



Université du Québec
à Rimouski

**La fermentation solide de matières organiques résiduelles
locales par des mycètes de l'estuaire du Saint-Laurent : une
synergie innovante pour la production d'enzymes ligninolytiques**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise sur mesure, biotechnologies

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© **Pierre Bouchard**

Novembre 2024

Composition du jury :

El Mahdi Bendif, président du jury, Institut des Sciences de la Mer (UQAR)

Jean-Sébastien Deschênes, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski

**Karine Lemarchand, codirectrice de recherche, Institut des Sciences de la Mer
(UQAR)**

**Antonio Avalos Ramirez, examinateur externe, Centre National en Électrochimie et
Technologies Environnementales (CNETE)**

Dépôt initial le 08-08-2024

Dépôt final le 17-11-2024

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire

RÉSUMÉ

Ce mémoire présente une campagne de bioprospection menée dans l'estuaire du fleuve Saint-Laurent pour isoler, identifier et caractériser des souches fongiques potentiellement capables de produire des enzymes ligninolytiques. L'objectif était également de développer des méthodologies et des protocoles adaptés à cette tâche. Les résultats ont révélé que certaines souches, notamment *Pestalotiopsis linearis*, possédaient des capacités prometteuses pour la dégradation des composés lignocellulosiques, dans des conditions se rapprochant des paramètres environnementaux de l'estuaire. Les enzymes laccases produites par cette espèce ont démontré une activité supérieure à l'enzyme de référence de *Trametes versicolor* à des pH plus alcalins et à une plus faible température.

La bioprospection a conduit à l'isolement de 83 souches fongiques filamenteuses, cultivables sur des milieux de culture standard. Un processus de criblage utilisant des milieux sélectifs et des réactifs colorimétriques a permis de sélectionner quatre souches pour une étude approfondie : *Filosporella exilis*, *Pestalotiopsis linearis*, *Graphium rubrum* et *Magnaporthiopsis agrostidis*. Ces souches ont été identifiées par séquençage des régions ITS, et les séquences obtenues ont été comparées aux bases de données publiques telles que GenBank à l'aide du logiciel BLAST. Cette comparaison a permis d'établir l'identité des souches en fonction de leur alignement avec les séquences disponibles.

Les souches sélectionnées ont été caractérisées en termes de cinétiques de croissance, de températures cardinales, de tolérance au pH et à la salinité, ainsi que de préférences nutritionnelles pour diverses sources de carbone et d'azote. *Filosporella exilis* a montré une utilisation efficace du glucose, tandis que *Graphium rubrum* préférait le fructose. *Magnaporthiopsis agrostidis* a démontré une affinité pour des sources de carbone moins courantes, et *Pestalotiopsis linearis* a montré une préférence pour les polyols (types d'alcools). En ce qui concerne les sources d'azote, les acides aminés ont été les plus efficaces pour stimuler la croissance. Pour les sources d'azote simples ou inorganiques, l'urée convenait aux quatre souches, mais *Graphium rubrum* et *Magnaporthiopsis agrostidis* ont montré une meilleure réponse avec les nitrites, tandis que *Filosporella exilis* a mieux utilisé le biuret.

La production d'enzymes ligninolytiques, telles que les cellulases, xylanases, laccases et peroxydases, a été évaluée pour les quatre souches isolées en termes de modèles cinétiques de production enzymatique en fonction du temps. *Pestalotiopsis linearis* s'est démarquée par sa production de laccases, de cellulases et de xylanases. Les enzymes produites ont été comparées à la laccase de référence de *Trametes versicolor*, et *Pestalotiopsis linearis* a montré des isoformes distinctes ou une utilisation du guaiacol comme médiateur, suggérant une diversité fonctionnelle ou une adaptation à différentes conditions environnementales.

La production de laccases par *Pestalotiopsis linearis* en fermentation en milieu solide a également été explorée. Des méthodes ont été développées pour estimer la biomasse fongique en milieu solide en mesurant l'activité des laccases par milligramme d'ergostérol,

ce qui a permis de documenter certaines grandeurs cinétiques en fonction du temps et de la biomasse fongique. Les résultats ont montré que des substrats tels que les boues mixtes de papeteries et les fragments de bouchons de liège pouvaient soutenir la croissance fongique et la production de laccases chez *Pestalotiopsis linearis*.

Cette étude a apporté des contributions significatives à la compréhension de la diversité fonctionnelle des champignons dans les environnements estuariens et a ouvert la voie à de nouvelles applications biotechnologiques des souches fongiques isolées, renforçant le potentiel de la mycotechnologie dans des secteurs variés. En conclusion, ce mémoire a démontré le potentiel des souches fongiques isolées de l'estuaire du fleuve Saint-Laurent pour la production de laccases, tout en proposant des améliorations méthodologiques pour de futures recherches.

