krebs où ils sont minéralisés en  $\text{CO}_2$ . Dans le second cas, l'ouverture du cycle se fait en "méta", il se forme sous l'action de catéchol 2,3 dioxygénase, l'acide 2-hydroxymuconique sémialdéhyde qui sera hydrolysé en formaldéhyde et en acide 2-cétopent-4 énoïque ou

subira une déshydrogénation NAD<sup>+</sup>-dépendante en acide oxalocrotonique. Ce dernier, par décarboxylation dévient l'acide 2-cétopent-4 énoïque qui est hydrolysé en acide 2-céto-4hydroxyvalérique. Ce dernier composé se scind en acétaldéhyde et pyruvate qui entrent dans le cycle de Krebs. La plupart de bactéries et champignons utilisent ces deux voies de dégradation du phénol et des composés phénoliques. Selon certains auteurs, la nature du substrat privilégiera une voie par rapport à une autre (Sala-Trepat et al., 1972).

La voie "ortho" de dégradation du phénol ( d'après Clarke et Richmond, 1975)



La voie "méta" de dégradation du phénol ( d'après Clarke et Richmond, 1975)



### **2.1.6. Microorganismes impliqués dans la dégradation du phénol**

le tableau ci-dessous n'est pas exhaustif, il est plutôt indicatif de la variété des microorganismes impliqués dans la dégradation du phénol. Le tableau sur la page suivante n'est pas exhaustif mais plutôt indicatif de la diversité des microorganismes impliqués dans la dégradation du phénol.

**Tableau 2 : Quelques microorganismes impliqués dans la dégradation  
du phénol**

Microorganismes	Sources
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Kennes, C., et Lema, J. M., 1994
<i>Pseudomonas</i>	Ribbons, 1966
<i>Alcaligenes</i>	Schwien et Schmidt, 1982; Hughes <u>et al.</u> , 1984; Westmeier et Rehm, 1985
<i>Rhodotorula glutamis</i>	Walker, 1973
<i>Candida tropicalis</i>	Shivaraman <u>et al.</u> 1978
<i>Flavobacterium</i>	Brebion <u>et al.</u> , 1967, Girard, 1979
<i>Achromobacter</i>	Girard, 1979
<i>Bacillus</i>	Brebion <u>et al.</u> , 1967; Buswell, 1975
<i>Nocardia</i>	Nachtigall et Butler, 1974

## **2.2. LES LIGNINASES**

### **2.2.1. Les lignines**

Les lignines sont des biopolymères complexes phénylpropanoïdes, formés dans la paroi cellulaire des plantes par l'association d'alcools p-hydroxycinnamyl. Les lignines représentent 10 à 30% de la biomasse fournie par les plantes supérieures et leur rôle est de conférer aux plantes leur rigidité structurale, de protéger leur cellulose et hémicellulose des attaques microbiennes. Les lignines sont amorphes, stéréo irrégulières, insolubles dans l'eau et résistantes à la dégradation par la plupart des microorganismes (Adler, 1977; Kirk et Farrel, 1987). La dégradation rapide de la lignine semble être limitée aux champignons à moisissure blanche tels que les Basidiomycètes qui vivent sur le bois mort et dont la croissance dépend des polysaccharides contenus dans ce bois mort. La ligninolyse en tant que telle ne supporte pas la croissance, son but est plutôt d'ouvrir la structure du bois pour que les agents dégradateurs des polysaccharides puissent y avoir accès.

### 2.2.2. Le processus ligninolytique et les ligninases

La lignine étant un biopolymère de très grande taille, de structure irrégulière et très peu hydrosoluble, le processus ligninolytique doit par conséquent impliquer des enzymes particulièrement performantes. Ces enzymes sont extra cellulaires, non-spécifiques et oxydantes. Certains auteurs considèrent la ligninolyse par les champignons comme étant une combustion enzymatique (Adler, 1977). C'est cette très faible spécificité des ligninases qui a fait que des auteurs ont suggéré que les organopoluants seraient des cibles fortuites du métabolisme ligninolytique des champignons (Bumpus et al., 1985; Haemmerli et al., 1986; Hammel et al., 1986; Sanglard et al., 1986; Bumpus et Aust, 1987b).

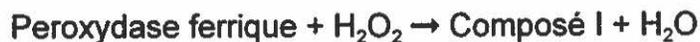
#### 2.2.2.1. Les lignines peroxydases (LiP)

Une des principales réactions dans la ligninolyse par les champignons est une réaction de clivage  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  oxydante de la chaîne latérale propyle de la lignine. Par exemple, les structures arylglycerol- $\beta$ -aryl éther de la lignine, qui représentent 50 à 60% du polymère, sont clivées *in vivo* pour donner des  $C_{\alpha}$ -aldéhydes benzyliques (Adler, 1977; Gold et al., 1989). Cette réaction est catalysée dans les modèles synthétiques de lignine et dans la lignine naturelle par des peroxydases

extra cellulaires et très hautement oxydatives, connues sous le nom de lignine peroxydase (Glenn *et al.*, 1983; Tien and Kirk, 1983; Gold *et al.*, 1989; Tien and Kirk, 1983; Kirk and Frrel, 1987; Hammel et Moen, 1991; Hammel *et al.*, 1993). Les LiPs ionisent leur substrat aromatique pour générer des radicaux aryle (cations). Ces radicaux subissent une variété de réactions non-enzymatiques dont des attaques nucléophiles de l'eau, dans le cas des composés aromatiques simples (Kersten *et al.*, 1985) et des fissions des liaisons C-C dans le cas des modèles de phényl - propane qui imitent la structure naturelle de la lignine (Hammel *et al.*, 1986; Kirk *et al.*, 1986).

#### **2.2.2.1.1. Mécanisme d'action des LiPs**

Le mécanisme d'action des LiPs est le même que celui de la quasi totalité des peroxydases (Tien et Kirk, 1984). L'enzyme est oxydé par le transfert de deux électrons à partir de  $H_2O_2$  pour former le composé I. Ce composé I oxyde à son tour une molécule de substrat A par un électron, pour former le composé II et un radical libre. Les radicaux libres subissent à leur tour des réactions non enzymatiques pour former les produits finaux.



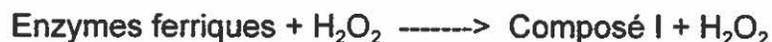
#### 2.2.2.2. Les manganèse peroxydases (MnP) et les laccases

Les champignons à moisissure blanche produisent aussi d'autres oxydants extra cellulaires à un électron sous la forme manganèse peroxydases (MnP) et de laccases (Glenn et Gold, 1985). Les laccases oxydent directement les substrats tandis que les MnPs oxydent le  $\text{Mg}^{2+}$  en  $\text{Mg}^{3+}$ , en présence de différents chélateurs organiques. Le  $\text{Mg}^{3+}$  agit comme un oxydant diffusible, à une certaine distance du site actif de l'enzyme (Glenn et Gold, 1985; Gold *et al.*, 1989). Le faible poids moléculaire et la diffusibilité du  $\text{Mg}^{3+}$  font des MnPs les enzymes idéales de la ligninolyse dans le bois. Cependant, le  $\text{Mg}^{3+}$  chélaté est un oxydant faible qui agirait plutôt sur des substrats facilement oxydés tels que le phénol. Il a été démontré que les MnPs sont capables de dépolymeriser la lignine *in vitro*, probablement à travers l'attaque des structures phénoliques du polymère (Wariishi *et al.*, 1991). Les LiPs et les MnPs, à

cause donc de leur non-spécificité constituent évidemment des enzymes impliquées dans la catalyse de l'oxydation des xénobiotiques par les champignons à moisissure blanche (Bumpus et al., 1985; Gold et al., 1989; Hammel et al., 1993).

#### 2.2.2.2. Mécanisme d'action des MnPs

Leur mécanisme d'action est similaire à celui des LiP, excepté que les MnP utilisent le Mn(II) comme médiateur. Dès que le Mn(II) est oxydé par l'enzyme en Mn(III), ce dernier peut oxyder des molécules de substrats organiques.



### 2.3. Les ligninases de *Phanerochaete chrysosporium*

La découverte des ligninases de *P. Chrysosporium* remonte à 1983 (Tien et Kirk, 1983; Glenn et al., 1983). Il faut cependant attendre 1988 pour voir la caractérisation et la purification du système ligninolytique de *P. Chrysosporium* (Tien et Kirk, 1988); il est composé de 10 isoenzymes différentes (H1 à H10 ). Les isoenzymes H1, H2, H6, H7, H8 et H10 ont une activité peroxydase sur l'alcool vératrylique, ce qui leur a valu le nom de peroxydases alcool vératrylique dépendantes (ligninases de type LiP). Les autres isoenzymes sont des peroxydases manganèse dépendantes (ligninases de type MnP) (Glenn et Gold, 1985; Paszczynski et al., 1986). Ce sont les isoenzymes du type LiP qui prédominent dans le milieu lorsque la concentration de manganèse dans le milieu est faible ou nulle tandis que les isoenzymes de type MnP prédominent dans le milieu lorsque la concentration du manganèse dans le milieu est normale ou élevée (Bonnarne et Jeffries, 1990). Il faut toutefois noter que l'isoenzyme H<sub>6</sub> est celle qui est capable d'oxyder un plus grand nombre de substrats par rapport aux autres (Tien et Kirk, 1983; Kirk et al., 1986; Renganathan et Gold, 1986). Ces substrats, une fois oxydés, peuvent subir de nouvelles étapes d'oxydation par la même isoenzyme.

### **2.3.1. Conditions de production des ligninases**

#### **2.3.1.1. Dans la nature**

Dans la nature, ainsi que nous l'avons vu plus haut, la lignine "masque" les polysaccharides cellulosiques et hémicellulosiques qui constituent le substrat nécessaire aux microorganismes pour leur croissance et leur développement. La production de ligninases intervient donc dans la nature comme un phénomène compensatoire de la limitation en carbone. La production de ligninase apparaît quasiment donc comme un phénomène de survie pour le champignon (Renganathan et Gold, 1986).

#### **2.3.1.2. En culture**

Les conditions de production des ligninases ont été étudiées chez *P. Chrysosporium* en cultures agitées et stationnaires (Kirk et al., 1976; Lundkist et al., 1977; Kirk et al., 1976; Kirk et Fenn, 1982; Faison et Kirk, 1985; Schimida et al., 1981). Différents facteurs influencent cette production de ligninases en culture.

## **2.4. Facteurs influençant la production de ligninases et la ligninolyse**

### **2.4.1. La température**

La température optimale de croissance se situerait entre 37°C et 40°C (Kirk et al., 1976 ). Cependant, une étude relativement récente a démontré une très grande activité ligninolytique et un taux très élevé de déminéralisation de la lignine synthétique à 30°C (Perez et Jeffries, 1990).

### **2.4.2. Le pH**

Les mêmes études de Perez et Jeffries en 1990, ont également établi que le pH optimum de dégradation de la lignine est de 4.0, bien que le pH optimal de croissance se situe à 5.0.

### **2.4.3. La limitation en nutriments**

Le bois ne contient que de très faibles quantités d'azote, cette concentration dépasse rarement 0.3% du poids sec du bois et se situe le plus souvent entre 0.03% et 0.1% ( Merrill et Cooling, 1966). Le rapport C:N est très élevé et varie entre 350:1 et 1250:1 (Merill et Cooling, 1966). Depuis longtemps, on sait que l'activité ligninolytique intervient comme un processus de métabolisme secondaire, en réponse à une limitation ou à

un épuisement de nutriments, tels que la source en carbone (Keyser et al., 1978; Leatham et Kirk, 1983; Jeffries et al., 1981; Kirk et al., 1986) ou d'azote et/ou en soufre. C'est surtout la limitation en azote qui permet la dégradation intensive de la lignine. Ce qui indiquerait selon Jeffries et ses collaborateurs, la présence chez *P. Chrysosporium*, d'un système de régulation qui contrôlerait l'activité ligninolytique (Jeffries et al., 1981). Toutefois, il faut noter que ce phénomène de limitation en azote n'est pas nécessaire lorsqu'aucune autre source d'énergie n'est présente dans le milieu (Yang et al., 1980; Leisola et al., 1984) car le champignon peut recycler et utiliser ses propres réserves d'azote (Merrill et Cowling, 1966).

#### **2.4.4. L'oxygène**

La production de ligninases par *P. Chrysosporium* est stimulée par la saturation de l'atmosphère en oxygène (Reid, 1989; Lundkist et al., 1977). La ligninolyse aussi est stimulée par ce phénomène (Kirk, 1987). Mais, de faibles niveaux d'oxygène à l'intérieur des pelotes de champignon peuvent empêcher la ligninolyse (Kirk et al., 1978)

#### **2.4.5. L'agitation**

À l'origine, les études de production de ligninases ont été faites sur des cultures peu profondes, en flacons Erlenmeyer de 125 ml en phase

stationnaire. Des expériences réalisées en conditions agitées et stationnaires ont révélé une certaine différence dans la composition du système ligninolytique. Il est ressorti de ces études que, l'activité LiP était faible en cultures agitées ( 80 - 90 U/L ) comparée aux cultures non-agitées ( 400 - 500 U/L ) et l'isoenzyme de la LiP, H<sub>8</sub>, responsable de l'oxydation d'un grand nombre de substrats toxiques, était prédominante dans les cultures immobiles tandis que l'isoenzyme H<sub>2</sub> était prédominante dans les cultures agitées( Tudor *et al.*, 1988). L'agitation semblait donc avoir un effet négatif quant à la dégradation de la lignine et la production de l'isoenzyme H<sub>8</sub>. L'explication fournie semble privilégier la thèse des faibles niveaux d'oxygène dissous dans les agrégats mycéliaux ou les pelotes de grande taille (Kirk *et al.*, 1978) ainsi que celle des interférences avec les réactions nécessitant la présence d'oxygène (Yang *et al.*, 1980). Une autre explication, donnée par Fournier et ses collaborateurs, serait que l'agitation inhiberait la formation de peroxyde d'hydrogène (Fourney *et al.*, 1982). Cependant, diverses méthodes ont été utilisées pour atteindre des niveaux élevés de ligninases en cultures agitées, dont l'écrasement du mycélium pour améliorer les quantités d'oxygène dissous dans la cellule et l'addition de Tween (Leisola *et al.*, 1985); et, dans ces conditions, les niveaux d'activité LiP étaient comparables à ceux rapportés en cultures immobiles et peu profondes

(Tien and Kirk, 1983).

## **2.5. Les ligninases de *Pleurotus sajor-caju***

Bourbonnais et Paice, 1978, ont réalisé l'une des études les plus complètes sur l'activité ligninolytique de *P. sajor-caju* sur de la lignine marquée au  $^{14}\text{C}$ . Cette étude a montré que *P. sajor-caju*, en plus de son activité ligninolytique, croît bien sur les matériels lignocellulosiques (Zadrazil, 1978).

### **2.5.1. L'activité ligninolytique de *P. sajor-caju***

Très peu d'informations existent sur les enzymes responsables de la ligninolyse chez *P. sajor-caju* bien que ce microorganisme soit reconnu comme capable de dégrader la lignine (Trojanowski et Leonowicz, 1969; Hiroi et Eriksson, 1976; Leatham et Kirk, 1983). Cette activité se situerait à deux niveaux: extra cellulaire et intracellulaire (Fukuzumi *et al.*, 1983). Il existe donc, selon ces auteurs, au niveau extra cellulaire, une activité laccase à pH 4.5, une activité peroxydase acide à pH 2.9 et une activité peroxydase neutre à pH 7.0. Au niveau intra cellulaire (paroi cellulaire), seules quelques fractions provenant du complexe présentent l'activité peroxyde acide. Cependant que l'activité laccase se retrouve aux deux niveaux extra et intra cellulaire. En 1988, Bourbonnais et Paice ont isolé

chez *P.sajor-caju* deux oxydases de l'alcool veratrylique (OAV), si semblables chimiquement et physiologiquement, qu'elles seraient selon ces auteurs, des isoenzymes. Le pH optimum d'activité de ces deux isoenzymes se situe aux alentours de 5.0. Ces OAV ont été isolées du surnageant de culture de *P. sajour-caju* et ont oxydé l'alcool veratrylique en veratraldéhyde en présence d'oxygène. Les OAV de *P. sajour-caju* présentent un schéma d'activité différent de celui de *P. chrysosporium*. Le rôle des oxydases dans la biodégradation des xénobiotiques pourrait être de produire H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant l'oxydation des fragments de lignine. Les OAV de *P. sajour-caju* ont cependant une grande spécificité de substrats bien qu'elles soient capables d'oxyder un grand nombre d'alcools aromatiques. L'alcool veratrylique qui est synthétisé par les champignons à moisissure blanche à partir du glucose, joue un rôle très important dans le transfert d'électrons entre la lignine peroxydase LiP et la lignine (Harvey et al., 1986). L'oxydation de l'alcool veratrylique est un phénomène qui se produit très rapidement chez *P. sajour-caju* (Waldner et al., 1986). Une étude assez récente ayant utilisé la technique de l'oxydation de l'ABTS\* a montré que *P. sajour-caju* avait une activité ligninolytique évidente mais que cette activité était relativement faible par rapport à *P. chrysosporium* lorsqu'elle était mesurée en terme d'activités LiP et de MnP évaluées par la méthode de décoloration de divers colorants (Chahal et al., 1995).

Malgré cette faible activité LiP et MnP, *P. sajor-caju* a montré dans une autre étude une très grande aptitude à dépolymeriser la lignine en oligolignols de faible poids moléculaire (Chahal et Hachey, 1990).

## **2.6. Les ligninases et leur rôle dans la biodégradation des composés toxiques**

La dégradation des composés aromatiques par les champignons à moisissure blanche a été observée depuis plus de trente ans (Lyr, 1963). Mais, ce n'est que relativement récemment que la relation entre cette habileté à dégrader les toxiques et le métabolisme ligninolytique a été établie, lorsque de nombreux chercheurs ont démontré que le Basidiomycète *P. Chrysosporium* dégradait le DDT, les benzo[a]pyrènes, de nombreux insecticides alkylhalogénés, les biphényles polychlorés etc..., sous des conditions de cultures favorisant l'expression du métabolisme ligninolytique ( Arjmand et Sander mann, 1985; Bumpus et al., 1985; Eaton, 1985; Huynh et al., 1985; Bumpus et Aust, 1987a; Kennedy et al., 1990). Dans certains cas, une très importante minéralisation du polluant a été observée. Il a été aussi établi que cette capacité de dégradation des organopolluants par *P. Chrysosporium* était très étroitement liée à l'activité ligninolytique en culture, ces deux processus dépendant du métabolisme secondaire qui est lui même induit par l'épuisement des

nutriments dans le milieu de culture et à l'arrêt de la croissance cellulaire. Il existe cependant des exceptions, certes encore inexpliquées, à cette observation, ainsi que de nombreuses situations dans lesquelles le métabolisme secondaire est nécessaire mais où aucune enzyme ligninolytique n'est impliquée (Gibson and Subramanian, 1984; Bumpus and Aust, 1987b; Kennedy et al., 1990). En général, les Eucaryotes ne dégradent pas certains organopolluants comme les HAPs mais plutôt les métabolisent en utilisant des systèmes bien décrits de monooxygénases qui les transforment en métabolites hydroxyles pouvant être directement excrétés ou en conjugués avec plus de molécules polaires (Gibson and Subramanian, 1984). L'hydroxylation et l'excrétion sont les deux mécanismes standards de détoxification des xénobiotiques par les Eucaryotes et la plupart des champignons utilisent le même mécanisme. C'est Haemmerli et collaborateurs qui, en 1986, ont montré l'implication du système ligninolytique des champignons à moisissure blanche dans la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), en utilisant la LiP purifiée. Le benzo[a]pyrène s'est ainsi avéré un substrat des LiPs et donc considérées comme participant à la dégradation de cet organopolluant. En 1963, il a été démontré en Allemagne, que *Trametes versicolor*, un champignon à moisissure blanche, était capable de déchlorer des phénols polychlorés en produits non spécifiés (Lyr, 1963).