Mots clés : Bioprospection ; Souches fongiques ; Enzymes ligninolytiques ; Estuaire du Saint-Laurent ; *Pestalotiopsis linearis*, Laccases ; Caractérisation enzymatique ; fermentation en milieu solide ; Conditions de croissance ; Modèles cinétiques ; Mycotechnologie.

ABSTRACT

This master's thesis presents a bioprospecting campaign conducted in the estuary of the Saint Lawrence River to isolate, identify, and characterize fungal strains with potential for producing ligninolytic enzymes. The objective was also to develop methodologies and protocols tailored to this task. The results revealed that certain strains, particularly *Pestalotiopsis linearis*, exhibited promising capabilities for degrading lignocellulosic compounds under conditions resembling the environmental parameters of the estuary. The laccase enzymes produced by this species demonstrated superior activity compared to the reference enzyme from *Trametes versicolor*, especially at more alkaline pH levels and lower temperatures.

Bioprospecting led to the isolation of 83 filamentous fungal strains, which were successfully cultivated on standard culture media. A screening process using selective media and colorimetric reagents identified four strains for in-depth study: *Filospora exilis*, *Pestalotiopsis linearis*, *Graphium rubrum*, and *Magnaportheopsis agrostidis*. These strains were identified by sequencing the ITS regions and comparing them to public databases like GenBank using BLAST software.

The selected strains were characterized in terms of growth kinetics, cardinal temperatures, tolerance to pH and salinity, as well as nutritional preferences for various carbon and nitrogen sources. *Filospora exilis* efficiently utilized glucose, while *Graphium rubrum* preferred fructose. *Magnaportheopsis agrostidis* showed an affinity for less common carbon sources, and *Pestalotiopsis linearis* exhibited a preference for polyols. For nitrogen sources, various amino acids proved most efficient. Among simple or inorganic nitrogen sources, urea supported the growth of all four strains; however, *Graphium rubrum* and *Magnaportheopsis agrostidis* demonstrated increased absorbance with nitrites, while *Filospora exilis* better utilized biuret.

The production of ligninolytic enzymes including cellulases, xylanases, laccases, and peroxidases was evaluated for the four isolated strains based on enzymatic production kinetics over time. *Pestalotiopsis linearis* stood out for its production of laccases, cellulases, and xylanases. The enzymes produced were compared to the reference laccase from *Trametes versicolor*, with *Pestalotiopsis linearis* showing distinct isoforms or utilizing guaiacol as a mediator, suggesting functional diversity or adaptation to varying environmental conditions.

The production of laccases by *Pestalotiopsis linearis* in solid-state fermentation was also explored using substrates composed of residual materials. Methods were developed to estimate fungal biomass in solid media by measuring laccase activity per milligram of ergosterol. These methods documented kinetic parameters over time and fungal biomass

accumulation. The results indicated that substrates such as mixed papermill sludge and cork stoppers could support fungal growth and laccase production in *Pestalotiopsis linearis*. However, fresh papermill sludge was more effective for biomass production compared to sludge stored for six months.

This study has made significant contributions to understanding the functional diversity of fungi in estuarine environments and has opened new avenues for biotechnological applications using these isolated fungal strains. It reinforces the potential of mycotechnology across various sectors. In conclusion, this master's thesis has demonstrated the potential of fungal strains isolated from the Saint Lawrence River estuary for laccase production while proposing methodological improvements for future research.

Keywords: Bioprospecting; Fungal strains; Ligninolytic enzymes; Saint Lawrence Estuary; *Pestalotiopsis linearis*; Laccases; Enzymatic characterization; Solid-state fermentation; Growth conditions; kinetic models; Mycotechnology.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iv
ABSTRACT	vi
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xvi
LISTE DES SYMBOLES	xviii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 Valorisation des matières lignocellulosiques par fermentation de mycètes filamenteux en milieu solide : Principes, défis et perspectives biotechnologiques des enzymes ligninolytiques	3
1.1 LA FERMENTATION EN MILIEUX SOLIDES (FMS).....	7
1.1.1 Principe et définition.....	7
1.1.2 Comparaison entre les procédés de fermentation en milieu solide et liquide.....	9
1.1.3 Facteurs importants en fermentation solide	11
1.1.4 Les voies et stratégies d'optimisation en FMS	22
1.1.5 Intégration des procédés FMS dans un contexte de bioraffinerie.....	23
1.2 LA LIGNOCELLULOSE ; UNE MATRICE POUR LES ORGANISMES PRODUCTEURS D'ENZYMES DE MODIFICATION DE LA LIGNINE	27
1.2.1 Composition des matières lignocellulosiques.....	27
1.2.2 Les lignines en biotechnologie.....	31
1.2.3 Les processus enzymatiques impliqués dans la dégradation primaire des matières lignocellulosiques.....	34
1.2.4 Identification des microorganismes producteurs d'enzymes de modification de la lignine	36
1.2.5 Les enzymes EML	40

1.3	LA SÉLECTION DES SOUCHES DE MICROORGANISMES	56
1.4	CONCLUSION.....	59
CHAPITRE 2 Bioprospection et Criblage de Mycètes Filamenteux issus de l'Estuaire du Fleuve Saint-Laurent.....		60
2.1.2	Isolement sur milieux sélectifs	64
2.1.3	Criblage	66
2.1.4	Caractérisation physiologique des souches fongiques	70
2.1.5	Profil d'absorption de diverses sources de carbone et d'azote, plage de pH et halotolérance	71
2.1.6	Détermination des températures cardinales de croissance	72
2.2	RÉSULTATS ET DISCUSSION	74
2.2.1	Échantillonnage et isoléments des mycètes filamenteux.....	74
2.2.2	Évaluation de la croissance sur différents milieux	77
2.2.3	Identification.....	79
2.2.4	Caractérisation physiologique	86
2.3	CONCLUSION.....	103
CHAPITRE 3 Caractérisation d'enzymes de modification des lignines produites par des mycètes filamenteux isolés dans l'estuaire ou les berges du fleuve Saint-Laurent.....		104
3.1	INTRODUCTION	104
3.2	MATERIEL ET METHODE	106
3.2.1	Cinétique de production sur 18 jours de quatre enzymes associées à l'attaque de matières lignocellulosiques.....	106
3.2.2	Production et purification des cocktails enzymatiques pour la caractérisation des enzymes de modification des lignines	109
3.3	RESULTATS ET DISCUSSION	112
3.3.1	Masse inoculum.....	112
3.3.2	Cinétique de croissance et de la production de protéines en 18 jours	113
3.3.3	Cinétiques de production de quatre enzymes associées à la dégradation des matières lignocellulosiques	124
3.3.4	Résultats quantification des protéines (enzymes concentré) et estimation de l'activité enzymatique des laccases de <i>Pestalotiopsis linearis</i>	129
3.3.5	Caractérisation des laccases concentrées.....	133
3.4	CONCLUSION.....	138

CHAPITRE 4 Production de laccases sur matières résiduelles par <i>Pestalotiopsis linearis</i> en biofermentation solide.....	140
4.1 INTRODUCTION.....	140
4.2 MATERIEL ET METHODE	141
4.2.1 Préparation des matières résiduelles lignocellulosiques et montage du dispositif expérimental.....	141
4.3 RESULTATS ET DISCUSSION.....	150
4.3.1 Analyse des matières résiduelles	150
4.3.2 Suivi qualitatif des biomasses fongiques	154
4.3.3 Dosage des concentrations en ergostérol	159
4.3.4 Dosage de l'activité laccase	164
4.4 CONCLUSION	167
CONCLUSION GÉNÉRALE	169
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	173
ANNEXES 1	188
EXEMPLE DE CALCUL UTILISÉ POUR LES POINTAGES NORMALISÉS	188

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de métabolites produits en plus grande quantité en FMS qu'en FML.....	10
Tableau 2 : Composition des matières lignocellulosiques.....	29
Tableau 3 : Exemples de souches reconnues pour produire les molécules ciblées	56
Tableau 4 : Répartition des sites d'échantillonnages.....	74
Tableau 5 : Origine des souches isolées	75
Tableau 6 : Pointage normalisé par souche	77
Tableau 7 : Moyenne de croissance radiale (mm) et réaction gaïacol à 18±1°C sur quatre milieux de culture en 14 jours	78
Tableau 8 : Identification moléculaire des souches	81
Tableau 9 : Origine des échantillons des souches retenues	82
Tableau 10 : Classification scientifique de <i>G.rubrum</i>	82
Tableau 11 : Classification scientifique de <i>F.exilis</i>	83
Tableau 12 : Classification scientifique de <i>M.agrostidis</i>	84
Tableau 13 : Classification scientifique de <i>P.linearis</i>	84
Tableau 14: Valeurs d'absorbance de différentes sources de carbone et d'azote pour les souches fongiques sélectionnées.....	94
Tableau 15 : Effets des électrolytes sur l'absorbance en fonction des concentrations pour <i>Filospora exilis</i>	97
Tableau 16 : Effets des électrolytes sur l'absorbance en fonction des concentrations pour <i>Pestalotiopsis linearis</i>	98
Tableau 17 : Effets des électrolytes sur l'absorbance en fonction des concentrations pour <i>Graphium rubrum</i>	99
Tableau 18 : Effet du pH sur le développement des souches fongiques.....	100