D'autres travaux (Huynh et al., 1985) ont confirmé que les champignons à moisissure blanche dégradent une très grande variété de phénols chlorés dont certains sont formés lors du blanchiment de la pulpe du bois par le chlore. *P. chrysosporium* par exemple, dégrade de nombreux toxiques provenant des effluents de traitement des usines de blanchiment de la pulpe de bois tels que le 2, 4, 6 trichlorophénol, différents guaiacols polychlorés et de nombreux vanillines polychlorés. D'autres études ont confirmé que cette aptitude à dégrader les xénobiotiques des champignons à moisissure blanche provient de leur système ligninolytique. Le temps nécessaire à l'initiation de la dégradation, le temps nécessaire à la dégradation complète et la diminution du taux de minéralisation de ces toxiques étaient identiques à ceux de la lignine marquée au  $^{14}\text{C}$  dans les milieux de culture à nutriments et azote limitant. Une autre preuve de l'implication des ligninases dans la biodégradation des organopolluants a été donnée par l'utilisation de la LiP purifiée pour dégrader un grand nombre de polluants *in vitro* (Haemmerli et al., 1986; Hammel et Tardone, 1988; Mileski et al., 1988; Valli et Gold, 1991).

### **3. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **3.1. MATÉRIELS**

#### **3.1.1. Microorganismes**

Notre étude a porté sur deux microorganismes reconnus pour leur aptitude à produire des enzymes appelées ligninases. Ce sont des champignons appartenant à la classe des Basidiomycètes. Il s'agissait en l'occurrence de *P. chrysosporium* ATCC 24725 et de *Pleurotus sajor-caju* NRRL 18757. Les cultures de ces deux microorganismes ont été maintenues sur un milieu solide à base d'agarose (2 %) et de paille de blé délignifiée (2 %), contenu dans des vases de Pétri. Les cultures ont été repiquées mensuellement pour en conserver la fraîcheur. Les températures d'incubation pour la croissance des cultures étaient respectivement de 30° C pour *P. sajor-caju* et 35° C pour *Phanerochaete chrysosporium* . La température d'entreposage des deux champignons était de 4°C.

#### **3.1.2. Milieux de culture**

##### **3.1.2.1. Milieu liquide**

Le milieu liquide utilisé pour les deux microorganismes était celui de Mandels et Webber (Mandels et Weber, 1969.) dont la composition est la

suivante pour 1L d'eau distillée:

Glucose	-----	10 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	-----	2.0 g
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	-----	1.4 g
Urée	-----	0.30g
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	-----	0.30g
$\text{CaCl}_2$	-----	0.30g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	-----	5.0mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	-----	1.40mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	-----	3.67mg
Extrait de levure	-----	0.50 g

Le pH du milieu est ajusté en fonction du microorganisme.

#### **3.1.2.2. Milieu solide**

Le milieu solide utilisé avait la même composition que le milieu liquide à la différence qu'il a été solidifié par l'ajout d'agarose à 2 %.

#### **3.1.3. Substrat à dégrader et autres produits chimiques**

Le phénol était le substrat à dégrader, il provenait de Fisher Scientifique, New Jersey (USA) et avait une pureté de 99 %. Tous les autres produits chimiques utilisés étaient de qualité réactif.

#### **3.1.4. Matériels d'incubation**

Les cultures ont été incubées dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml de volume. L'incubateur utilisé est l'incubateur agitateur fourni par New Brunswick Co. Sa vitesse de rotation se situe entre 0 et 500 tours par minute (tpm) et sa marge de température est de 0 à 100° C.

#### **3.1.5. Dessiccateur sous vide**

C'est un dessiccateur résistant aux produits chimiques, il se compose de deux parties: une partie supérieure transparente, en polycarbonate et une partie inférieure en polypropylène contenant du diérite (8 mailles) pour adsorber l'humidité ambiante.

### **3.1.6. Broyeur Sonic dismembrator**

Ce broyeur sert à l'écrasement du mycélium grâce aux ultrasons, il provient de la compagnie Quigley-Rochester, Inc.

### **3.1.7. Appareils**

- **Chromatographe liquide à haute performance (CLHP)**

De marque Waters (Mississauga, Ontario)

**Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectrophotomètre de masse (GC-MS), de marque Varian, modèle 3500**

- **Four à 80° C** pour la détermination du poids sec de la biomasse
- **Balance analytique** pour les différentes pesées
- **Hotte laminaire** avec lampe à U.V. pour les manipulations sous conditions stériles.

## **3.2.. MÉTHODES**

### **3.2.1. Identification et vérification de la pureté des cultures**

Les cultures sont identifiées au microscope avant chaque manipulation pour s'assurer que les expériences se font avec la bonne souche. La pureté des souches a été vérifiée aussi par repiquage sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA).

### **3.2.2. Stérilisation des milieux de culture**

Les milieux de culture ( solide et liquide ) ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 30 minutes. Les milieux liquides sont répartis par portions de 100 ml dans des Erlenmeyer de 250 ml de capacité.

### **3.2.3. Ajout du phénol aux milieux de culture**

Une solution stock de phénol a été préparée et stérilisée par filtration à travers un filtre Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  de diamètre. Dans le cas de milieux solides, le phénol est ajouté aseptiquement au milieu stérilisé encore liquide pour obtenir la concentration voulue puis coulé dans les Pétri. En ce qui concerne le milieu liquide, après stérilisation, le phénol est ajouté aseptiquement aux flacons contenant le milieu de culture pour obtenir la concentration voulue. Il y a eu cependant des conditions dans lesquelles le

phénol a été ajouté au milieu liquide après un certain nombre de jours d'incubation du mycélium, ces conditions seront spécifiées en temps opportun, plus loin.

#### **3.2.4. Préparation du préinoculum**

À partir des Pétri sur lesquels il y a eu croissance du mycélium avec ou sans production de spores, nous avons découpé 5 pièces de gélose d'à peu près 0.5 cm de diamètre chacune, à l'extrémité de la zone de croissance du mycélium ( à ce niveau, la culture est plus fraîche ) tout en faisant attention d'éviter le rebord du Pétri où les risques de contamination sont plus élevés. Au préalable, nous avons fait stériliser le milieu de Mandels contenu dans les Erlenmeyer de 250 ml de capacité mais ne contenant que 100 ml de milieu de culture. Le pH est ajusté en fonction du microorganisme. Les 5 pièces de gélose avec mycélium et/ou spores sont introduites dans les milieux de culture et incubées pendant 3 à 4 jours.

#### **3.2.5. Préparation de l'inoculum**

Après 1 à 2 jours d'incubation, le préinoculum qui se présente sous la forme de pelotes blanchâtres, subit un broyage dans un broyeur à très haute vitesse pendant 30 secondes. A l'aide de pipettes stériles de 10 ml, de nouveaux flacons contenant chacun 100 ml de milieu liquide de Mandels

stérile sont ensemencés (10% v/v). Les cultures ont ensuite été incubées pendant 48 heures. On obtenait ainsi l'inoculum prêt à ensemercer les milieux de culture.

### **3.2.6. Ensemencement des milieux de culture**

Le pourcentage d'inoculation des milieux liquides était de 10 % , v/v. Après ensemencement, une certaine portion de l'inoculum est destinée à vérifier s'il n'y a pas eu de contamination. Pour ce faire, nous ensemencions le milieu PDA. Une partie de l'inoculum était aussi destinée à déterminer le poids sec de la biomasse de l'inoculum.

### **3.2.7. Mesure de l'extension mycéliale**

L'objectif de cette mesure était de déterminer le seuil de tolérance des deux microorganismes au phénol sur milieu solide. Elle a consisté au découpage de pièces de 0.5 cm à partir de la gélose sur laquelle il y a eu croissance du mycélium. Cette pièce était déposée au centre du Pétri avec différentes concentrations de phénol. Chaque concentration était en triplicata avec témoin abiotique et témoin sans phénol. Nous avons ensuite fait une mesure quotidienne de l'extension mycéliale à l'aide d'une règle graduée dans les deux directions perpendiculaires. L'extension mycéliale quotidienne moyenne était donc la moyenne de l'extension dans ces deux directions. Après

7 jours d'incubation, si l'extension mycéliale était comprise entre 0.5 et 2.5 cm, nous concluons que le microorganisme ne tolérait pas la concentration de phénol correspondante. Par contre, si pour la même période, elle était entre 2.5 cm et 5 cm, la tolérance était considérée comme moyenne et finalement lorsqu'elle était  $\geq 5$ cm, elle était considérée comme bonne.

### **3.2.8. Mesure du poids sec de la biomasse**

L'objectif de cette mesure était de déterminer d'une part le seuil de tolérance au phénol en milieu liquide des microorganismes étudiés et d'autre part d'établir une certaine corrélation entre leur aptitude et leur performance de dégradation du phénol et leur croissance. Dans le cas présent, le seuil de tolérance à une concentration donnée est définie comme étant la concentration à laquelle le poids sec de la biomasse est soit inférieure à 2.5 g/L après une semaine d'incubation soit constant à  $\pm 5\%$  pendant 3 jours consécutifs. Dans un premier temps, il a fallu déterminer le poids sec du papier filtre Wattman # 4 en l'introduisant dans un four à 80 °C pendant 4 à 8 heures. Le papier filtre est placé dans le dessiccateur sous vide pendant 10 minutes, pour éviter qu'il n'adsorbe l'humidité ambiante. Le papier filtre est ensuite pesé trois fois jusqu'à ce que la mesure soit constante à  $\pm 5\%$ , ce qui nous a donné le poids du papier filtre. L'échantillon (mycélium contenu dans 100 ml de milieu de

culture) a ensuite été filtré , placé dans le four à 80 ° C pendant 24 heures pour la dessiccation et finalement pesé. Le poids ainsi obtenu ôté de celui du papier filtre donne le poids sec de la biomasse.

### **3.2.9. Dosage quantitatif du phénol**

#### **3.2.9.1. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)**

Notre étude a utilisé un appareil de marque Waters (Mississauga, Ontario), muni de deux pompes modèle 510, d'un spectrophotomètre ( $\lambda_{\text{max}}$ ) Modèle 481 et d'un injecteur automatique Millipore modèle 717 plus. Le système était sous contrôle d'un ordinateur NEC Power Mate 2 , modèle APC IV, muni du logiciel chromatography Workstation, version 3.30. Une colonne Nova-pak C-18, 60 Å , 4  $\mu\text{m}$ , 3.9 mm X 1.5 mm a été utilisée. Le système utilisait le principe du gradient linéaire. Il y avait donc deux phases mobiles préparées et dégazées sous vide pendant 10 minutes. La phase A était composée d'eau et d'acide acétique dans les proportions suivantes : 100 : 0.1 la phase B était composée d'acétonitrile et d'acide acétique dans les proportions de 100 : 0.1. Au temps 0, la colonne contient 70% de la phase A et 30% de la phase B, le débit était de 2.0 ml/min pour toute la durée du programme qui était de 7 min. Au total de  $t_0$  à  $t = 4$  min, la phase A est ramenée à 45% et la phase B à 55%, ce qui permet de diminuer

l'hydrophobicité du phénol et donc de favoriser son élution. Ce rapport entre les deux phases est maintenu jusqu'à  $t = 7$  min. À la fin de ces 7 min, le programme rééquilibre la colonne dans les conditions initiales. La concentration du phénol a été évaluée par son absorbance à 220 nm (détecteur U.V. modèle 401). Une courbe d'étalonnage a été établie pour le phénol.

#### **3.2.9.1.1. Préparation des échantillons**

Les échantillons ont été préparés de telle sorte qu'ils restent dans les valeurs de la courbe d'étalonnage établie. La dilution de l'échantillon s'est faite avec une solution ayant la même composition que la phase A. Nous avons pris 50  $\mu$ l d'échantillon pour 950  $\mu$ l de phase A ( 1 : 19 ), ce qui équivalait à une dilution de 1/20. L'extraction du phénol s'est effectuée de la façon suivante: à 1 ml d'échantillon, on a ajouté 0.5 ml d'acétonitrile 100% contenant 0.33 % d'acide acétique glacial. Le mélange est ensuite agité au vortex puis centrifugé 10 min à 13.000 tpm. Nous avons prélevé 1.2 ml de cette préparation pour le dosage du phénol par injection au CLHP.

### **3.2.10. Identification des produits de la dégradation du phénol**

#### **3.2.10.1. Chromatographie en phase gazeuse et spectrophotométrie de masse (CG-MS)**

Nous nous sommes intéressé à rechercher le ou les produits de la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*. Pour cela, nous avons utilisé la chromatographie en phase gazeuse (CG) qui nous a révélé la présence d'un composé métatoluique que nous avons ensuite identifié par spectrophotométrie de masse (SM) comme étant le pyrocatechol. Le chromatographe était de marque Varian, modèle 3500 avec une colonne capillaire de type DBS (5% phényl, 95% méthyl de silicone). La longueur de la colonne est de 30 m et son diamètre interne de 0.2 mm. Le gaz vecteur était l'hélium et avait un débit de 24 ml/min à 70 °C au début. Le détecteur utilisé était à ionisation de flamme (FID).

##### **3.2.10.1.1. Extraction du phénol**

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 ml d'échantillon, 1 ml d'éthyl éther (éthoxyéthane), 100  $\mu$ l de standard interne (mélange de propyl et de méthyl parabène) et 2 gouttes de HCl concentré. Ce mélange est agité au Vortex puis centrifugé à 10.000 tpm pendant 1 minute. Le mélange se divise en deux phases bien distinctes. la phase inférieure dite aqueuse et la phase

supérieure dite organique qui renferme l'éther et le phénol. Un certain volume de ce surnageant est prélevé et passé successivement dans deux fioles coniques de 2 ml renfermant du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre. Cette opération permet au  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  d'éliminer par adsorption toute trace d'eau qui se serait retrouvée malencontreusement dans la phase organique. Le contenu de la fiole nous servait de solution stock que nous conservions pour d'éventuelles vérifications ou reprises d'analyses.

#### **3.2.10.1.2. Silylation du phénol**

Elle a été faite en prélevant 120  $\mu\text{l}$  de la solution stock à laquelle fut ajouté 30  $\mu\text{l}$  de bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA 5%, Pierce, Rockford, É.U) et finalement, cette préparation a été placée au four 70°C pendant 30 min. , pour que la réaction d'acétylation ait lieu. Après la silylation, nous avons injecté 1  $\mu\text{l}$  dans le chromatographe. Ce dernier était relié à un spectrophotomètre de masse de type ionique (Finigan Mat, modèle 700). Notre intermédiaire de dégradation a été identifié en comparant son spectre de masse à celui du composé suspecté.

#### **3.2.11. Détermination de l'adsorption mycéliale**

Le but de cette opération était de déterminer la proportion de phénol adsorbée sur le mycélium afin de corriger nos résultats. Nous avons pour cela

cultivé trois séries de cinq échantillons de chaque microorganisme pendant 3, 4, 5, 6, et 7 jours. Les échantillons en triplicata ont ensuite été filtrés sur du papier Wattman # 4, lavés deux fois à l'eau déionisée et resuspendues dans 100 ml de milieu de Mandel. Les échantillons des séries avaient la composition suivante pour 100 ml de milieu Mandel :

- série 1 : microorganisme + 200 ppm de phénol + 40 ppm  $\text{HgCl}_2$  ( cette série subit un écrasement aux ultrasons)
- série 2 : microorganisme + 200 ppm de phénol + 40 ppm  $\text{HgCl}_2$  (cette série ne subit pas d'écrasement aux ultrasons)
- série 3 : témoin abiotique : 200 ppm de phénol+ 40 ppm  $\text{HgCl}_2$

Les échantillons de la première série sont écrasés aux ultrasons après 4 heures de temps d'incubation et soumis au dosage du phénol par HPLC, ceux de la deuxième série sont soumis au même dosage sans subir d'écrasement aux ultrasons . La quantité de phénol dans la série 1 étant  $x_2$  , celle de la série 2 ,  $x_1$  et celle de la série 3, Q, on estime que le pourcentage de phénol adsorbé est :

$$P(\%) = (x_2 - x_1) \times 100 / Q. \quad x_2 \text{ (g/L)} \quad , \quad x_1 \text{ (g/L)} \quad , \quad Q \text{ (g/L)}$$

### **3.2.11.1. Écrasement du mycélium aux ultrasons**

L'échantillon est placé dans un flacon enfoncé dans de la glace pour éviter que le surchauffement induit par la sonde ne brise le flacon. La sonde est introduite dans le flacon et soumise à une puissance de 90 Watts pendant 1 heure. À chaque 10 minutes, l'échantillon est observé au microscope pour vérifier l'état d'écrasement du mycélium. L'écrasement est considérée complète lorsque le microscope révèle un milieu parfaitement homogène, exempt de tout trace de mycélium.

### **3.2.13. Adaptation des microorganismes au phénol**

Elle a été faite sur milieu solide selon la méthode décrite par Cserjesi et Roff, 1967). Le milieu solide était celui de Mandel à 2% de gélose. La culture a débuté avec 50 ppm de phénol et a été repiquée chaque semaine sur un milieu frais en augmentant de 50% la concentration du phénol par rapport à celle de la semaine précédente. La mesure de l'extension mycéliale quotidienne moyenne était le critère sur lequel nous nous basions pour déterminer la concentration maximale à laquelle le microorganisme pouvait s'adapter.

### **3.2.12. Évaluation de la dégradation du phénol *in vitro***

Nous avons voulu par cette évaluation, connaître le comportement du système enzymatique en l'absence du microorganisme. À cet effet, nous avons fait croître les microorganismes et recueilli le milieu de culture après quelques jours d'incubation d'autant plus que nous ne savions pas exactement à quel moment la production enzymatique était maximale. Des cultures âgées de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 et 21 jours ont été utilisées en triplicata, avec des témoins abiotiques et des témoins sans phénol. Les cultures ont été filtrées stérilement et le filtrat additionné de 200 ppm de phénol avant l'analyse quotidienne par CLHP de la dégradation.

## **4. RÉSULTATS**

## 4. RÉSULTATS

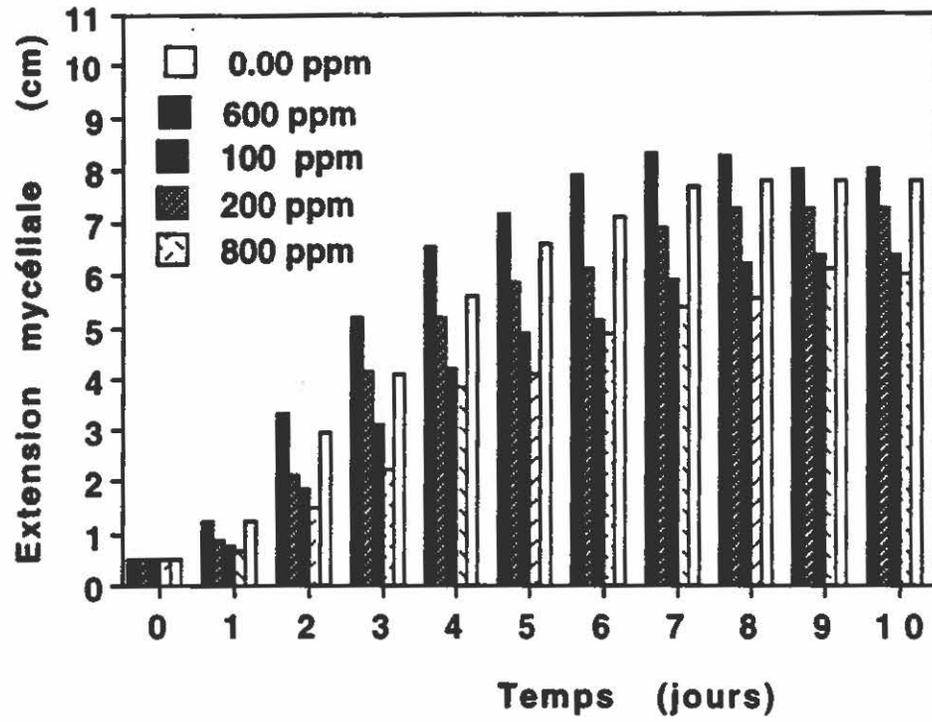
### 4.1. Tolérance des microorganismes au phénol

#### 4.1.1. Évaluation du seuil de tolérance au phénol

Nous avons évalué le seuil de tolérance au phénol sur milieux solide et liquide des deux champignons de notre étude : *P. chrysosporium* et *P. sajor-caju* afin de pouvoir déterminer la concentration maximale de phénol que nous devrions utiliser dans nos expériences. Les deux microorganismes ont supporté des concentrations importantes de phénol sans que celles-ci n'affectent leur croissance mesurée par leur extension mycéliale sur milieu solide (Fig. 1 et 2) et le poids sec de leur biomasse sur milieu liquide (Fig. 3 et 4). Il est apparu que la croissance de *P. sajor-caju* sur milieu solide, fait confirmé également sur milieu liquide, est stimulée par le phénol jusqu'à 100 ppm (Fig. 1 et 3). L'extension mycéliale de *P. chrysosporium* (Fig. 2 ) a été légèrement affectée au-delà de 200 ppm de phénol. Cependant, les deux champignons ont été capables de tolérer jusqu'à 800 ppm mais la concentration maximale à laquelle la croissance était meilleure fut 200 ppm. C'est pour cette raison que la suite des expériences a été faite avec cette concentration.

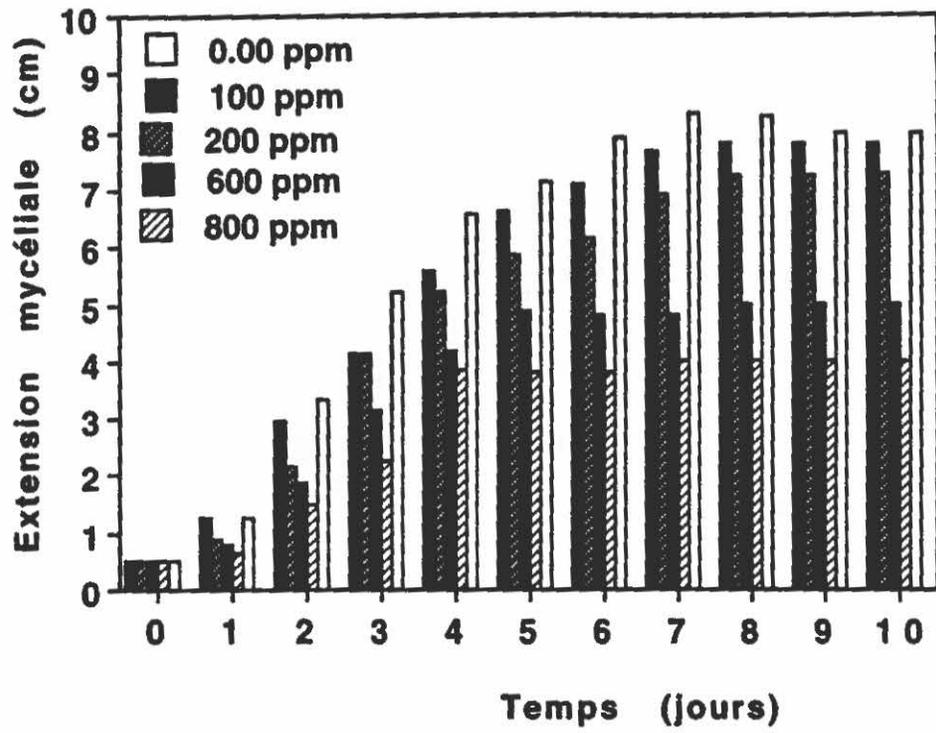
**Figure 1.** Évaluation du seuil de tolérance au phénol de *P. sajor-caju* sur milieu solide

Figure 1



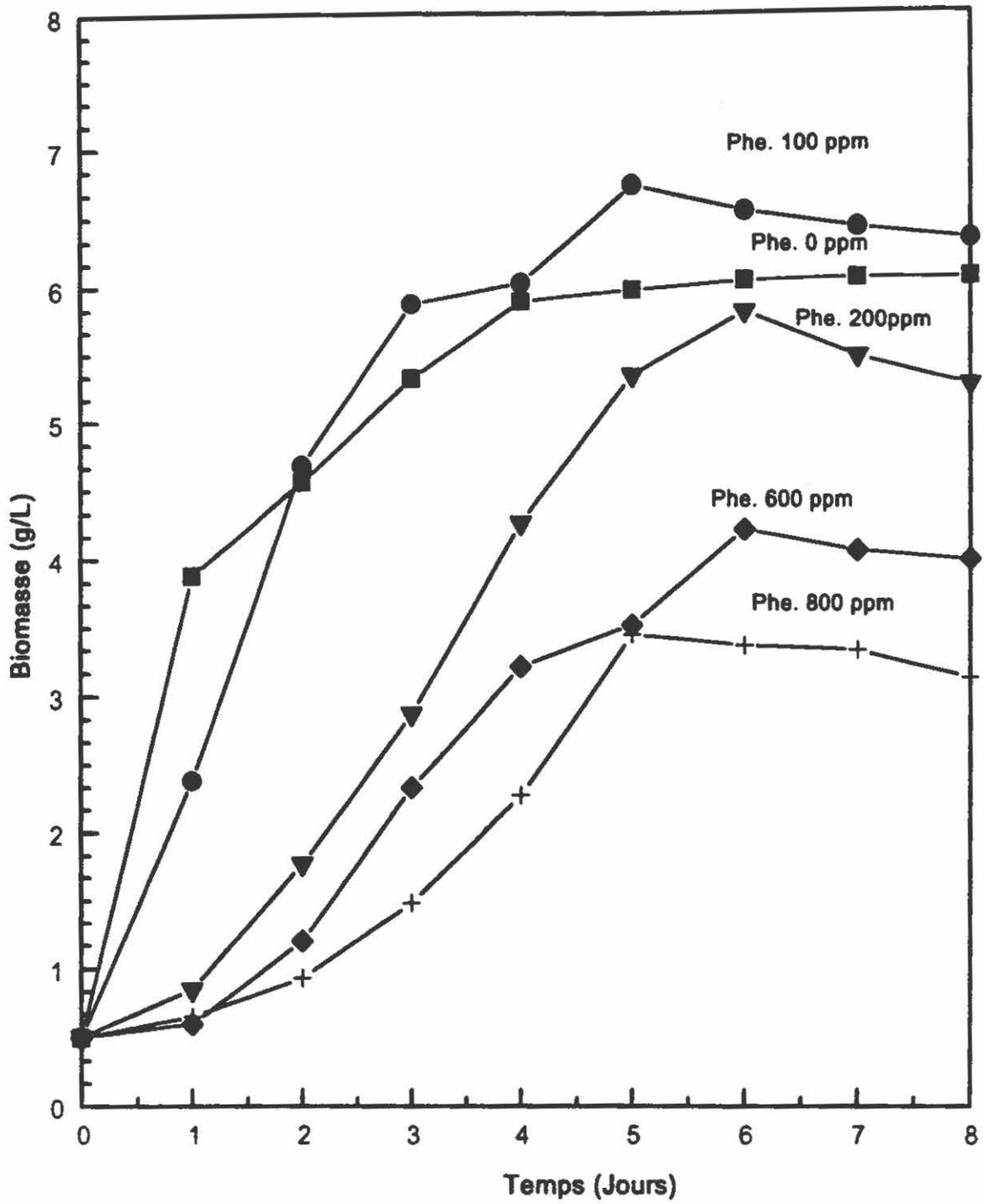
**Figure 2.** Évaluation du seuil de tolérance au phénol de *P. chrysosporium* sur milieu solide

Figure 2



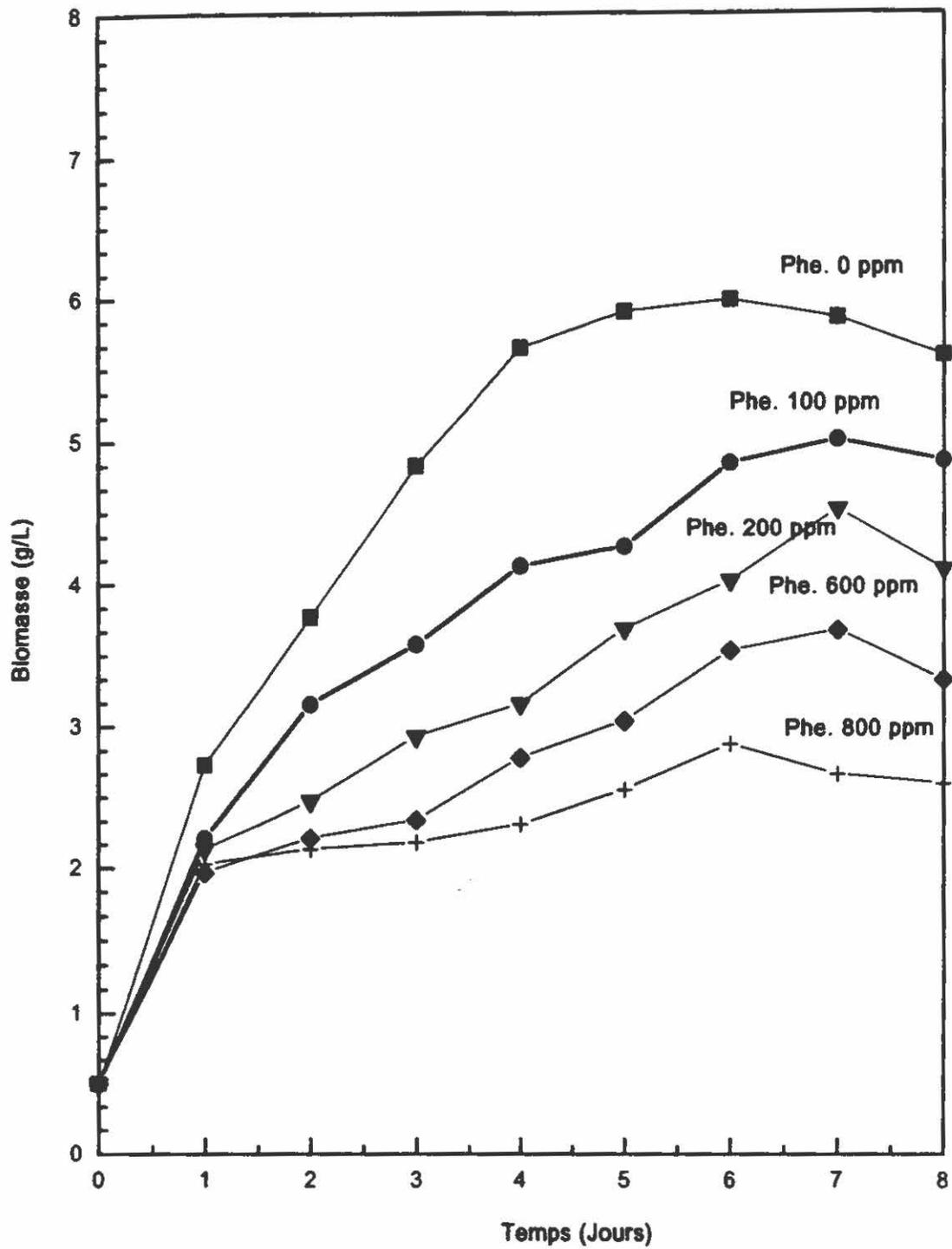
**Figure 3.** Évaluation du seuil de tolérance au phénol de *P. sajor-caju* sur milieu liquide

Figure 3



**Figure 4.** Évaluation du seuil de tolérance au phénol de *P. chrysosporium* sur milieu liquide

Figure 4



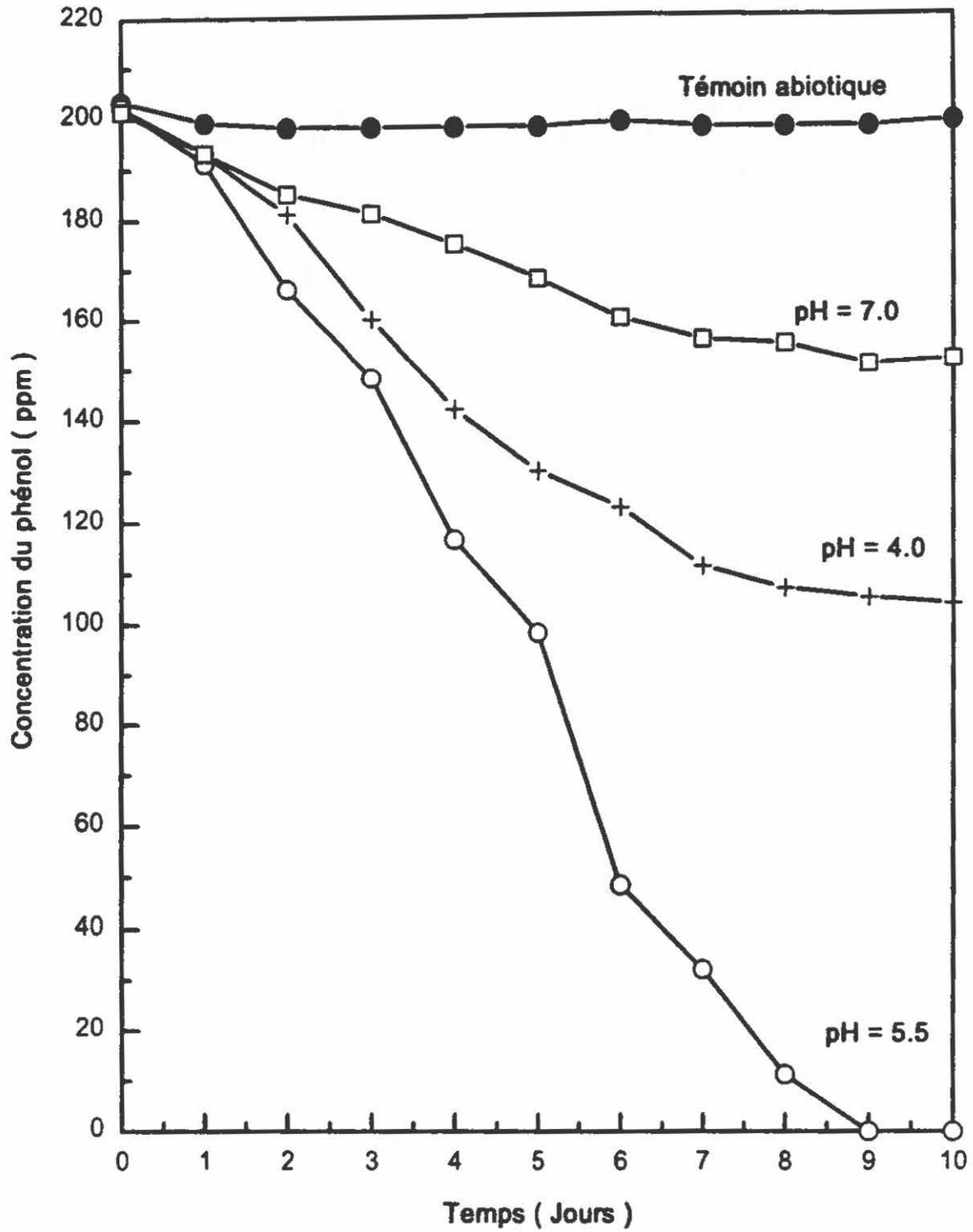
## **4.2. Dégradation du phénol**

### **4.2.1. Effet du pH sur la dégradation du phénol**

Le but de cette expérience était de savoir le pH optimum de la dégradation du phénol par les deux champignons. *P. sajor-caju* a présenté un pH optimum de dégradation à 5.5 (Fig. 5) tandis que le pH optimum de dégradation du phénol pour *P. chrysosporium* était 6.0 (Fig. 6).

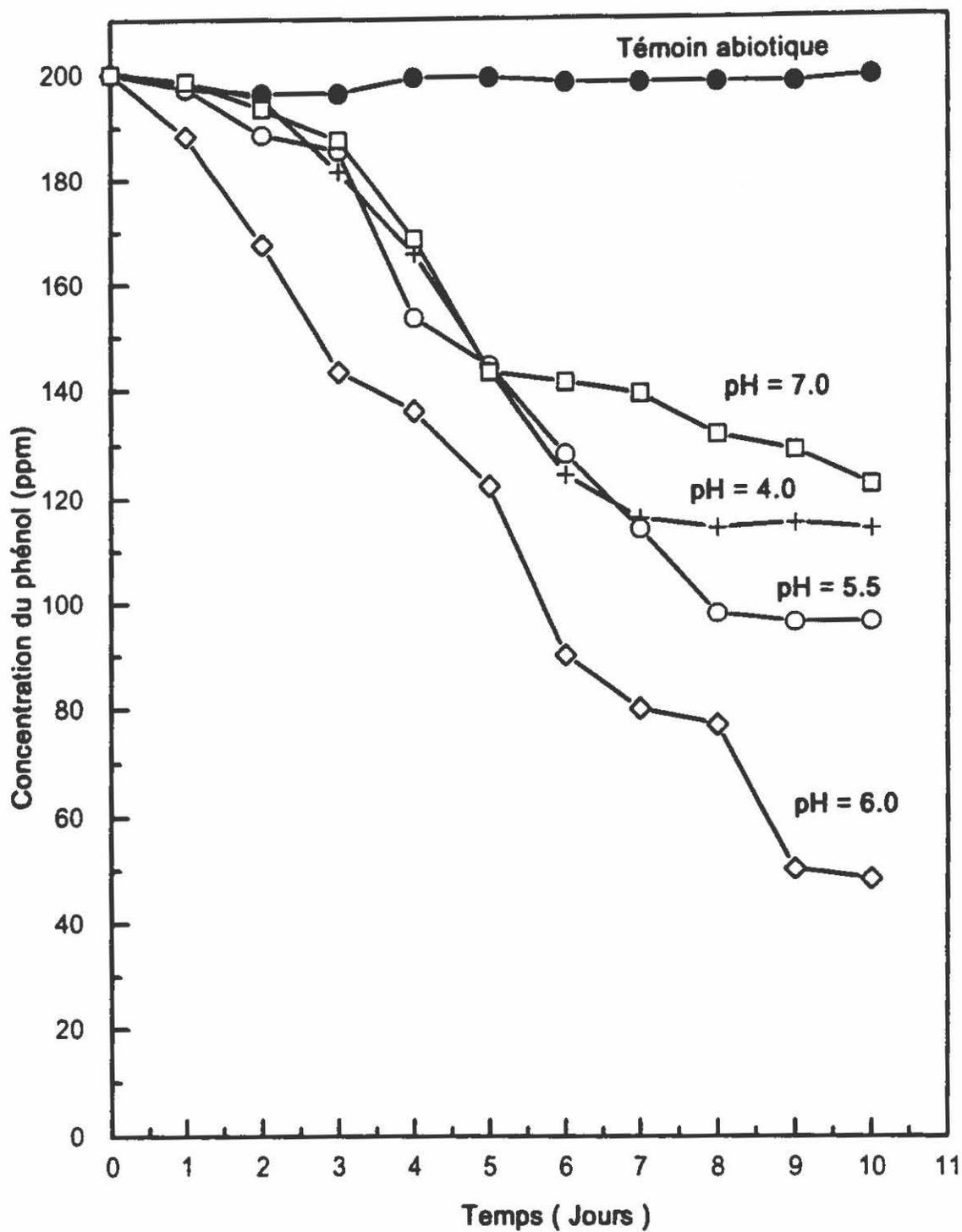
**Figure 5.** Effet du pH sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*.