Tableau 19 : Masse d'inoculum par millilitre (mL) de solution d'inoculation	112
Tableau 20 : Résumé des effets d'une modification de la constance K	123
Tableau 21 : Activité enzymatique des laccases par litre (L) et par milligramme (mg) de protéines des extraits concentrés et de la solution brute.	132
Tableau 22 Ingrédients des substrats pour les essais en milieux solides	145
Tableau 23 Classes de pourcentage de densité utilisées selon les traitements	148
Tableau 24 Analyse des boues mixtes de papetière	151
Tableau 25 Facteurs de conversion utilisés	152
Tableau 26 Analyses du pH et de la conductivité des boues selon la fraîcheur	153
Tableau 27 : Comparaison de la constante K entre les courbes exponentielles avec plateau ou de Gompertz	158
Tableau 28 : Concentration en ergostérol par mg de matière sèche	160
Tableau 29 : Comparaison des concentrations en ergostérol en fonction du type de substrat.	161
Tableau 30 : Effet de la phase de croissance sur la concentration en ergostérol	162
Tableau 31 : Résultats du dosage des laccases par ABTS et AmplexRed™ en fonction des masse sèches et des protéines (BSA)	164
Tableau 32 : Calcul des activités par mg d'ergostérol	165

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Nombre de brevets déposés mondialement concernant la fermentation FMS	8
Figure 2: Exemples de systèmes de fermentation en milieux solides sur supports inertes	15
Figure 3: Représentation d'un système de colonnes de Raimbault	17
Figure 4: Fermenteur Koji moderne et fermenteur non stérile avec agitation conçu par INRA à Dijon en France.....	20
Figure 5: Fermenteur horizontal avec palmes d'agitation	21
Figure 6: Exemple d'une chaîne de produits issus du bois en bioraffinerie.....	23
Figure 7: Étapes de bioraffinage avec intégration SSF.....	24
Figure 8: Diminution théorique des étapes de production en FMS	25
Figure 9: Structure de la paroi d'une cellule de bois.....	27
Figure 10: Représentation des trois principaux monolignols	30
Figure 11: Représentation d'une lignine type (adapté de Wertz, 2010)	31
Figure 12: Sous-produits issus de lignines et glucanes.....	33
Figure 13: Mécanisme de dégradation de la lignine subjacente à l'action des cellulases et xylanases (adapté de Dashtban et al., 2010)	35
Figure 14: Actions enzymatiques des LME de dégradation de la lignine (adapté de Janusz et al., 2017)	41
Figure 15: Configuration type des cuivres dans une laccase (adapté de Agrawal et al., 2018).....	42
Figure 16: Mécanisme d'action des laccases et du système laccase-médiateur	44
Figure 17 : Réactions chimiques catalysées par une laccase (adapté de Peralta et al., 2017).....	45
Figure 18: Protoporphyrine IX	47

Figure 19: Modèle de réaction chimique des lignines peroxydases (adapté de Dashtban et al., 2010)	49
Figure 21: Modèle de réaction chimique des lignines peroxydases.....	51
Figure 22: Schématisation du mécanisme d'action des chélates de Mn(III) et d'acides organiques dans la formation de radicaux (adapté de Hofrichter 2002).....	52
Figure 23: Avantages et potentiels des laccases en biotechnologies	55
Figure 24 : Localisation des sites d'échantillonnages	63
Figure 25 : Mesure de croissance radiale en boîte de Petri	68
Figure 26 : Réaction de coloration du gaïacol en présence d'enzymes de modification des lignines	75
Figure 27 : Comparaison de la croissance entre les espèces en 6 jours en fonction de la température d'incubation	87
Figure 28 à 33: Cinétique de croissance radiale par espèce en 6 jours en fonction de la température	88
Figure 34 : Cinétique de la masse fongique sèche et protéines en solution pour <i>Pleurotus ostreatus</i>	114
Figure 35 : Cinétique de la masse fongique sèche et protéines en solution pour <i>Graphium rubrum</i>	116
Figure 36 : Cinétique de la masse fongique sèche et protéines en solution pour <i>Filosporella exilis</i>	117
Figure 37: Cinétique de la masse fongique sèche et protéines en solution pour <i>Pestalotiopsis linearis</i>	119
Figure 38: Cinétique de l'activité des cellulases sur 18 jours.	126
Figure 39: Cinétique de l'activité des xylanases sur 18 jours.	127
Figure 40: Cinétique de l'activité des peroxydases sur 18 jours.	128
Figure 41: Cinétique de l'activité laccase sur 18 jours.	129
Figure 42: Température cardinale des laccases de <i>Pestalotiopsis linearis</i>	134
Figure 43: Température cardinale des laccases de <i>Trametes versicolor</i>	135
Figure 44: pH cardinaux des laccases de <i>Pestalotiopsis linearis</i>	136

Figure 45: pH cardinal de la laccase de <i>Trametes versicolor</i>	137
Figure 46: Les matières résiduelles utilisées.	143
Figure 47: Grille d'analyse qualitative de la croissance mycélienne.....	147
Figure 48: Exemple de classes de densité de mycélium estimé visuellement	148
Figure 49: Cinétique de croissance par estimation qualitative	155