Figure 5



**Figure 6.** Effet du pH sur la dégradation du phénol par *P. chrysosporium*.

Figure 6

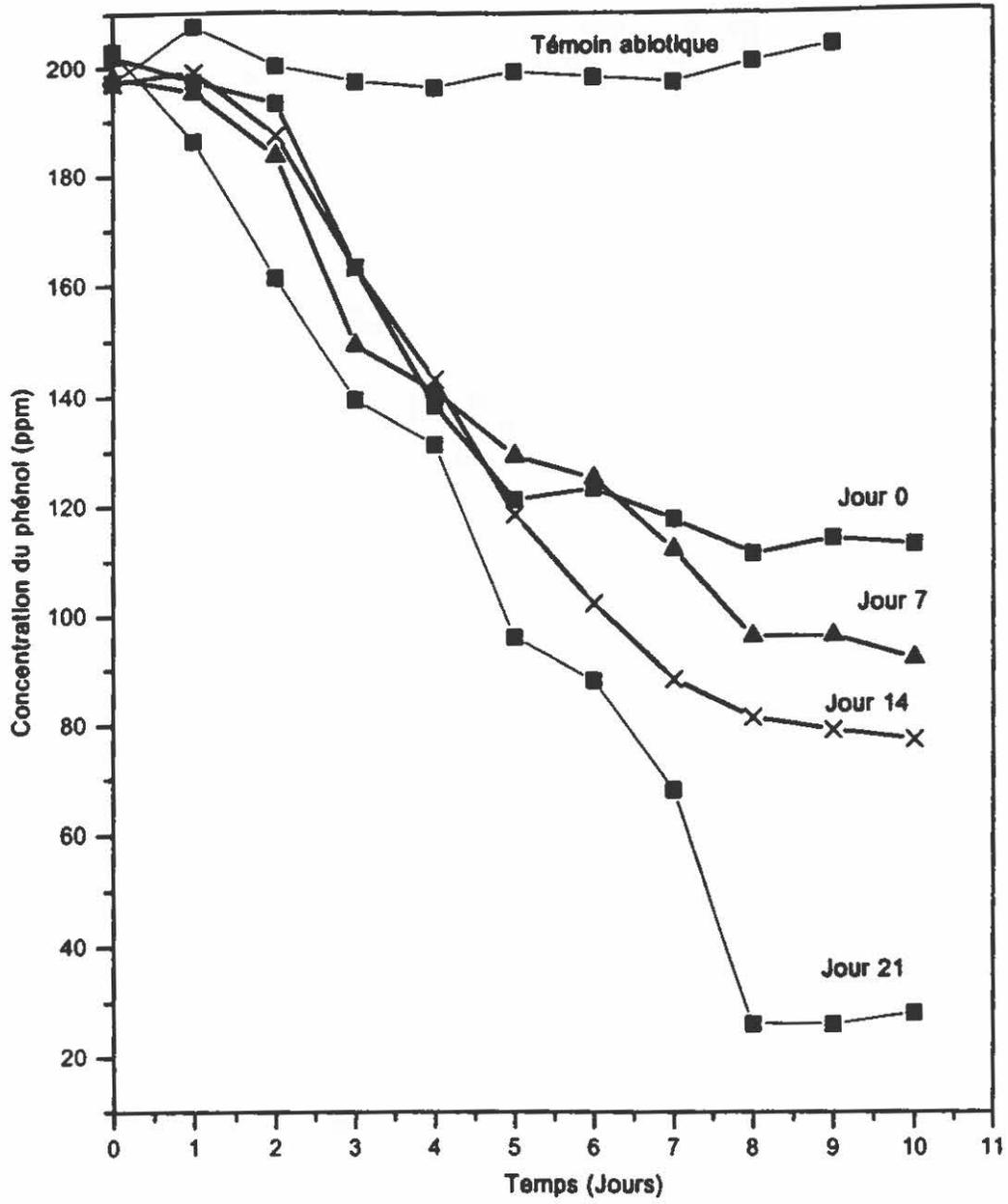


#### **4.2.2. Effet de l'âge de la culture sur la dégradation du phénol**

D'une façon générale, pour *P. chrysosporium* plus la culture était âgée, mieux était la dégradation même si la différence entre les quantités de phénol dégradée n'était pas très grande pour pouvoir tirer une conclusion tranchée. En ce qui concerne *P. sajor-caju*, il a été capable de dégrader plus de phénol lorsque ce dernier a été ajouté au milieu au moment même de l'inoculation, c'est à dire au jour 0 (Fig. 8).

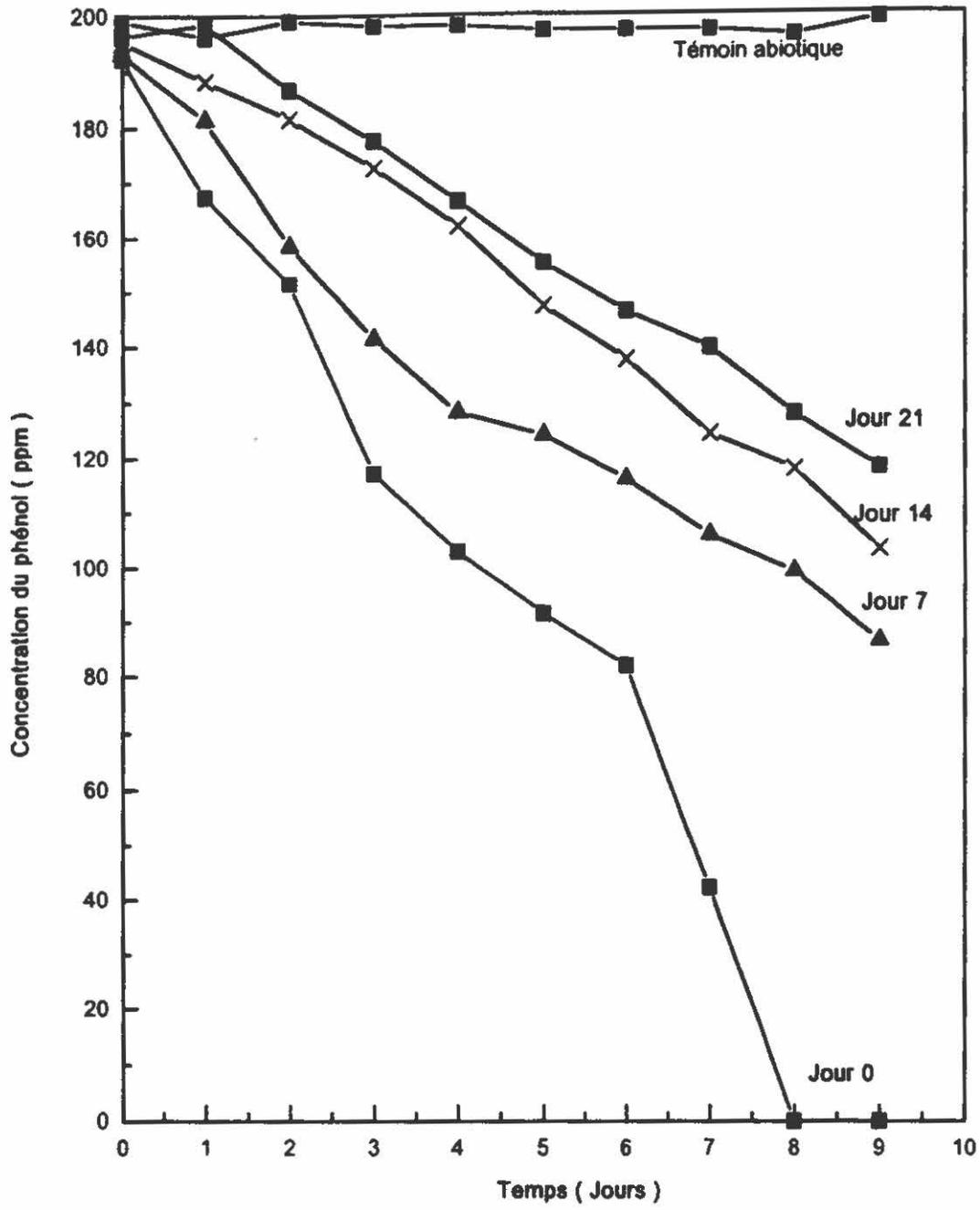
**Figure 7.** Effet de l'age de la culture sur la dégradation du phénol par *P. chrysosporium*.

Figure 7



**Figure 8.** Effet de l'age de la culture sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*.

Figure 8

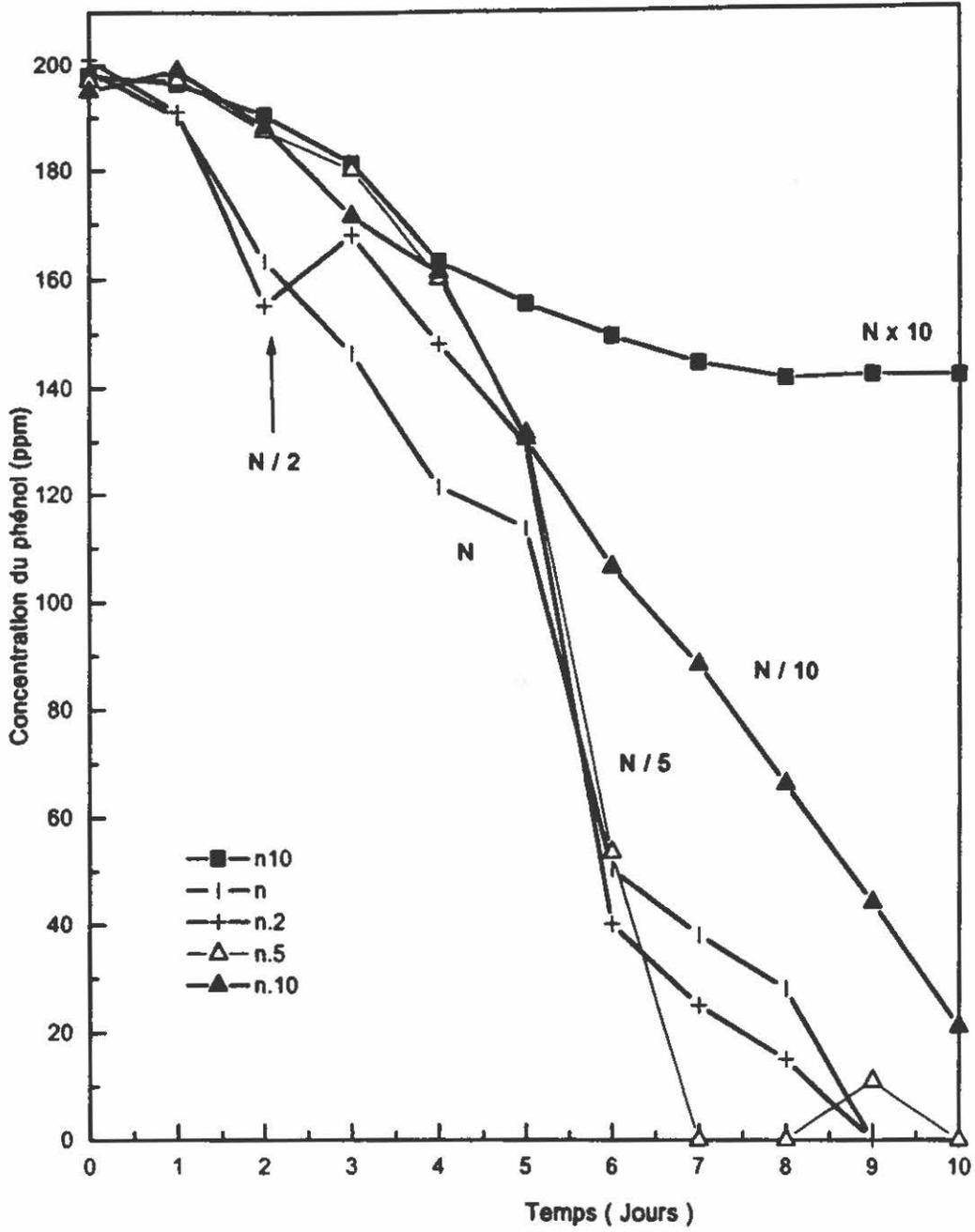


#### 4.2.3. Effet de la concentration en azote sur la dégradation du phénol

Dans notre étude, il s'est avéré que ni le temps nécessaire pour la dégradation totale du phénol, ni la quantité de phénol dégradé par *P. sajor-caju* n'ont été vraiment affectés par la concentration en azote dans le milieu (Fig. 9). Nous avons observé dans ces conditions une dégradation complète 100% du phénol en 7 à 9 jours. Tandis que dans les mêmes conditions, il a fallu près de 11 jours à *P. chrysosporium* pour dégrader 70% du phénol (Fig. 10). Cependant, lorsque la concentration en azote a été 10 fois supérieure à la normale, la dégradation par les deux champignons a été très affectée (moins de 10% de phénol dégradé). De plus, lorsque la concentration en azote était trop faible (N/10), il y a eu très peu de croissance et, en conséquence, il y avait un retard dans la dégradation chez *P. sajor-caju* et une diminution de la quantité de phénol dégradée chez *P. chrysosporium*.

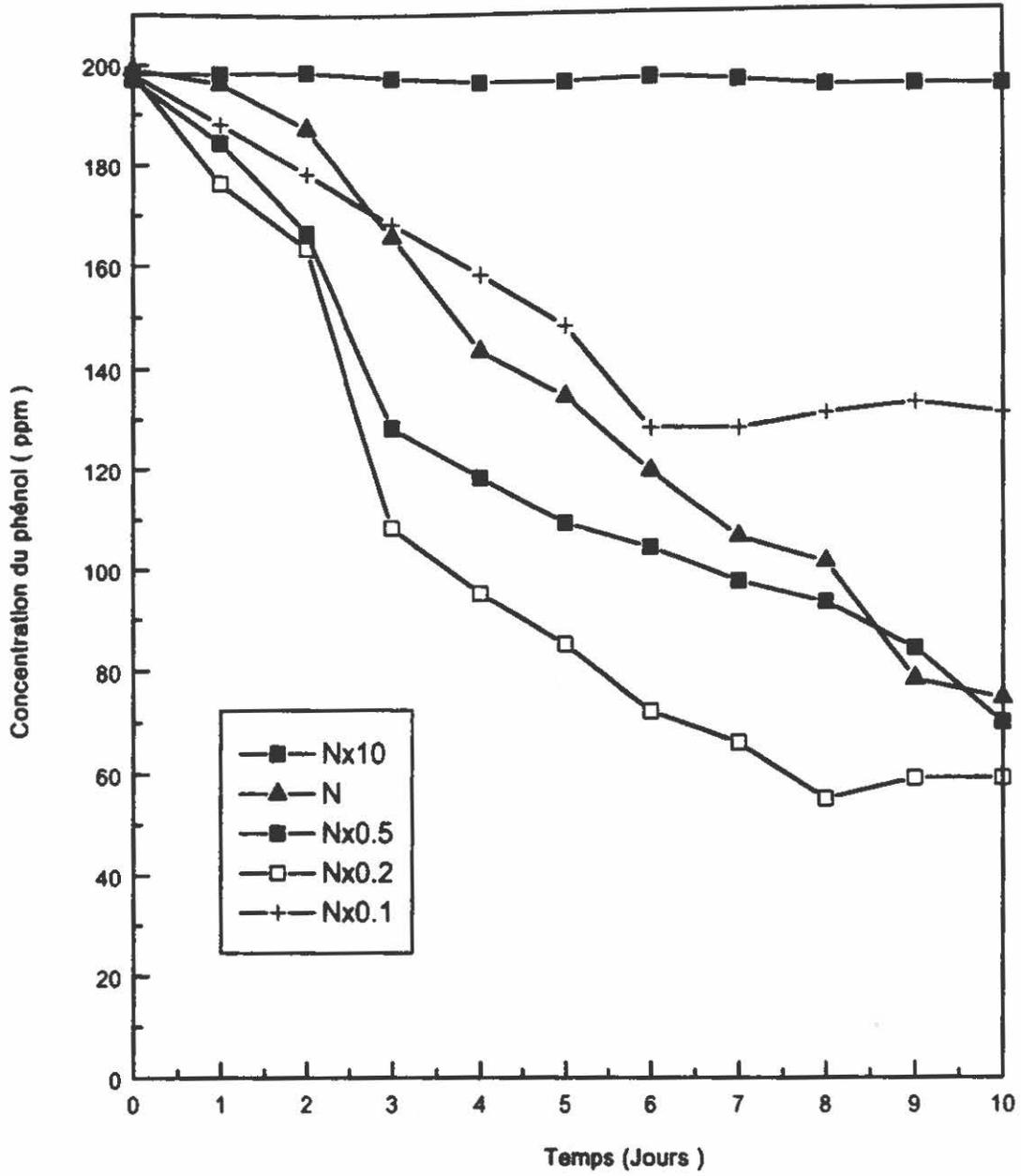
**Figure 9.** Effet de la concentration en azote sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*.

Figure 9



**Figure 10.** Effet de la concentration en azote sur la dégradation du phénol par *P. chrysosporium*.

Figure 10



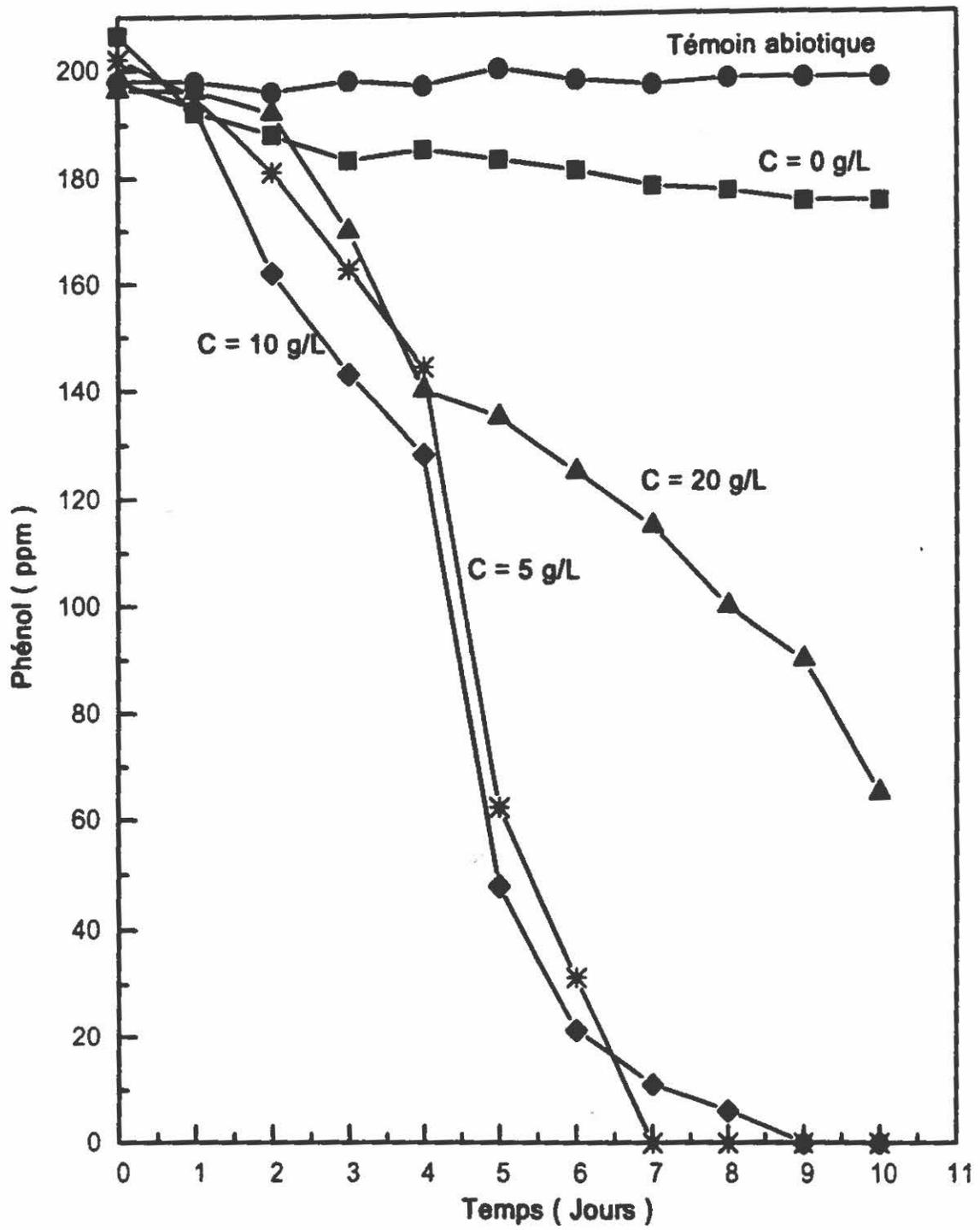
#### 4.2.4. Effet de la concentration en glucose sur la dégradation du phénol

La quantité de phénol dégradée par *P. chrysosporium* était plus importante avec avec 0.5 % de glucose (Fig. 12) qu'avec 1% mais la dégradation était réprimée à partir de 2% de glucose. D'autre part, avec *P. sajor-caju* (Fig. 11), la dégradation était la même que ce soit avec 0.5 %, 1 % ou 2 % de glucose.

.

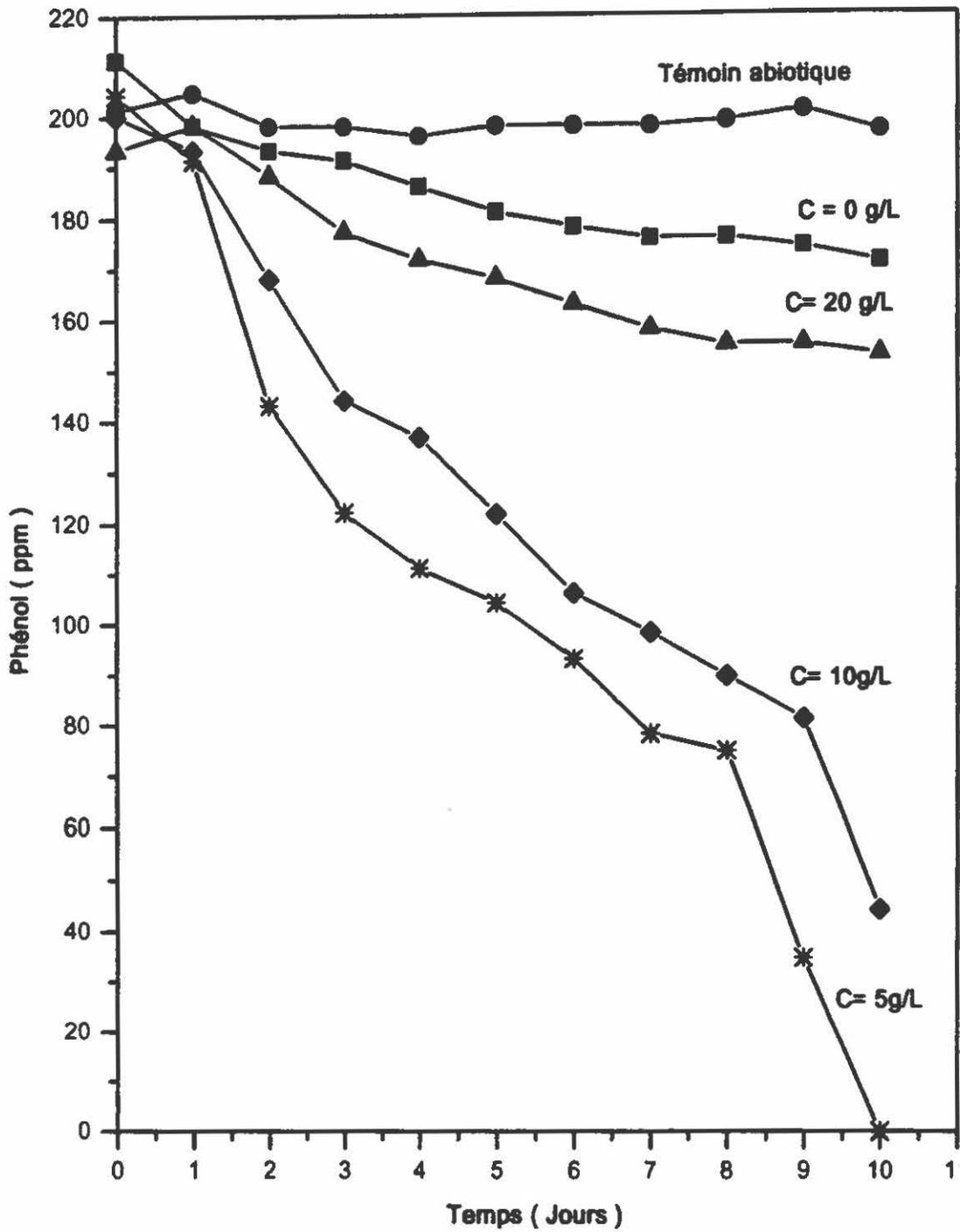
**Figure 11** Effet de la concentration en glucose sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*.

Figure 11



**Figure 12.** Effet de la concentration en glucose sur la dégradation du phénol par *P. chrysosporium*.

Figure 12

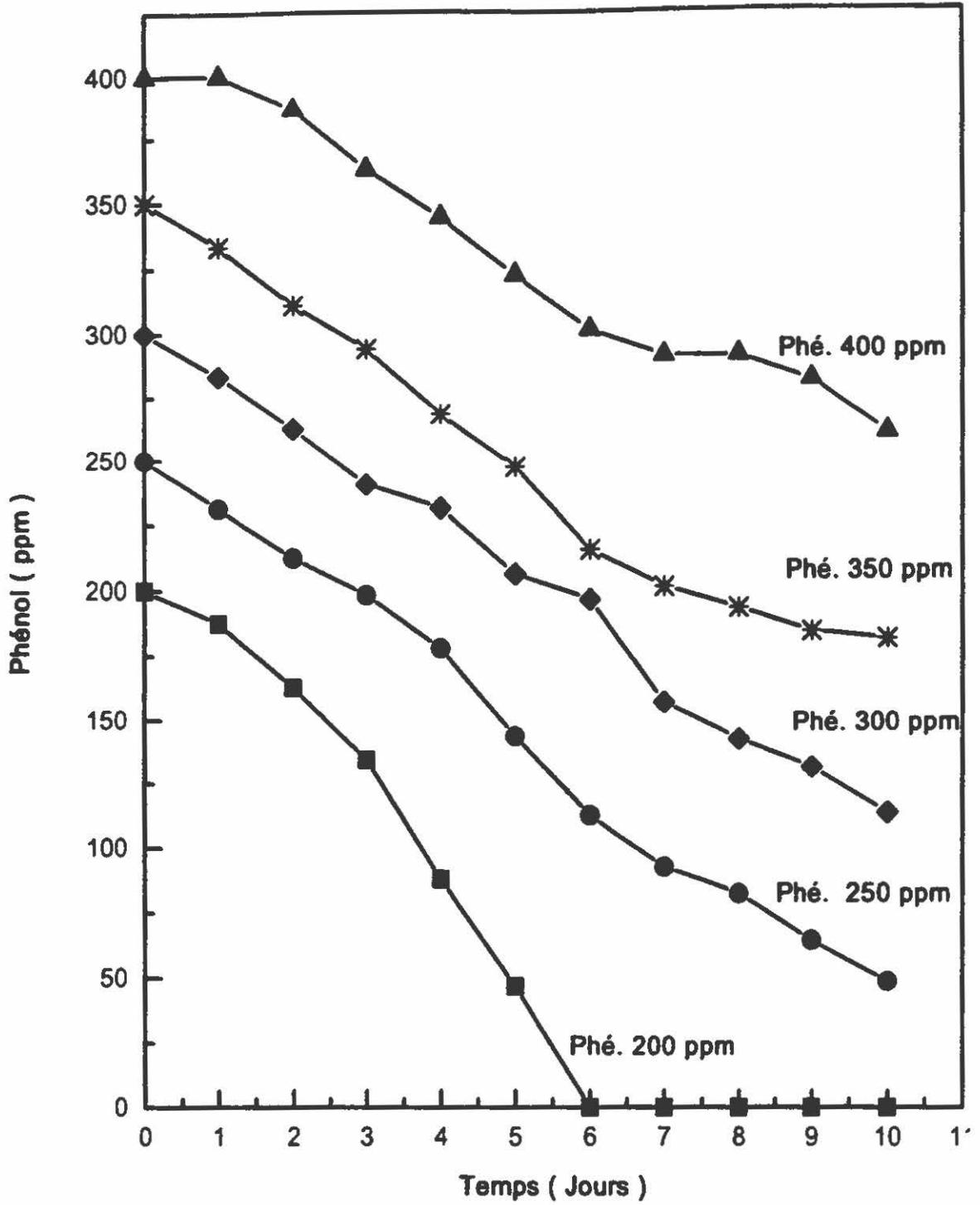


#### **4.2.5. Effet de l'adaptation au phénol sur sa dégradation**

Malgré l'adaptation des deux champignons à de très fortes concentrations de phénol, *P. chrysosporium* (Fig. 14) n'a pu mieux dégrader le phénol par rapport à *P. sajor-caju* (Fig. 13) dont le potentiel de dégradation a été amélioré par l'adaptation au produit toxique.

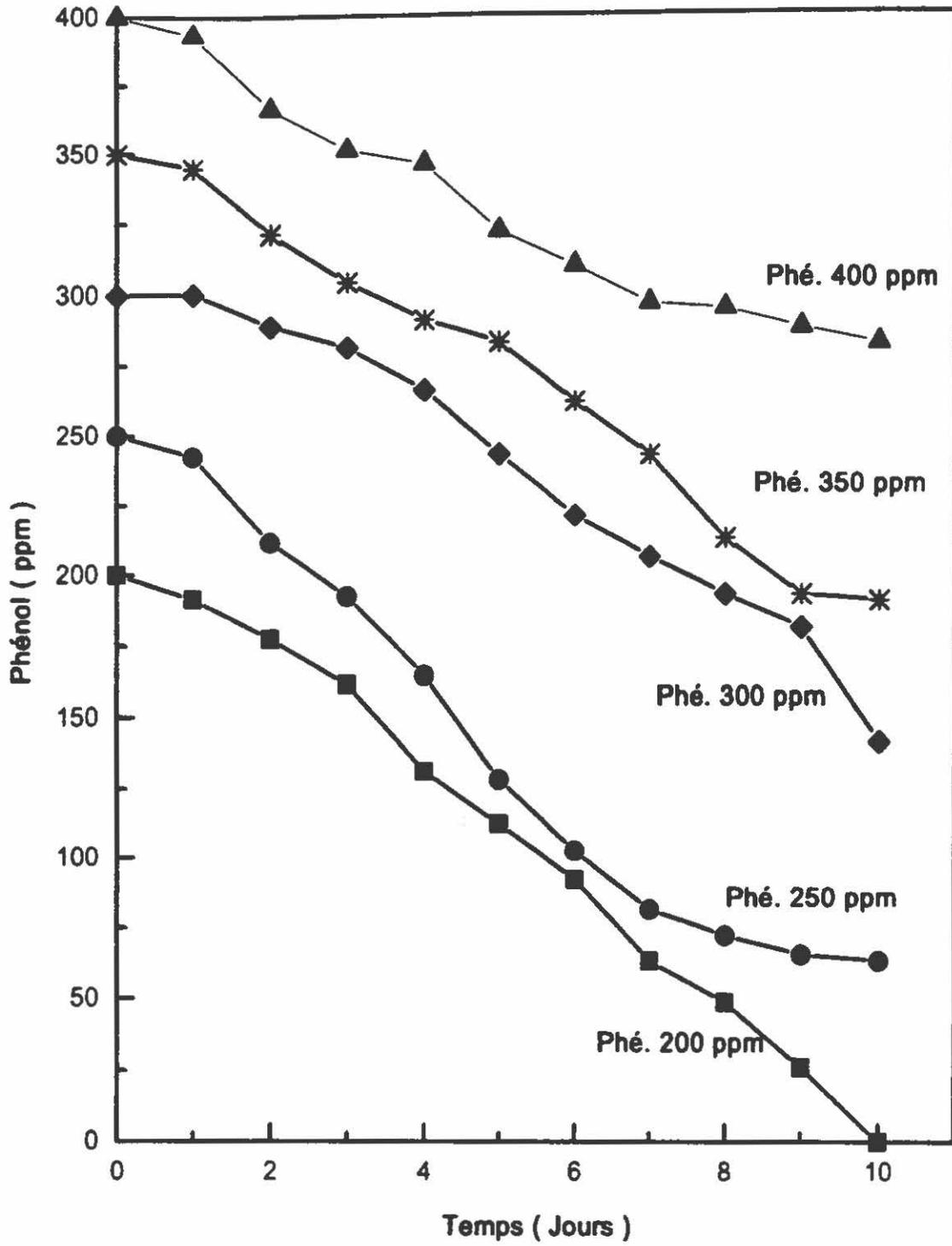
**Figure 13.** Effet de l'adaptation au phénol sur sa dégradation par *P. sajor-caju*.

Figure 13



**Figure 14.** Effet de l'adaptation au phénol sur sa dégradation par *P.chrysosporium*..

Figure 14



#### **4.2.6. Effet de la nature du substrat sur la dégradation du phénol**

Dans cette expérience, nous avons voulu savoir si la dégradation du phénol était aussi bonne ou meilleure sur du glucose que sur d'autres substrats moins dispendieux. Nous avons donc testé différentes sources de carbone: le glucose, la cellulose, la paille de blé délignifiée et le sucrose. Toutes ces sources de carbone ont permis une bonne croissance (Tableau 3) excepté le sucrose.

**Tableau 3.** Effet de la nature du substrat sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju* et *P. chrysosporium*

Espèces	Source de carbone (10g/L)	Concentration du Phenol (ppm)		Biomasse (g/L)	
		Initiale	Finale	Initiale	Finale
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Glucose	201.33	16.25	0.50	5.14
	Cellulose	200.22	11.25	0.53	5.64
	Paille de blé délignifiée	200.88	0.00	0.51	5.81
	Sucrose	202.25	81.34	0.55	3.85
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Glucose	199.45	44.25	0.54	5.54
	Cellulose	203.24	38.54	0.52	5.85
	Paille de blé delignifiée	200.58	24.00	0.55	5.88
	Sucrose	204.55	125.25	0.50	4.58

#### **4.2.7. Effet de la température sur la dégradation du phénol**

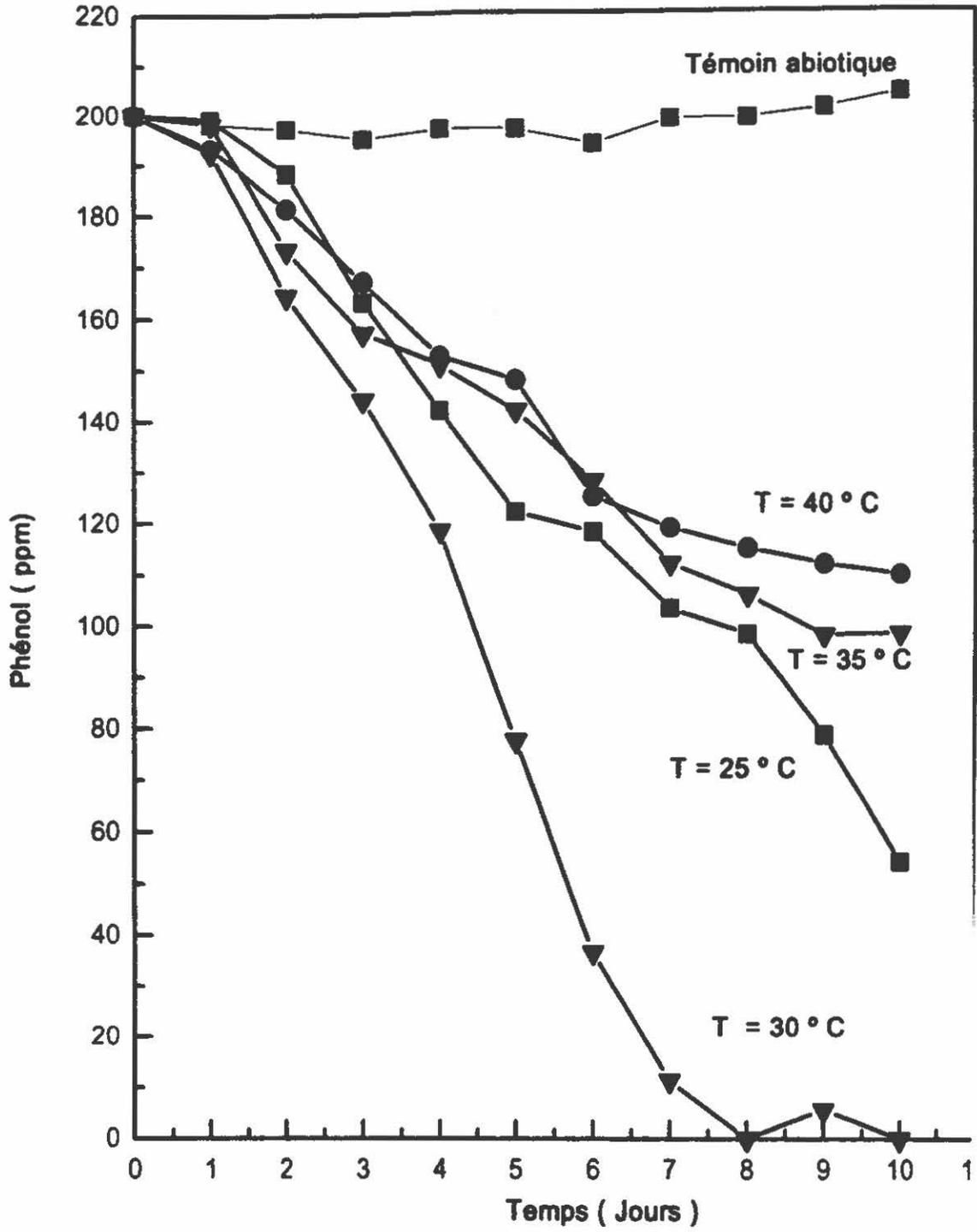
L'objectif de cette partie de notre travail était de trouver la température optimale de dégradation du phénol. Dans le cas de *P. sajor-caju* la meilleure température de dégradation se situait à 30 °C (Fig. 15) tandis que celle de *P. chrysosporium* était de 35 °C (Fig. 16).

#### **4.2.8. Effet de l'agitation sur la dégradation du phénol**

Nous avons voulu par cette expérience, évaluer le potentiel de dégradation du phénol en fonction de la vitesse d'agitation. Nous avons pour ce faire évalué: l'agitation 0 (autrement dit en culture immobile), à 150 tpm (tours par minutes), 200 tpm et 360 tpm. Les deux champignons se sont avérés incapables de dégrader le phénol en culture immobile (0 tpm) et en culture très fortement agitée (360 tpm). La meilleure vitesse d'agitation pour une dégradation optimale du phénol a été 200 tpm pour les deux microorganismes (Fig. 17 et 18).

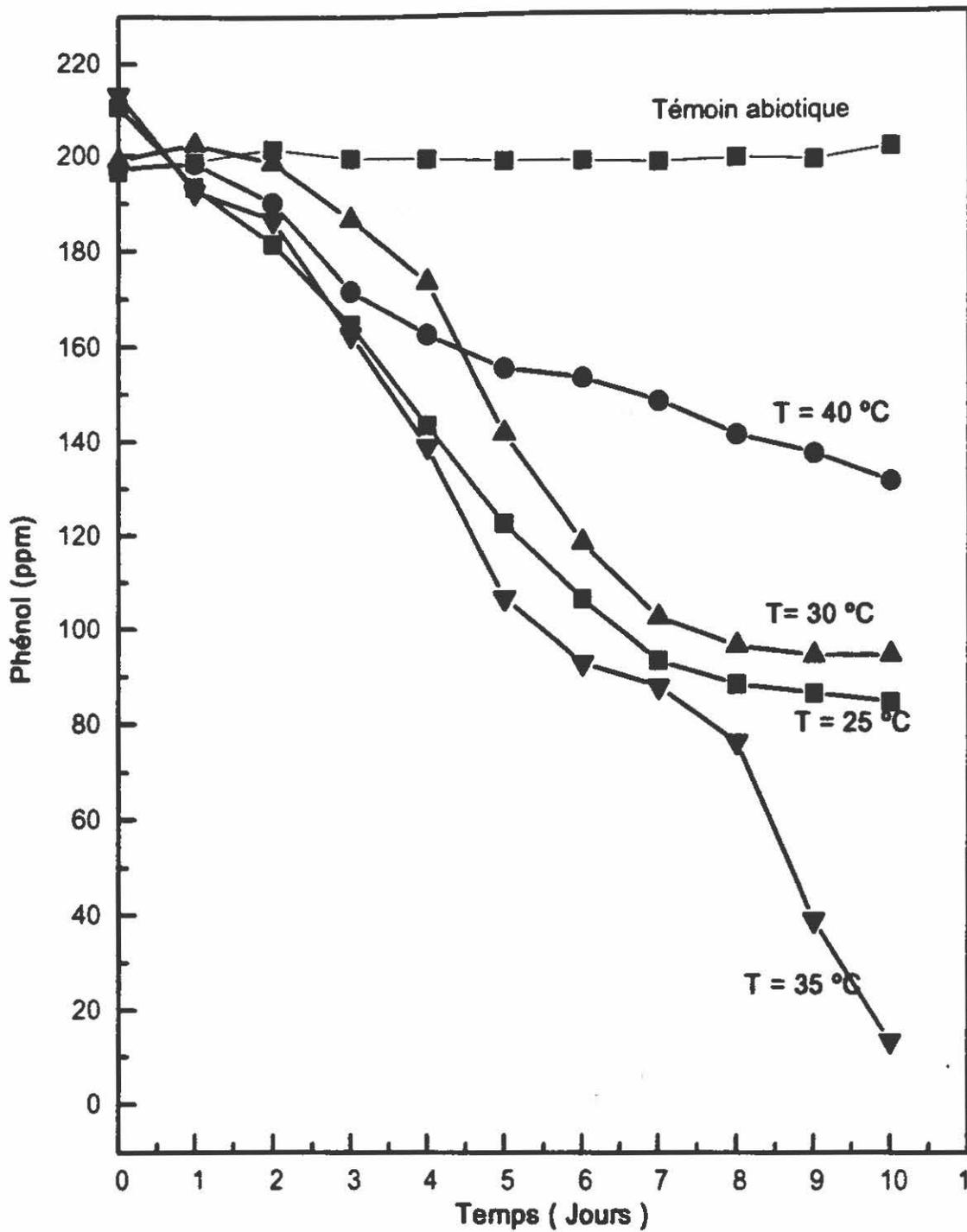
**Figure 15.** Effet de la température sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*.