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
abs	Absorbance
ATP	Adenosine Triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
C/N	Ratio carbone : azote
DCW	Dry Cell Weight
DyP	Dye-decolorizing peroxidases
EML	Enzymes de Modification des Lignines
FML	Fermentation en Milieux Liquide
FMS	Fermentation en Milieux Solide
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ITS	Internal Transcribed Spacer
Lac	Laccase
LDA	lignin-degrading auxiliary
LiP	Lignine Peroxydase
MnP	Manganese Peroxidase
OD	Optical Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar

pm	Phenotype MicroArray
RBBR	Remazol Brilliant Blue R
rDNA	Ribosomal DNA
TCA	Trichloroacetic Acid
VP	Versatile Peroxidase
YMA	Yeast Malt Agar

LISTE DES SYMBOLES

%	Pourcentage, utilisé pour les concentrations.
°C	Degré Celsius
a_w	Activité de l'eau
g/L	Grammes par litre
H	Heure
L	Litre
mM	Millimolaire
mg	Milligramme
mol	Mole
µg	Microgramme
nm	Nanomètre
U/L	Unités d'activité enzymatique par litre
U/mL	Unités d'activité enzymatique par millilitre
µU/L	Micro-unités d'activité enzymatique par litre.
µU/mL	Micro-unités d'activité enzymatique par millilitre

INTRODUCTION

Le monde contemporain, caractérisé par un besoin croissant de solutions durables et écologiques pour faire face aux défis environnementaux et industriels, se tourne de plus en plus vers les biotechnologies comme vecteur d'innovation. Dans ce contexte, les mycotechnologies, soit l'utilisation des mycètes (champignons) en biotechnologies, offrent un potentiel important pour le développement de procédés industriels verts, la dépollution de sites contaminés et la production de molécules à haute valeur ajoutée à partir de biomasses résiduelles. C'est dans cette perspective que s'inscrit ce mémoire de maîtrise.

Ce projet trouve ses racines dans un parcours académique et professionnel singulier. Fort d'une expérience de quinze années en recherche appliquée au sein de Biopterre, un centre collégial de transfert technologique, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec des chercheurs passionnés et d'acquérir une base solide de connaissances et d'expériences en myciculture et en mycotechnologies. Ces expériences, combinées au soutien essentiel de ma direction de recherche à l'UQAR, ont rendu possible la concrétisation de ce mémoire.

Afin de contribuer activement au développement de ce champ d'étude, il est indispensable d'utiliser des méthodes et techniques éprouvées spécifiquement pour les mycètes, en particulier pour les mycètes filamenteux. Les particularités physiologiques de ces organismes nécessitent souvent la modification ou la réévaluation d'approches initialement conçues pour d'autres microorganismes afin d'en accroître l'efficacité ou la pertinence.

L'objectif principal de cette étude exploratoire est de mettre en œuvre, perfectionner et identifier des voies d'optimisation des techniques et méthodes employées avec les souches fongiques. C'est pourquoi il a été jugé pertinent de couvrir un large éventail d'étapes de manière succincte ; les tendances observées pourront être corroborées ultérieurement avec

des données statistiques plus robustes lors de futures recherches. Les phases de bioprospection, de sélection et de caractérisation des souches fongiques, ainsi que de quantification, d'analyse et de production de métabolites spécifiques issus de ces souches, sont abordées dans cette étude.

À la suite d'échanges avec des acteurs industriels et des partenaires de recherche de Biopterre, l'accent a été mis sur l'importance des enzymes de modification des lignines. Ces enzymes offrent des perspectives prometteuses pour l'établissement de procédés industriels plus écologiques, la mise en valeur de biomasses résiduelles et la réhabilitation de sites altérés ou dégradés. L'objectif est de sélectionner des souches fongiques produisant des enzymes qui conservent leur activité dans des conditions de basse température, de pH élevé et en présence de stress osmotique accru, comparativement aux enzymes commerciales actuellement disponibles. Le choix de l'estuaire maritime du fleuve Saint-Laurent comme zone de bioprospection s'est avéré stratégique en raison de sa biodiversité fongique encore méconnue et des caractéristiques spécifiques des enzymes recherchées. Cette initiative permettra également d'enrichir les connaissances sur la biodiversité de cet habitat.

Le mémoire se structure autour de quatre chapitres principaux. Le Chapitre 1 est consacré à une revue de la littérature, exposant les principes et méthodes de fermentation solide, les mycètes filamenteux et les principales enzymes associées à l'attaque des matières lignocellulosiques ainsi que leurs caractéristiques. Le Chapitre 2 détaille les étapes de bioprospection, de l'échantillonnage à la caractérisation des souches fongiques sélectionnées. Le Chapitre 3 traite des cinétiques de production, de la purification partielle des enzymes et de leurs activités en fonction de la température et du pH. Le chapitre 4 aborde la fermentation sur des substrats composés de matières résiduelles, de la vitesse de croissance et de l'estimation des biomasses fongique en substrats solides.