Figure 15



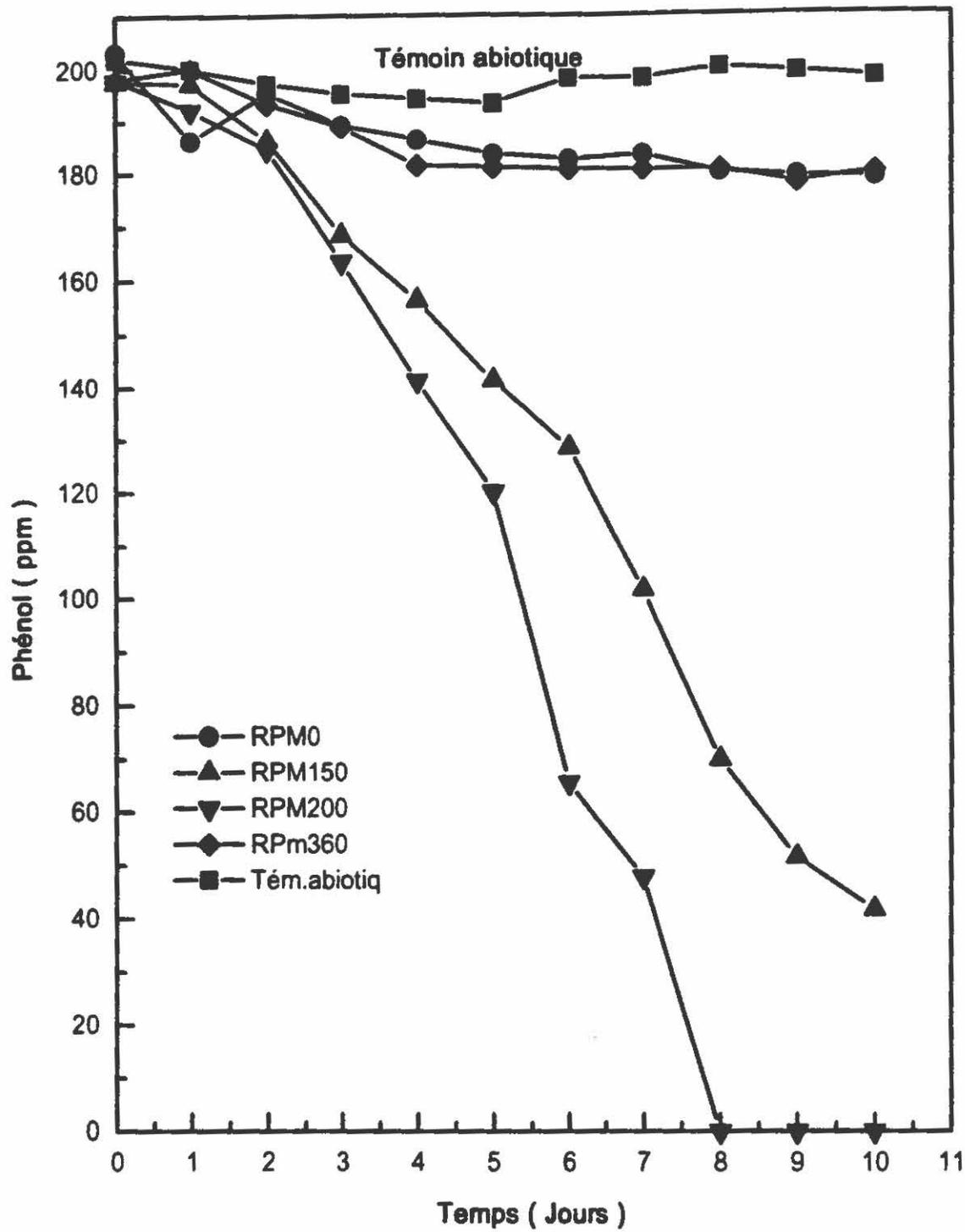
**Figure 16.** Effet de la température sur la dégradation du phénol par *P.chrysosporium*.

Figure 16



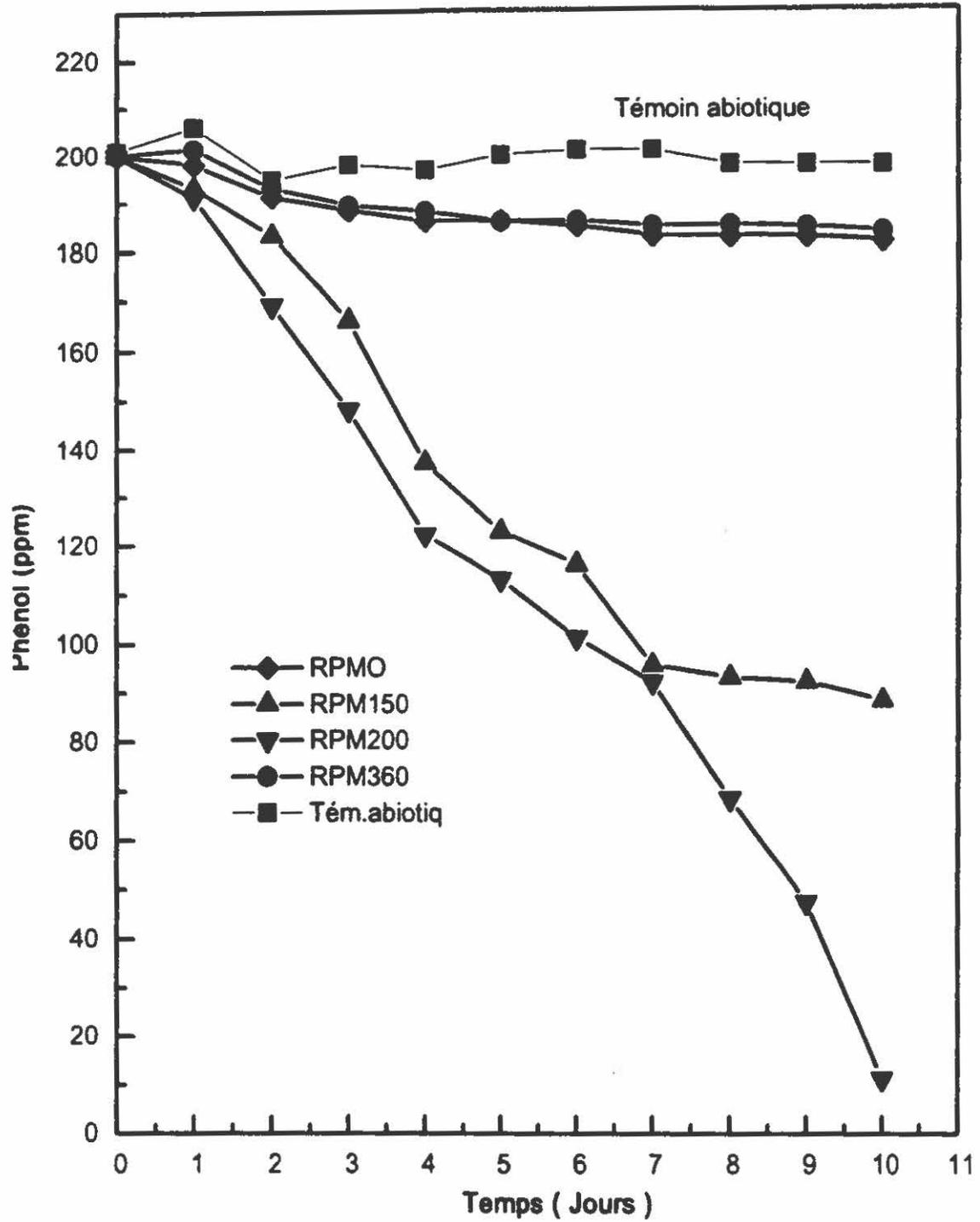
**Figure 17.** Effet de l'agitation sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*.

Figure 17



**Figure 18.** Effet de la température sur la dégradation du phénol par *P. chrysosporium*

Figure 18



#### **4.2.9. Étude de la dégradation *in vitro***

Le but de cette expérience était de savoir si les champignons étudiés étaient capables ou non de dégrader le phénol en dehors des cellules. Nous avons pour cela utilisé des filtrats de culture à différents âges [ 0, 3, 7, 14, 21 et 28 jour(s) ]. Les résultats obtenus ont permis de constater que le filtrat de culture de *P. chrysosporium* était capable de dégrader le phénol tandis que la dégradation par *P. sajor-caju* était très mauvaise avec le filtrat de culture.

#### **4.3. Etude des intermédiaires de la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*.**

##### **4.3.1. Chromatographie en phase gazeuse**

La chromatographie en phase gazeuse a révélé la présence au 3<sup>ème</sup> jour de la culture de *P. sajor-caju*, d'un composé métatoluïque et qui est absent du témoin abiotique. La concentration du composé métatoluïque augmente et atteint une valeur maximale au 6<sup>ème</sup> jour pendant que la concentration du phénol diminue. Après le 6<sup>ème</sup> jour, le composé métatoluïque disparaît totalement du milieu de culture et la concentration du phénol continue à diminuer. Le composé métatoluïque était le seul composé organique sur notre chromatogramme en plus du phénol et des

standards internes. Nous avons donc pensé que ce composé métatoluique était un intermédiaire de dégradation du phénol par *P. sajor-caju* d'autant que ce composé a les caractéristiques suivantes:

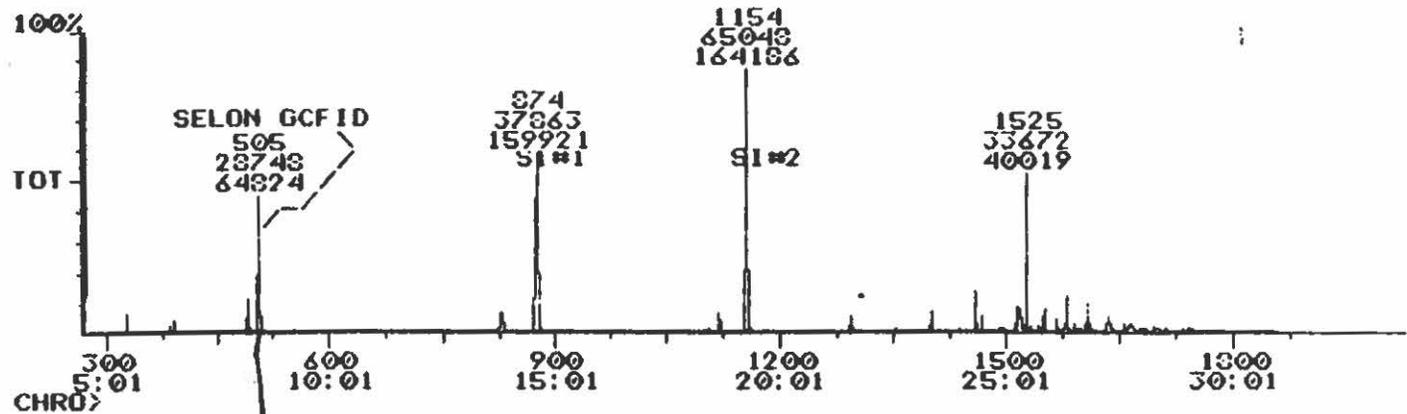
- il n'apparaît que dans les cultures biotiques et après seulement trois jours d'incubation, il n'est pas présent dans les témoins abiotiques, donc sa présence est a priori liée à la présence de *P. sajor-caju*,
- il ne s'accumule pas dans le milieu de culture et disparaît complètement au fil du temps.

#### **4.3.2. Spectrométrie de masse (SM)**

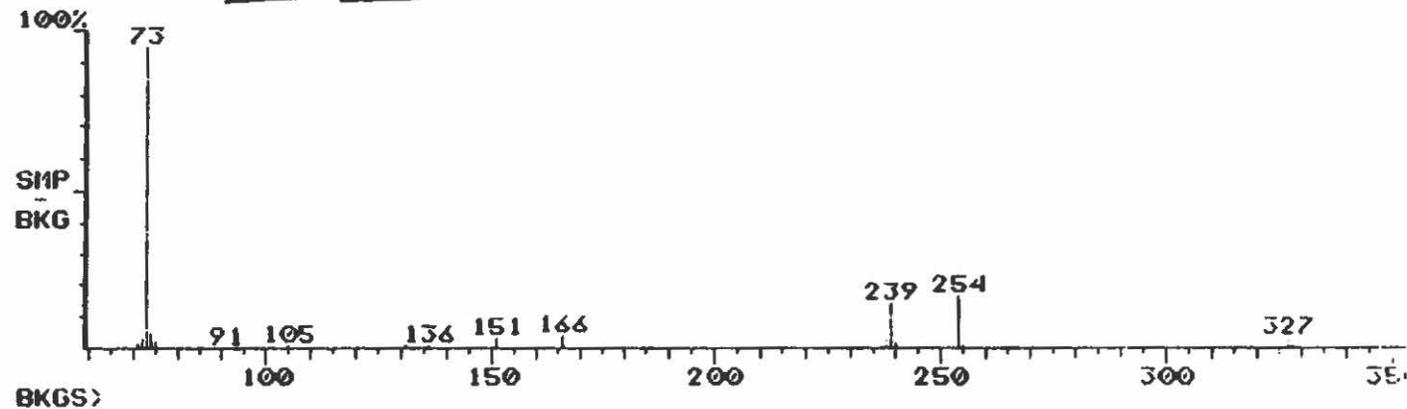
Ces observations nous ont fait faire appel à la spectrophotométrie de masse qui a identifié ce composé comme étant le pyrocathéchol (fragmentogramme 1) après comparaison avec le fragmentogramme de ce dernier composé (fragmentogramme 2).

**Fragmentogramme 1:** Fragmentogramme de l'intermédiaire de dégradation (le pyrocathéchol) avant et après BSTFA.

Chromatogram BOUEMARS\TOURE\_11 Acquired: Mar-26-1996 15:46:57  
 Comment: ECH. PHENOL 200PPM 5J. PHENOL 170PPM M-TOLUIQUE 75PPM 1 DANS 2  
 Scan Range: 271 - 1860 Scan: 271 Int = 7417 @ 4:32 RIC: 100% = 65100

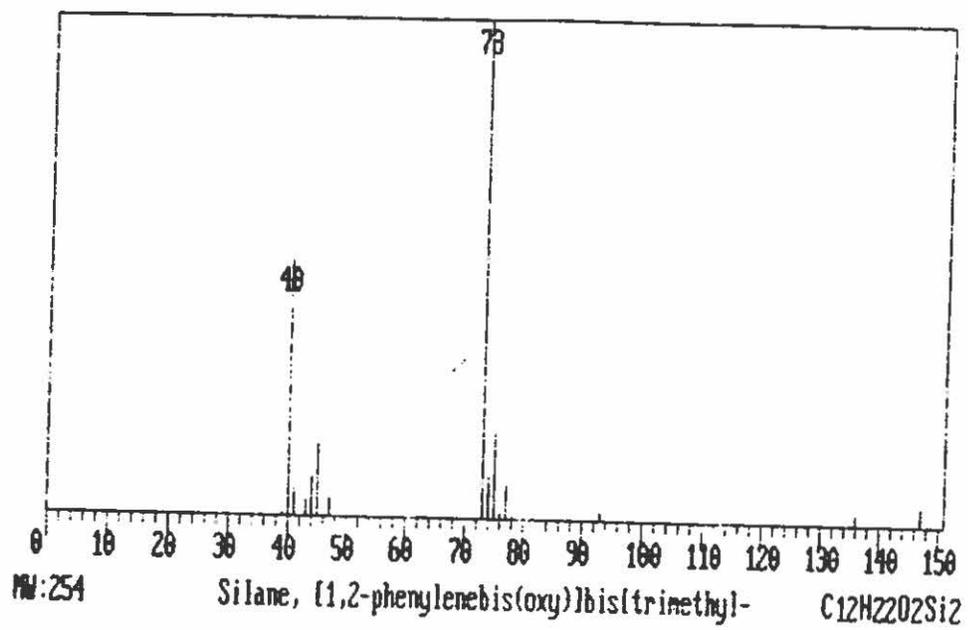
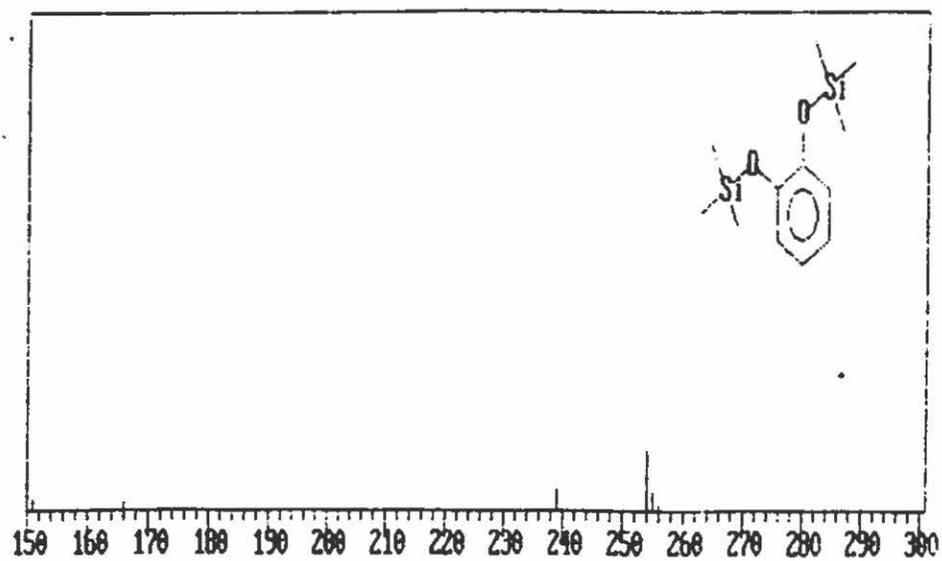


Background Subtract BOUEMARS\TOURE\_11 Acquired: Mar-26-1996 15:46  
 Comment: ECH. PHENOL 200PPM 5J. PHENOL 170PPM M-TOLUIQUE 75PPM 1 DANS 2  
 Average of: 499 to 514 Minus: 514 to 514 100% = 2597



Fragmentogramme 1. Fragmentogramme de l'intermédiaire de dégradation (le pyrocatechol) avant et après BSTFA.

**Fragmentogramme 2: Fragmentogramme du pyrocathéchol**



**Fragmentogramme 2. Fragmentogramme du pyrocatechol.**

## 5. DISCUSSION

### **Évaluation du seuil de tolérance au phénol**

La tolérance à de très fortes concentrations de phénol est certainement un avantage réel lorsque l'on veut bioremediation des sites fortement contaminés ( Bumpus et Aust, 1978a; Leisola et Fiechter, 1985). Une étude précédemment réalisée dans notre laboratoire et qui utilisait la décoloration de colorants comme indication de l'activité ligninolytique (Chahal et al., 1995), a révélé que *P. sajor-caju* avait une faible activité lignine-peroxydase et manganèse-peroxydase mais par contre une forte activité laccase (ou phénol oxydase) par rapport à *P. chrysosporium*. Cette forte activité laccase pourrait être une explication possible à la tolérance à de fortes concentrations de phénol et même à la stimulation de la croissance à 100 ppm de phénol. par *P. sajor-caju*.

### **Effet du pH sur la dégradation du phénol**

Le pH optima de 5.5, cette valeur est assez proche de la valeur optimale de dégradation de la lignine par ce champignon (pH 5.0) obtenue lors de l'étude de Waldner sur la dégradation de la lignine par *P. sajor-caju* (Waldner et al., 1986) tandis que Bourbonnais et Paice, 1988, eux, ont trouvé chez le même champignon une activité veratryl oxydase (preuve de l'activité lignine peroxydase) ainsi qu'une activité d'oxydation de l'ABTS

(preuve de l'activité laccase), à pH 5.0. Tandis que *P. chrysosporium* présentait une activité optimale de dégradation à pH 6.0 (Fig. 6).

### **Effet de l'âge de la culture sur la dégradation du phénol**

De nombreuses études précédentes ont rapporté que le moment de la production, la concentration et le type de peroxydases de *P. chrysosporium* étaient fonction de l'âge de la culture (Bumpus et Aust, 1987b; Farrel et al., 1989). C'est pour cela et étant donné le rôle présumé des ligninases dans la biodégradation des organopolluants (Arjmand and Sanderman, 1985; Bumpus et al., 1990; Huynh et al., 1985; Bumpus et Aust, 1987a; Kennedy et al., 1985), que nous avons voulu savoir l'effet de l'âge de la culture sur le potentiel de dégradation du phénol. La dégradation du phénol par *P. chrysosporium* était presque identique pour les cultures âgées de 0, 7, et 14 jours (Fig. 7). Il faut toutefois noter que les deux champignons ont été incapables de dégrader le phénol lorsque les cultures étaient âgées de 21 jours, probablement à cause du fait qu'elles étaient devenues trop vieilles pour produire les enzymes nécessaires et/ou ne pouvaient plus croître à cause l'épuisement des nutriments dans le milieu de culture. Ces résultats indiquent qu'il est peut être nécessaire de faire croître *P. chrysosporium* pendant une à deux semaines dans le but d'optimiser son pouvoir de dégradation du phénol, tandis que *P. sajor-caju* a été capable de dégrader

le phénol à un stade très précoce de sa croissance (jour 0). Nos résultats obtenus avec *P. chrysosporium* épousent parfaitement ceux rapportés par d'autres auteurs dont Leisola et al., (1987) et Mileski et collaborateurs (1988) qui ont observé avec le PCP que plus la culture était vieille, meilleure était la dégradation de ce produit toxique. Le comportement de *P. sajor-caju* qui lui, semble contraire à celui de *P. chrysosporium* nous a fait émettre l'hypothèse de l'existence probable chez ce microorganisme, d'enzymes autres que celles habituellement reconnues comme responsables de la ligninolyse. Une autre hypothèse serait que si les enzymes impliquées dans la ligninolyse par *P. sajor-caju* sont celles en cause à ce stade précoce de la croissance, celles-ci seraient donc produites par le champignon avant les trois jours habituellement nécessaires pour la production des enzymes ligninolytiques selon Eaton (Eaton, 1985). Nous pensons cependant qu'il serait tout à fait hasardeux de tirer des conclusions tranchées sur l'effet de l'âge de la culture sur la dégradation du phénol d'autant que le milieu de culture n'est pas renouvelé et que donc la diminution du pouvoir de dégradation de *P. sajor-caju* avec l'augmentation de l'âge de la culture pourrait être due à l'affaiblissement de la culture consécutive à un manque de source de carbone et autres nutriments. Ce paramètre donc, pour qu'il soit étudié avec exactitude, devra se faire en *fed-batch*.

### **Effet de la concentration en azote sur la dégradation du phénol**

Des travaux antérieurs ont montré que le système ligninolytique de *P. chrysosporium* pouvait être synthétisé en absence et en réponse à une carence en azote dans le milieu de culture (Keyser et al., 1978) et qu'un substrat de croissance supplémentaire était indispensable (Kirk et al., 1976; Kirk et al., 1978; Martin et Haider, 1979). Selon certains auteurs, la croissance primaire cède la place au métabolisme secondaire lorsque l'azote dans le milieu est épuisé et l'activité ligninolytique apparaît subséquemment après une période de latence (Keyser et al., 1978). La synthèse du système ligninolytique doit par conséquent être considérée comme un métabolisme secondaire induite par la carence en azote (Fenn et Kirk, 1979). Selon d'autres, le métabolisme secondaire des champignons serait probablement induit plus par une limitation en source de carbone et phosphore qu'en source d'azote (Demain et al., 1979). Une troisième tendance affirme que le métabolisme secondaire est induit par une limitation en source de carbone et d'azote. Il apparaît dans nos résultats, quelle que soit la tendance, que la concentration en azote est non seulement importante pour le déclenchement du processus ligninolytique ainsi que l'ont démontré de nombreux auteurs mais aussi dans la dégradation du phénol. Il apparaît également qu'il est nécessaire

d'avoir un certain rapport C:N pour une dégradation optimale du phénol (Bonnarne et al., 1991). À la lumière de nos résultats, nous pouvons constater que les champignons étudiés peuvent dégrader le phénol dans des conditions de culture azote-suffisant (N), azote-limitant (N/2) et azote-déficient et que *P. sajor-caju* (Fig. 9) , qui est reconnu pour avoir une faible activité ligninolytique en terme de LiP et MnP, est capable de dégrader plus de phénol et plus rapidement que *P. chrysosporium* (Fig. 10) qui par contre a une très grande activité ligninolytique. Toutefois, les deux champignons ont été incapables de dégrader le phénol sous un excès d'azote dans le milieu (Nx10). Nous ne pouvons pas affirmer ici de façon catégorique laquelle entre la source de carbone et la source d'azote influencerait le plus le potentiel de dégradation d'autant plus que ces deux sources n'ont pas été mesurées en cours d'expérience. Une étude plus complète, qui mesurerait la concentration d'azote et de glucose dans le milieu au fil des jours d'expérience, devrait être faite pour déterminer avec certitude l'effet de la concentration en azote sur la dégradation du phénol par *P. sajor-caju*.

### **Effet de la concentration en glucose sur la dégradation du phénol**

L'effet de la concentration de la source de carbone sur la dégradation d'autres toxiques comme le PCP a été étudié par d'autres auteurs. C'est

ainsi que Watanabe (1973) a aussi observé un effet inhibiteur du glucose à 2 % sur la dégradation du PCP par *P. chrysosporium*. Le comportement de *P. chrysosporium* (Fig. 12) sous l'effet de la concentration en glucose confirme dans une certaine mesure le fait que l'activité intervienne quand la source de carbone est épuisée dans le milieu si tant est que la dégradation est inhérente à la synthèse du système ligninolytique. Ainsi donc avec 0.5 % de glucose la dégradation est plus rapide et légèrement plus importante qu'avec 1 % de glucose; les champignons dégradant plus rapidement 5 g/L de glucose que 10 g/L, on comprend que le métabolisme secondaire s'installe plus vite dans le premier cas. Avec 2 % de glucose, ainsi que l'a démontré Bonnarne, le métabolisme secondaire est réprimé (Bonnarme et al., 1991). Les résultats obtenus avec *P. sajor-caju* (Fig. 11) sont en accord avec les travaux de Bourbonnais et Paice (1988) qui ont trouvé que l'activité ligninolytique de ce microorganisme intervenait au cours du métabolisme primaire. C'est donc probablement pour cette raison que *P. sajor-caju* se comporte de la même façon quelle que soit la concentration en glucose.

### **Effet de l'adaptation au phénol sur sa dégradation**

Bumpus et ses collaborateurs ont affirmé qu'il n'était de toutes façons pas nécessaire d'adapter les champignons de la famille des

Basidiomycètes à de fortes concentrations de toxique d'autant plus que ces toxiques, à l'instar de la lignine, sont dégradés par les champignons comme des cométabolites (Bumpus et al., 1985). Au vu de nos résultats avec la souche de *P. sajor-caju* adaptée au phénol (Fig 13), à savoir la réduction de plus de 24 heures du temps de dégradation complète du phénol par rapport à la souche sauvage, nous estimons, en ce qui concerne ce champignon au moins, que l'adaptation au phénol soit indiquée lorsque ce microorganisme est utilisé comme agent de biorémediation de sites contaminés au phénol. Dans leur étude, Mileski et al., ont observé avec le PCP que plus la concentration du toxique est élevée moins bonne était la capacité de dégradation de *P. chrysosporium*. Il est vrai que le phénol n'est pas le PCP et que ces deux composés n'ont pas le même niveau de toxicité mais il est intéressant de noter que tous deux agissent en inhibant le cytochrome P450 chez les champignons. Les souches adaptées et sauvages de *P. chrysosporium* (Fig. 14) ont vu leur pouvoir de dégradation ne subir aucune amélioration avec des concentrations élevées de phénol.

### **Effet de la nature du substrat sur la dégradation du phénol**

Nous avons trouvé que la nature de la source de carbone avait une très grande importance sur la dégradation du phénol. Les deux

microorganismes ont montré un très bon potentiel de dégradation du phénol sur la paille de blé délignifiée probablement à cause du fait que ce substrat est très semblable à celui sur lequel ils vivent dans leur habitat naturel, le bois. Il faut noter ici que *P. sajor-caju* a dégradé complètement le phénol sur la paille de blé délignifiée et était d'une manière générale plus efficace que *P. chrysosporium* quelque soit la source de carbone utilisée. On sait depuis longtemps que certaines sources de carbone peuvent augmenter de façon significative l'activité ligninolytique de certains champignons. C'est ainsi que l'addition de tournesol dans le milieu de culture a un effet positif sur la ligninolyse et la production de ligninases chez *Pleurotus ostreatus* (Schiesser et al., 1989). Le même phénomène a été observé par Asther et al., (1988) chez la souche mutante INA-12 de *P. chrysosporium* avec l'acide oléique à 0.08% (Asther, 1987). Nous n'avons pas jugé nécessaire d'essayer des sources lipidiques de carbone sur la dégradation du phénol à cause de leur coût relativement plus élevé par rapport aux sources glucidiques que nous avons utilisé.

### **Effet de la température sur la dégradation du phénol**

Dans la littérature, on rapporte que la température optimale de croissance de *P. chrysosporium* se situerait entre 37 et 40 °C (Kirk et al., 1976) même si Perez et Jeffries (1990) ont eux, démontré chez ce

champignon une très grande activité ligninolytique à 30 °C. De même, Bourbonnais et Paice ont mis en évidence chez *P. sajor-caju*, deux oxydases de l'alcool vératrylique à 30 °C. A la lumière de ces observations, nous pouvons conclure que chez *P. chrysosporium*, la température optimale de croissance est légèrement différente de la température optimale de dégradation du phénol. En considérant que les ligninases soient les enzymes responsables de la dégradation des organopolluants, ces résultats confirment ce que de nombreux auteurs ont trouvé, à savoir que la ligninolyse ne supporte pas la croissance (Bumpus et Aust, 1987a). Nous pensons donc que de 37 à 40 °C, la croissance est optimale et que lorsque le métabolisme secondaire prend place, il y a production des ligninases dont la température optimale de dégradation du phénol serait de 35 °C. En ce qui concerne *P. sajor-caju*, la température optimale de croissance est la même que celle de dégradation du phénol, cette constatation est en parfait accord avec les travaux de Bourbonnais et Paice qui ont trouvé la même température optimale de croissance. Il faut aussi rappeler que ces auteurs ont aussi confirmé que *P. sajor-caju* dégradait la lignine pendant la période de croissance (Bourbonnais et Paice, 1988), contrairement à *P. chrysosporium* qui, lui, dégrade la lignine au cours du métabolisme secondaire, c'est à dire en dehors de la phase de croissance.

### **Etude de la dégradation *in vitro***

Récemment, il a été démontré que les filtrats de culture de *P. chrysosporium* étaient capables de dégrader des HAPs, des biphényles polychlorés et des dibenzo[p]dioxines chlorés (Eaton, 1985; Bumpus et al., 1985). Le système ligninolytique de *P. chrysosporium* est connu pour être extra cellulaire (Tien et Kirk, 1983; Glenn et Gold, 1985; Pasczynski et al., 1985b), ce qui explique la bonne dégradation *in vitro* du phénol avec ce microorganisme. Le mauvais résultat obtenu avec *P. sajor-caju* pourrait s'expliquer par le fait que les enzymes liées à la ligninolyse sont en partie liées à la paroi cellulaire, donc intracellulaires (Zadrazil, 1978; Bourbonnais et Paice, 1987)

### **Étude des intermédiaires de dégradation**

L'intermédiaire principal qui apparaît au 3<sup>ème</sup> jour de culture puis disparaît progressivement au fil des jours (la disparition du milieu de culture est complète au bout de 7 à 8 jours) est le pyrocathéchol. Ceci nous conduit donc à penser que ce pyrocathéchol a subi à son tour une ouverture du cycle en "méta" ou en "ortho" et une minéralisation jusqu'au CO<sub>2</sub>. L'idéal, pour rendre cette identification complète et sans équivoque, eût été l'utilisation de phénol marqué au <sup>14</sup>C et à rechercher du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Ce

travail constitue une partie importante de notre étude qui devrait être faite dans l'avenir. Ces résultats sont confortés par les travaux de nombreux auteurs qui ont travaillé sur les voies de dégradation du phénol et selon lesquels il y a d'abord formation du catéchol puis ouverture du cycle en ortho ou en méta (Rogoff, 1961; Tabak et al., 1964; Chapman, 1972; Bayly et Barbour, 1984b).

## 6. CONCLUSION

## 5. CONCLUSION

Les résultats de notre étude ont montré que *P. sajor-caju*, bien qu'ayant une faible activité ligninolytique en terme de LiP et de MnP, a pu dégrader plus de phénol et en un temps plus court que *Phanerochaete chrysosporium*. Cependant, les deux microorganismes ont dégradé le phénol au cours des phases exponentielle et stationnaire de la croissance. Nous avons également noté une certaine amélioration de la dégradation chez *P. sajor-caju* avec l'adaptation au phénol. Un des grands désavantages dans la bioremédiation étant la longueur du temps de traitement, nous pensons que *P. sajor-caju* offre un avantage certain comme choix par le fait que nous avons trouvé que la dégradation du phénol intervient au cours du métabolisme primaire. *P. sajor-caju* s'est aussi montré capable de bien croître sur des sources de carbone peu dispendieuses et de mieux dégrader le phénol sur ces sources, ceci met en exergue les économies que l'on pourrait faire avec ce microorganisme. Dans certaines situations, *P. sajor-caju* a dégradé le phénol dans des conditions non reconnues comme favorisant l'activité ligninolytique, ce qui nous fait émettre l'hypothèse de l'existence probable chez ce microorganisme d'un système enzymatique autre que celui habituellement reconnu. Nous recommandons pour la suite de ce travail,

l'approfondissement de l'étude des intermédiaires de la dégradation, le suivi de la concentration du glucose et de l'azote au fil du temps ainsi que la corrélation entre leur concentration et la quantité de phénol dégradée.

## **7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Adachi, A., Asaka, Y., Ozasa, M., Sawai, N., and Cubbish, T. 1987. Formation of cyanide ion by the reaction of phenol with nitrous acid in waste water. *Eisei Kagaku*, **33**(6):445 - 448.

Adler, E. 1977. Lignin chemistry. Past, present and future. *Wood. Sci. Technol.* **11**:169-218.

Andrawis, A., Johnson, K. A., and Tien, M. 1988. Studies of compound I formation of the lignin peroxydase from *P. chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **263**: 1195-1198.

Aquino, M. D., Korol, S., Santini, P., and Moretton, J. 1988. Biodegradation of phenolic compounds: I. Improved degradation of phenol and bezoate by indigenous strains of *Acinobacter* and *Pseudomonas*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **30**(3): 283-288.

Arjmand, M., and Sandermann, H. Jr. 1985. Mineralization of chloroaniline by the white rot fungus *P. chrysosporium*. *J. Agric. Food Chem.* **33**:1055-1060.

Asther, M., Lesage, L., Drapron, R., Corrieu, G., et Odier. E., 1988. Phospholipid and fatty acid enrichment of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 in relation to ligninase production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 393-398.

Bark, F., and Widdel, F. 1986. Anaerobic degradation of phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum*, new species. *Arc. Microbiol.* **146**(2): 177-180.

Bauer, W.F. 1975. Agents, Methods and devices for Amelioration of Discharge of Hazardous Chemicals on Water, Rensselaer Polytechnic Institute for the U. S. Coast guard, Washington DC, CG-D-38-76 (August, 1975).

Bayly, J. R. and Barbour, M. G., 1984a. Thin-film chromatography of 40 simple phenols. *Agrochimica*. **28**(5-6):471-477.

Bayly, R. C., et Barbour M. G., 1984b. The degradation of aromatic compounds by meta and gentisate pathways. In *Microbial degradation of organic compounds*. Ed. D. T. Gibson, **13**: 253-294

Berkovitz, A., et Farka, M. 1992. Biorestauration des sites contaminés. CQVB, cahier technique, 1992.

Bonnarme, P., and Jeffries, T. W. 1990. Mn(II) regulation of lignin peroxidases from lignin degrading white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 210-217.

Bonnarme, P., Perez, J., and Jeffies, T. W. 1991. Regulation of ligninase production in white-rot fungi. In: *Enzymes in Biomass Conversion*, chap. 16.: Leatham, G. F. et Himmel(éds.), ACS Symposium Series 460, Washington D.C.pp. 200-206.

Bourbonnais, R., and Paice, M. G. 1987. The fate of <sup>14</sup>C- labelled high molecular weight chlorinated lignin and chromophoric material during microbial treatment of bleached kraft effluent. *J. wood Chem. Technol.* in press.

Bourbonnais, R., and Paice, M. G. 1988. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading Basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem. J.* **255**: 445-450.

Brebion, G., Cabridenc, R., et Leygue, M. 1967. Etude des possibilités de dégradation du phénol. *Terres et Eaux* **20**: 46-49.

Bruce, R. M., Santodonato, J., and Neal, M.W. 1987. Summary review of the health effect associated with phenol. *Toxicol. Ind. Health*, **3**(4): 535-568.

Bumpus, J. A., Tien, M., Wright, D., and Aust, S. D. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* **228**: 1434-1436.

Bumpus, J. A., and Aust, S. D. 1987a. Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *P. chrysosporium*. *Bioessays* **6**: 166-170.

Bumpus, J. A., and Aust, S. D. 1987b. Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2bis(4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus *P. chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2001-2008.

Buswell, J.A. 1975. Metabolism of phenol and cresols by *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **19**: 1-14.

Chahal, D. S. and Hachey, J.M. 1990. Use of hemicellulose and degradation of lignin by *Pleurotus sajor-caju* grown on corn stalks. *A C S.* **25**: 304-310. ACS Symposium Series 433, p 304-310.

Chahal, D.S., Kluepfel, D., Morosoli, R., Shareck, F., Laplante, S., and Rouleau, D. 1995. Use of dyes in solid medium for screening ligninolytic activity of selective actinomycetes. *Appl. Biochem., Biotechnol.* **51/52**: 137-144.

Chapman, P. J. 1972. An outline of reaction sequences used for the bacterial degradation of phenolic compounds. In: *Degradation of synthetic organic molecules in the biosphere*. Ed. Chapman et Hall. National Academy of Science, Washington D.C., p. 17-55.

Chesney, R. H., Slliti, T. J., Chang, C. C., and Trosko, J. E. 1984. Inhibition

of metabolic cooperation in chinese hamster V79 cells by various organic solvents and simple compounds. *Cell. Biol. Toxicol.* **1**(1): 155-171.

Clarke, P. H., et Richmond, M. H. 1975. Metabolic pathways and regulation. *In* Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas*. Ed. Clarke et Richmond. London, Toronto, Wiley p. 218 - 234.

Cserjesi, A. J., and Roff, J. W. 1967. Retention of pentachlorophenol in lumber dipped in water solution. *Forest Prod. J.* **14**(8): 373-376.

Demain, A. L., Kennel Y. M., and Aharonowitz Y. 1979. Carbon catabolite regulation of secondary metabolism, p. 163-185. *In*: A. T. Bull, D. C., Ellwood, and C. Ratledge(ed.), *Microbial Technology: current state, future prospect*. Cambridge University Press, Cambridge.

Den Boef, J., Kruiswijk, F.J., and Schulting, F. L. 1984. Air pollution by combustion of solid fuels. The Hague, Ministry of Housing, Physical Planning and Environment (Publication Lucht No. 37).