CHAPITRE 1

VALORISATION DES MATIERES LIGNOCELLULOSIQUES PAR FERMENTATION DE MYCETES FILAMENTEUX EN MILIEU SOLIDE : PRINCIPES, DEFIS ET PERSPECTIVES BIOTECHNOLOGIQUES DES ENZYMES LIGNINOLYTIQUES

Dans un contexte où les solutions durables et écologiques sont devenues essentielles pour répondre aux défis environnementaux et industriels, les biotechnologies jouent un rôle de plus en plus central dans l'innovation. Parmi ces approches, la fermentation en milieu solide (FMS) se distingue comme une alternative prometteuse aux procédés classiques de fermentation liquide, notamment pour la valorisation des matières résiduelles lignocellulosiques. La FMS présente plusieurs avantages, tels qu'une consommation réduite d'eau et d'énergie, une meilleure tolérance aux conditions environnementales extrêmes et une production accrue de certains métabolites secondaires. Cette revue de littérature explore les principes, les défis et les applications potentielles de la FMS, avec un accent particulier sur la production de molécules à haute valeur ajoutée telles que les enzymes.

En 2019, le gouvernement du Québec a publié un plan d'action visant à poursuivre la mise en œuvre de sa politique de gestion des matières résiduelles, mettant l'accent sur la maximisation de la réutilisation des déchets et la minimisation des résidus non valorisables (Gouvernement du Québec 2011). Un élément stratégique clé de ce plan est le bannissement des matières organiques des sites d'enfouissement. Les déchets organiques augmentent considérablement notre empreinte environnementale, réduisent la durée de vie des sites d'enfouissement et représentent une perte de ressources précieuses. Les résidus lignocellulosiques sont particulièrement sous-utilisés en raison de leur rapport carbone/azote (C/N) élevé, limitant l'action des microorganismes dans les processus de compostage ou de gazéification (RECYC-QUÉBEC, 2015, Giroux, 2014).

Les procédés de fermentation en milieu solide (FMS) pourraient fournir une solution partielle en permettant l'utilisation d'une grande variété de matières résiduelles pour la

production de molécules à haute valeur ajoutée telles que les enzymes (Gassara 2012). Contrairement aux méthodes de fermentation en milieu liquide, la FMS nécessite peu de conditionnement des biomasses en amont, réduisant le besoin de solubilisation ou de dilution élevée. Cette méthode permet l'utilisation et la valorisation de matières résiduelles peu transformées, consommant moins d'eau et d'énergie (Glassey & Ward 2015).

En plus d'un rapport C/N défavorable à l'action des microorganismes recycleurs, les résidus lignocellulosiques riches en lignine, un polymère complexe composé de monolignols phénoliques liés par des liaisons covalentes variées et non répétitives, posent également des défis à la dégradation microbienne car leur attaque biologique nécessite la production d'enzymes à potentiel redox. Elevé. Ces enzymes ligninolytiques, au large spectre d'action, capables de modifier les lignines (EML), offrent un potentiel important pour diverses applications industrielles (Manan & Webb 2017). Parmi ce groupe d'enzymes, celles produites par les mycètes présentent un potentiel redox élevé, permettant la dégradation d'une large gamme de composés persistants récalcitrants tels que les molécules phénoliques aromatiques, les pesticides, les colorants et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Elles offrent également un potentiel considérable en biotechnologie pour la production de molécules à haute valeur ajoutée ou pour la décontamination de sites et de matériaux (Agrawal et al. 2018).

Bien que les EML d'origine fongique aient un potentiel biotechnologique significatif, leur production à grande échelle en fermentation liquide est limitée. Les milieux liquides, adaptés aux bactéries et levures, ne sont pas optimaux pour les mycètes filamenteux, entraînant une faible productivité et des coûts de production élevés (Peralta et al. 2017). En revanche, ces microorganismes sont bien adaptés aux conditions de la FMS et montrent des rendements de production d'EML plus élevés dans ces conditions (Valette 2018). Parmi les mycètes filamenteux, les champignons de pourriture blanche sont reconnus comme des producteurs d'EML particulièrement efficaces, adaptés à la culture en milieu solide ou à faible activité en eau (a_w). Il existe cependant une grande variabilité des paramètres favorisant la production entre les souches, y compris au sein d'une même espèce (Miyazawa et al.

2016). Il en va de même pour les activités enzymatiques, les valeurs cardinales d'efficacité (pH et température) ainsi que le profil (constituant) du cocktail d'enzymes produits. La sélection de microorganismes adaptés aux objectifs de production constitue donc une étape clé pour la sélection ou l'amélioration génétique de souches destinées à une utilisation spécifique (Wertz et al. 2017).

Plusieurs EML d'origine fongique actuellement disponibles présentent des températures cardinales relativement élevées ($>50^{\circ}\text{C}$) et des pH optimaux assez faibles (<8) (Tuisel et al. 1990, Hofrichter 2002). De nouvelles souches de microorganismes pouvant produire un maximum d'enzymes à un faible coût énergétique sont actuellement en grande demande (Agrawal et al. 2018a). De plus, des enzymes efficaces à de basses températures en conditions de salinité et de pH élevés pourraient permettre de diminuer la consommation énergétique ou d'augmenter l'efficacité de procédés industriels ou de bioremédiation là où les autres enzymes sont peu efficaces. De telles conditions de production pourraient aussi permettre de réduire les coûts de production par l'utilisation de supports ou substrats plus sélectifs (Agrawal et al. 2018a).

Ce projet de maîtrise vise donc la bioprospection et la sélection de souches fongiques produisant des EML qui pourraient maintenir leur activité dans des conditions telles que des basses températures, un pH élevé et un stress osmotique accru. L'estuaire du fleuve Saint-Laurent, avec sa biodiversité unique et ses conditions environnementales particulières, constitue un site de bioprospection idéal pour isoler des souches fongiques susceptibles de présenter ces propriétés enzymatiques. Cette initiative permettra non seulement d'avancer les applications biotechnologiques, mais aussi d'enrichir notre compréhension de la biodiversité fongique de cet habitat et de mettre en évidence l'existence de tels organismes.

Or, la mise en place d'une campagne de bioprospections efficace nécessite l'appropriation et l'application de techniques et de méthodes adaptées aux types d'organismes recherchés et aux critères de sélections. La recherche de souches fongiques cultivables produisant des EML dans un environnement comme celui de l'estuaire du fleuve Saint-Laurent est peu commune et nécessite l'utilisation de protocoles qui y sont adaptés.

De plus, la mise en œuvre de procédés FMS présente plusieurs défis, particulièrement lors de la mise à l'échelle de la production, ce qui implique de bien comprendre les paramètres liés aux cinétiques de croissance et de production enzymatique des souches fongiques sélectionnées pour les conditions de production envisagées.

La revue de littérature présentée dans ce chapitre est structurée en trois sections principales. La première section offre un aperçu des principes et des méthodes de la FMS. La deuxième détaille les caractéristiques des matières lignocellulosiques ainsi que des microorganismes et des enzymes responsables du recyclage de ces matières, tandis que la troisième section traite de la sélection des microorganismes pour la production d'EML en FMS.

1.1 LA FERMENTATION EN MILIEUX SOLIDES (FMS)

1.1.1 Principe et définition

La fermentation en milieux solides (FMS) est définie comme une fermentation biologique réalisée avec peu ou pas d'eau libre. Ce principe diffère des techniques de fermentation plus courantes qui se déroulent en milieux liquides (FML) (Pandey et al. 1999, Soccol & Vandenberghe 2003, Singh 2009, Singhania et al. 2009). La fermentation peut se faire avec ou sans oxygène, cependant cette revue se concentrera sur la fermentation aérobie en raison des microorganismes et métabolites ciblés. Les matrices ou substrats utilisés pour la production peuvent servir de support pour les microorganismes ou de source de nutriments. Le support de fermentation peut également être composé de matières synthétiques (perlite, nylon, etc.) alimentées par une solution nutritive.

Le principe de la fermentation en milieu solide n'est pas nouveau. En fait, il s'agit de techniques d'une importance capitale pour l'humanité depuis des milliers d'années, notamment pour la fabrication du pain, du fromage ou des Koji (un terme englobant l'ensemble des fermentations de ce type) (Pandey et al. 1999).

La fermentation en milieu solide reste un segment important de l'industrie agroalimentaire en Asie. Plus de 80% des boissons et aliments fermentés en Chine (Koji) sont produits de cette manière. Il est également important de mentionner la production de champignons pour l'alimentation, un secteur significatif qui s'apparente fortement à la FMS.

En Occident, l'attention se porte davantage sur les techniques FMS pour la production de biomolécules et de produits recherchés par diverses industries, notamment l'agroalimentaire, le pharmaceutique, la biochimie et l'ingénierie, la production bioénergétique (biomasse, éthanol, etc.), ainsi que la bioremédiation des sols et des eaux usées (Soccol & Vandenberghe 2003).

Les méthodes et équipements de fermentation en milieu solide sont variés et évoluent rapidement, comme en témoigne le nombre important de nouveaux brevets déposés

mondialement, la Chine étant en tête avec 54% des brevets. Il est important de préciser qu'une proportion significative de ces brevets concerne des applications alimentaires (Soccol et al. 2017).