Dobbins, D. C., Thornton-Manning Jr., Jones, D. D., and Federle, T. W. 1987. Mineralization potential for phenol in subsurface soils. *J. Environ. Qual.* **16**(1) :54-58.

Eaton, D. C. 1985. Mineralization of polychlorinated biphenyls by *P. chrysosporium* : a ligninolytic fungus. *Enzyme Microb. Technol.* **7**: 194

Ehrlich, G. G., Goelitz, D. F., and Godsky, E. M. 1982. Degradation of phenolic contaminants in ground water by anaerobic bacteria: St. Louis Park, M. N. *Ground Water*, **20**: 703- 710.

Faison, B. D., and Kirk, T. K. 1985. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 299-304.

Fang, N. M. P., and E.S.K. Chian. 1976. Reverse osmosis separation of polar organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* **10**(4): 364-369.

Farrel, R.L., Murtagh, K. E., Tien, M., Muzuch, M. D., and Kirk, T. K. 1989. Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **11**: 322-328.

Federle, T. W. 1988. Mineralization of monosubstituted aromatic compounds in unsaturated and saturated subsurface soils. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1037-1042.

Fedorak, P. M., and Hruday, S. E. 1986. Nutrient requirement for methanogenic degradation of phenol and p-cresol in anaerobic draw and feed cultures. *Water Res.* **20**(7): 929-934.

Fenn, P., and T. K. Kirk. 1979. Ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*: Inhibition of o-phthalate. *Arch. Microbiol.* **123**: 307-309.

Fenn, P., and T.K. Jirk. 1980. Formation and action of the ligninolytic system in Basidiomycetes, p. 152-169. In J. Hedger and Frankland (ed.), *Decomposition by basiomycetes*. Cambridge University Press, Cambridge.

Fourney, L. J., A. C. Redy, M. Tien and S.D. Aust. 1982. The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **257**: 11455.

Fukuzumi, T., A. Yotukura et Y. Hayashi. 1983. Screening the fungus for biological pulping. Dans: *Abstract of Recent Advances in Lignin Biodegradation Research: Fundamentals and Biotechnology.* : May 31-June 2, Kyoto, Japan. P. 33.

Gibson, D. T., and Subramanian, V. 1984. Microbial degradation of

aromatic hydrocarbons. New York: Marcel Dekker, Inc., pp 181-252.

Girard, P. 1979. Biodégradation du phénol à l'aide de boues activées. *Eau du Québec*. **12**(2): 106-108.

Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M., and Gold, M. H. 1983. An extracellular  $H_2O_2$  - requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res., Commun.* **114**: 1077-1083.

Glenn, J. K., and Gold, M. H. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(III)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **242**: 329-341.

Gold, M. H., Wariishi, H., and Valli, K. 1989. Extracellular peroxidase involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *ACS Symp. Ser* **389**: 127-140.

Groenen, P. J. 1978. Components of tobacco smoke. Nature and quantity; potential influence on health. Zeis, The Netherlands, CIVO-TNO Institute Report No **R/5787**).

Gutiérrez, A., Boccini, P., Galletti, G. C., and Martinez, A. T. 1996. Analysis of lignin-polysaccharide complex formed during grass lignin degradation by *Pleurotus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1928-1934.

Gurujeyalashimi, S., and Oriol, P. 1989. Isolation of phenol-degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(2): 500-502.

Haemmerli, S. D., Leisola, M. S. A., Sanglard, D., and Fiechter, A. 1986. Oxidation of benzo[a]pyrene by extracellular ligninase of *Phanerochaete*

*chryso sporium*: veratryl alcohol and stability of ligninase. J. Biol. Chem. **261**: 6900-6903.

Hammel, K. E., Jensen, K. A. Jr., Mozuch, M. D., Landucci, L. L., Tien, M., and Pease, E. A. 1993. Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. J. Biol. Chem. **268**: 12274-12281.

Hammel, K. E., and Moen, M. A. 1991. Depolymerization of a synthetic lignin *in vitro* by lignin peroxidase. Enzyme Microbiol. Technol. **13**: 15-18.

Hammel, K. E., and Tardone P. J. 1988. The oxidative dechlorination of polychlorinated phenol is catalyzed by extracellular fungal lignin peroxidase. Biochemistry **27**: 6563-6568.

Hammel, K. E., Kalyanaraman, B., and Kirk, T. K. 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chryso sporium* ligninase. J. Biol. Chem. 16948-16952.

Harvey, P. J., Schoemaker, H. E., and Palmer J. M. 1986. FEBS Lett. **195**: 242-246. (In Dutch)

Hickman, G. T., and Novak, J. T. 1989. Relationship between surface biodegradation rates and microbial density. Environ. Sci. Technol. **23**(5): 524-532.

Hiroi, T., and Eriksson, K. E. 1976. Sven. Papperstidn. **79**: 157-161. (In Dutch).

Hoshino, M., and Akimoto, H. 1978. Photochemical oxidation of benzene initiated by OH radicals in the gas phase. Bull. Chem. Soc. Jpn., **51**: 718.

Howard, P.H. 1989. Handbook of environmental fate and exposure data

for organic chemicals. Chesla, Michigan, Lewis Publishers, 1: 468-476.

Hubble, B. R., Setter, J. R., Gebert, E., Harkness, J. B. L., and Flotard, R. D. 1981. Experimental measurements from residential wood-burning stoves. Proceedings of the International Conference on residential solid fuels: Environmental impact and solutions, John A. Cooper and Dorothy Malek.

Hughes, E. J. L., Bayly, R. C, and Sukurray, R. A. 1984. Evidence for isofunctional enzymes in the degradation of phenol, m and p-toluic acid and p-cresol via catechol meta-cleavage pathways in *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. **151**(1): 79-83.

Huynh, V. B., Chang, H-m, Joyce, T. W., and Kirk, T. K. 1985. Dechlorination of chloro-organics by a white-rot fungus. Tappi. J. **68**: 98-102.

Hwang, H. M., Hodson, R. E., and Lee, R. F. 1986. Degradation of phenol and chlorophenols by sunlight and microbes in estuarine water. Environ. Sci. Technol. **20**(10): 1002-1007.

Hwang, H. M., Hodson, R. E., and Lewis, D. L., 1989. Assessing interaction of organic compounds during biodegradation of complex waste mixtures by naturally occurring bacterial assemblages. Environ. Toxicol. Chem. **8**(3): 209-214.

IARC, 1989. Phenol. In: Some organic solvents, resins monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting. Lyon, International Agency for Research on Cancer. (I. A. R. C. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to Humans, volume **47**: 263-287).

Jäger, A., Croan, S., and Kirk, T. K. 1985. Production of ligninases and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete*

*chryso sporium*. Appl. Environ. Microbiol. **50**: 1274-1278.

Janshekar, H., Haltmeier, T., and Brown, C. 1982. Fungal degradation of pine and straw alkali lignins. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **14**: 174-181.

Jarvis, S. N., Straube, R. C., Williams, A. L. J., and Barlett C. L. R. 1985. Illness associated with contamination of drinking water supplies with phenol. Br. Med. J. **290**: 1800-1802.

Jeffries, T. W., Choi, S., and Kirk, T. K. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chryso sporium*. Appl. Environ. Microbiol. **42**: 290-296.

Kennedy, D. W., Aust. S. D., and Bumpus, J. A. 1990. Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white-rot fungus *Phanerochaete chryso sporium* (BKM-F-1767). Appl. Environ. Microbiol. **56**: 2347-2357.

Kennes, C., and Lema, J. M. 1994. Simultaneous biodegradation of p-cresol and phenol by the basidiomycete *Phanerochaete chryso sporium*. J. Ind. Microbiol. **13**: 211-314.

Kersten, P. J., Tien, M., Kalyanaraman, B., Kirk, T. K. 1985. The ligninase of *Phanerochaete chryso sporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. J. Biol. Chem. **260**: 2609-2612.

Keyser, P. J., Kirk, T. K. and Zeikus, J. G. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chryso sporium* : synthesized in absence of lignin in response to nitrogen starvation. J. Bacteriol. **135**: 790-797.

Kirk, T., Tien, M., Kersten, P. J., Mozuch, H. D., and Kalyanaraman, B. 1986. Ligninase of *Phanerochaete chryso sporium*. Mechanism of its

degradation of the non-phenolic arylglycerol  $\beta$ -aryl ether substructure of lignin. *Biochem. J.* **236**: 279-287.

Kirk, T., Connors, W. J and Zeikus, J. G. 1976. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 192.

Kirk, T. K., and Fenn, P. 1982. Formation and action of ligninolytic system in basidiomycetes. In: *Decomposer basidiomycetes*, British Mycological Symposium 4 : Frankland, A. L. Hedges et B. Swift (ed.), Cambridge University Press, P 67-90.

Kirk, T. K., Farrel, R. L. 1987. "Enzymatic Combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 465-505.

Kirk, T. K., Johnsrud, S. C. and Eriksson, K. E. 1988. Lignin degrading activity of *Phanerochaete chrysosporium* Burds: comparison of cellulase-negative and other strains. *Enzyme Microbial. Technol.* **8**: 75-80.

Kirk, T. K., Nakatsubo, F. 1983. Chemical mechanisms of an important cleavage reaction in fungal degradation of lignin. *Biochem. Biophys. Acta* **756**: 376.

Knezovitch, J. P., Hirabayashi, J. M., Bishop, D.J., and Harrison, F. L. 1988. The influence of different soils types on the fate of phenol and its degradation products. *Chemosphere*, **17**(11): 2199-2206.

Knoevenagel, K., and Himmerlich, R. 1976. Degradation of compounds containing carbon atoms by photooxidation in the presence of water. *Arch. Contam. Toxicol.* **4**: 324-333.

Knoll, G., and Winter, J. 1987. Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge: benzoate formation from phenol and carbon dioxide in the

presence of hydrogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**(4): 384-391.

Kuwata, K., Uebri, M., and Yamazaki, Y. 1980. Determination of phenol in polluted air as p-nitrobenzene azophenol derivative by reversed phase HPLC. *Anal. Chem.* **52**(6): 857-860.

Leatham, G. F., and Kirk, T. K. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**: 65-67.

Leisola, M. S. A., and Fiechter, A. 1985. Ligninase production in agitated conditions by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **29**: 33-36.

Leisola, M. S. A., Ulmer, D. C., Waldner, R., and Fiechter, A. 1984. Role of veratryl alcohol in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* **1**: 331.

Leisola, M. S. A., Kozulic, B., Meussdoerffer, F., and Fiechter, A. 1987. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **262**: 419-424.

Lundkist, K., Kirk, T. K. and Connors, W. J. 1977. Fungal degradation of kraft lignin and lignin sulfonates prepared from synthetic <sup>14</sup>C-lignins. *Arch. Microbiol.* **112**: 291.

Lyr, H. 1963. Enzymatic detoxifikation chlorierter phenole. *Phytopathol.* **47**: 73-83.

Mandels, M., and Weber, J. 1969. The production of cellulase. *Adv. Chem. Ser.*, **95**: 391-414.

Martin, J. P., and Haider, K. 1979. Biodegradation of  $^{14}\text{C}$ -labeled models and cornstalk lignins, phenols, model phenolase humic polymers and fungal melanins as influenced by a readily available carbon source and soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 283-289.

Merill, W., and Cowling, E. B. 1966. Role of nitrogen in wood deterioration: amount and distribution of nitrogen in fungi. *Phytopathol.* **56**: 1083-1090.

Mileski, G. J., Bumpus, J. A., Jurek, M. A., and Aust, S. D. 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **27**: 6563-6568.

Nachtigall, M. H., and Butler, R. G. 1974. Metabolism of phenol and chlorophenols by activated sludge microorganisms. *Abstr. Ann. Meeting of Am. Soc. of Microbiol.* : 237.

Namkoong, W., Loehr, R. C., and Malina, J. F. Jr. 1989. Effect of mixture and acclimatation on removal of phenolic compounds in soil. *J. Water Pollut. Control. Fed.*, **61**(2): 242-250.

Niessen, R., Lenoir, D., and Boule, P. 1988. Phototransformation of phenol induced by excitation of nitrates. *Chemosphere*, **17**(19): 1977-1984.

Paris, D. F., Wolfe, N. L., and Steen, W. C. 1982. Structure-activity relationship in microbial transformation of phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 153-158.

Paszczynski, A., Huynh, V-B., and Crawford, R. 1986. Enzymatic activities of an extracellular manganese-dependant peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **29**: 37-41.

Perez, J., and Jeffries, T. W. 1990. Mineralization of  $^{14}\text{CO}_2$ -ring-labeled synthetic lignin correlates with the production of lignin peroxidase, not of

manganese peroxidase or laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1806-1812.

Reddy, C. A. 1984. In: *Physiology and biochemistry of lignin degradation*. Ed. M. J. King, C. A. Reddy. Washington D. C. American Society for Microbiol. 23-25.

Reid, I. D. 1989. Solid state fermentation for biological delignification. *Enzyme Microbiol. Technol.* **11**: 786-803.

Renganathan, V., and Gold, M. H. 1986. Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* **25**: 1626-1631.

Ribbons, D. W. 1966. Metabolism of o-cresol by *Pseudomonas aeruginosa* strain T1. *J. Gen. Microbiol.*, **44**: 221-231.

Rogoff, M. H. 1961. Oxidation of aromatic compounds by bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **3**: 193-219.

Rozich, A. F., and Calvin, R. J. 1986. Effect of glucose on phenol biodegradation by heterogenous populations. *Biotechnol. Bioeng.* **29**(7): 965-971.

Sala-Trepat, J. M., Murray, K, and Williams, P. A. 1972. The metabolic divergence in the meta cleavage of catechols by *Pseudomonas putida* NC1B10015. Physiological significance and evolutionary implications. *Eur. J. Biochem.* **28**: 347-356.

Sanglard, D., Leisola, M. S. A., and Fiechter, A. 1986. Role of extracellular ligninases in biodegradation of benzo[a]pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enz. Microbiol. Technol.* **8**: 209-212.

Schiesser, A., Luna, M., Trovatelli, L., and Burla, G. 1989. Effect of sunflower oil on growth and enzyme activities of *Pleurotus ostreatus* growing on straw in submerged culture. *Ann. Microbiol.* **39**: 233.

Schimida, M., Nakatsubo F., Kirk, T. K., and Higuchi, T. 1981. Biosynthesis of the secondary metabolite veratryl alcohol in relation to lignin degradation in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **129**: 321-324.

Schwien, U., and Schmidt, A. 1982. Improved degradation of monochlorophenols by a constructed strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 33-39.

Shivaraman, N., Kumaran, P. and Parhard, N.M. 1978. Phenol degradation by *Candida tropicalis* and influence of other toxicants. *Indian. J. Env. Health* **20**(2): 101-111.

Southworth, G. R., Herbes, S. E., Franco, P. J., and Giddings, J. M. 1985. Persistence of phenols in aquatic microcosms receiving chronic inputs of coal-derived oil. *Water Air Soil Pollut.* **24**: 283-296.

Spiecher, R. G., and Skrinde, R. T. 1975. Phenol degradation with permanganate treatment. *J. Amer. Water Assoc.* **57**(4): 472-484.

Spoelstra, S. F. 1978. Degradation of tyrosine in anaerobically stored piggery wastes and in pig feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 631-638.

Tabak, H. H., Chambers, C. W. and Kabler, P. W. 1964. Microbial metabolism of aromatic compounds. In: *Decomposition of phenolic compounds and aromatic hydrocarbons by phenol-adapted bacteria.* *J. Bacteriol.* **87**(4): 910-919

Thornton-Manning Jr., Jones, D. D., and Federle, T. W. 1987. Effect of experimental manipulation of environmental factors on phenol

mineralization in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **6**: 615-621.

Tibbles, B. J., and Baecker, A. A. W. 1989. Effects and fate of phenol in simulated landfill sites. *Microb. Ecol.* **17**(2): 201-206.

Tien, M., and Kirk, T.K. 1984. Lignin-degrading enzymes from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2280-2284

Tien, M., and Kirk, T.K. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* **221**: 661-663.

Tranvik, L., Larsson, P., Okal, L., and Regnell, O. 1991. *In situ* mineralization of chlorinated phenols by pelagic bacteria in lakes of different humic content. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**: 195-200.

Trojanowski, J., and Leonowicz, A. 1969. *Micrbios* **3**: 247-251.

Tudor, F., and Aust, S. D. 1988. Biodegradation of toxic chemicals by white-rot fungi. *Appl. Environ. Micrbiol.* **25**: 380-385

UBA, 1981. Air pollution control. 1981. Developments, state of the art, tendencies. Berlin, Federal Office for the Environment.

Ursin, C. 1985. Degradation of organic chemicals at trace levels in sea water and marine sediment. The effect of concentration of the initial fractional turnover rate. *Chemosphere*, **14**: 1539-1550.

Valli, K., and Gold, M. H. 1991. Degradation of 2, 4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **173**:

345-352.

Verschuere, K. 1983. Handbook of Environmental data on organic chemicals, 2<sup>nd</sup> ed. New York, Van Nostrand Reinhold Company.

Waldner, R., Leisola, M., and Fiechter, A. 1986. Proc. Int. Conf. Biotechnology in the pulp and paper industry. **3**: 150-151. Swedish Forest Products Research Laboratory, Stockholm.

Walker, N. 1973. Metabolism of chlorophenols by *Rhodotorula glutinis*. Soil Biol. Biochem. **5**(5): 525-530.

Wariishi, H., valli, K., and Gold, M. H. 1991. *In vitro* depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **176**: 269-275.

Watanabe, I. 1973. Isolation of pentachlorophenol decomposing bacteria from soil. Soil Sci. Plant. Nutr. **19**: 106-116.

Westmeier, F., and Rehm, H. J. 1985. Biodegradation of 4-chlorophenol by entrapped *Alcaligenes* sp A-72. Appl. Microbiol. Biotechnol. **22**: 301-305.

Wiggins, B. A., and Alexander, M. 1988. Role of chemical concentration and secondary carbon source in acclimatation of microbial communities for biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. **54**(11): 2803-2807.

Yang, H. H., Effland, M. J., and Kirk, T. K. 1980. Factors influencing fungal degradation of lignin in a representative lignocellulosic, thermomechanical pulp. Biotechnol. Bioeng. **22**: 65.

Zadrazil, F. 1978. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju*. In : The biology and cultivation of edible mushrooms. p 521-557. Edited by Chang, S. T., and Hayes, W. A., Academic Press.

## 8. REMERCIEMENTS

## **Remerciements**

Je voudrais saisir cette merveilleuse opportunité qui s'offre à moi pour adresser mes très sincères remerciements :

À mes Directeur et co-Directeur, les Drs **Devinder S. Chahal** et **Muhammed Ishaque**, pour le soutien indéfectible, leur courtoisie et leur gentillesse sans commune mesure.

**Au Dr Réjean Beaudet,**

À Mr Guy McSween, Mrs Sylvain Milot et Khalid Tawfiki, pour le soutien technique et leurs conseils éclairés.

À mes amis du laboratoire Diane Rouleau, Victor Awafo et Issou Bayala dont la bonne compréhension et l'esprit de camaraderie nous ont permis de supporter sans peine ces intenses moments de Recherche.

À mes amis de "LA TABLE" Françoise Marga, Fadi Dagher, Eliane, Jean, Madeleine, Adama, Marie -Pierre et tous les autres, pour la vraie Famille que j'ai trouvée en eux et la profondeur et la sincérité de notre amitié. Grand Merci.

À ma femme pour tout ce qu'elle représente pour moi et pour son support pendant toutes ces études.

À mon fils **Modibo Touré**, pour tout l'espoir que je place en lui et l'exemple de courage et de détermination que je voudrais représenter pour lui.

À tous ceux que j'ai côtoyés à l'intérieur comme à l'extérieur de L'IAF et qui ont contribué à agrémenteer mon séjour au Canada.

**Je dédie particulièrement ce travail à la mémoire de mon Père et à celle de ma Mère**, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour le sens de l'honneur, du respect et de la générosité qu'ils ont cultivé en moi.

## 9. ANNEXE

### **Abréviations utilisées**

ABTS : 2,2-Azino-di-(3-éthyl benzthiazoline sulfonate (6))

BSTFA: bis-(trimethylsilyle)-trifluoroacétamide

DDT : Dichlorodiphényltrichloréthane

USEPA : United States Environmental Protection Agency

tpm : tour par minute.