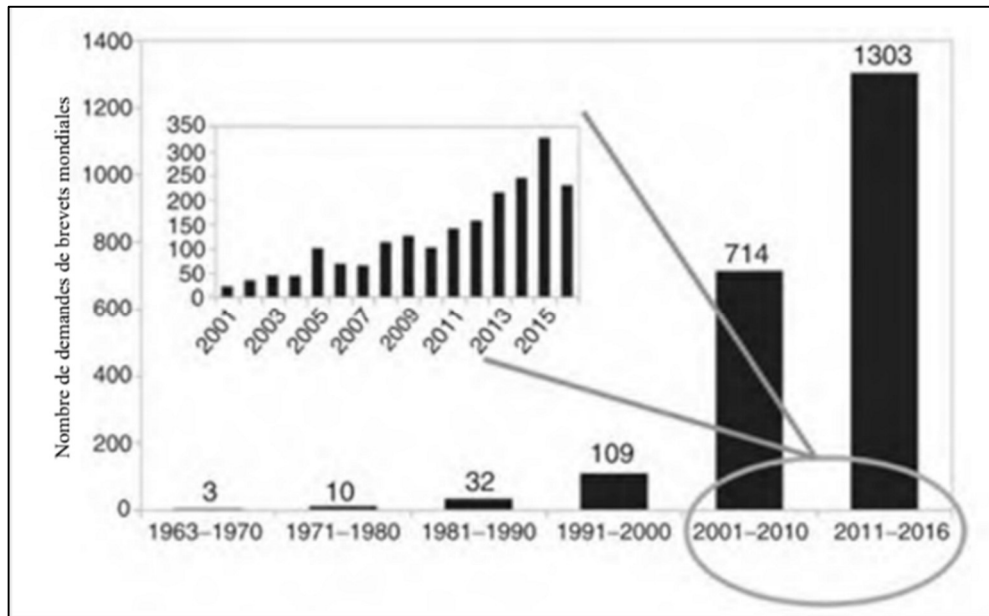


Figure 1: Nombre de brevets déposés mondialement concernant la fermentation FMS (Adaptée de Soccol et al., 2017)

Avec de tels chiffres et en tenant compte du nombre important de nouvelles publications traitant de ce principe de production, il est légitime de se demander pourquoi un tel engouement pour des méthodes millénaires apparaît de nos jours. L'industrialisation a favorisé la fermentation en milieu liquide (FML) en raison de sa facilité de standardisation à une échelle industrielle. Cependant, les limites et les coûts associés à la FML ont conduit à une réévaluation de la FMS pour ses avantages en termes de durabilité et d'efficacité (Soccol & Vandenberghe 2003). Les avantages de la FMS incluent la consommation réduite d'eau et d'énergie, ainsi que sa capacité à utiliser des résidus agro-industriels pour produire des produits de valeur ajoutée comme les enzymes et les composés bioactifs. Les préoccupations croissantes concernant la durabilité environnementale et la sécurité alimentaire ont également

favorisé un retour aux techniques de fermentation en milieu solide, qui répondent mieux à ces enjeux contemporains (Verduzco-Oliva & Gutierrez-Urbe 2020).

1.1.2 Comparaison entre les procédés de fermentation en milieux solide et liquide

Bien qu'il s'agisse de principes millénaires, à partir de 1940, l'attention portée aux procédés de FMS a fortement diminué en Occident avec l'émergence des techniques de production en FML. À cette époque, des médicaments tels que la pénicilline, qui étaient auparavant produits sur des substrats solides, ont pu être produits à plus grande échelle en milieu liquide (Singhania et al. 2009).

La fermentation en milieu liquide présente des avantages significatifs et permet l'utilisation de microorganismes naturellement bien adaptés aux environnements avec une activité de l'eau (a_w) élevée, comme les bactéries et les levures. Il s'agit d'un critère crucial pour la croissance et le métabolisme de ces microorganismes, leur permettant de prospérer de façon optimale en milieux liquides. La FML offre une plus grande uniformité de la matrice de production et un meilleur contrôle instrumental des paramètres tels que le pH, l'oxygène dissous, la température et la concentration de certaines molécules dissoutes. De plus, la séparation des microorganismes du milieu de culture est plus simple, et la mise à l'échelle est plus facile et mieux documentée (Farinas 2015).

Cependant, dans le contexte actuel, la FMS est susceptible de répondre à certaines problématiques sociétales, telles que la gestion durable des matières résiduelles. Son utilisation comme matrice ou support de fermentation pour la production de bioproduits à valeur ajoutée nécessite souvent peu de conditionnement, ce qui permet de diminuer considérablement les coûts de production liés au substrat (matrice de production), un élément pouvant être limitant pour la production de molécules à grande échelle (Wertz et al. 2017). Parmi les avantages de la FMS, on peut citer la consommation réduite d'eau et d'énergie (stérilisation, etc.), la diminution des risques de contaminations bactériennes, l'élimination

de la nécessité d'utiliser des solvants organiques (réduisant les risques de toxicité des extraits) et la diminution des investissements initiaux et des coûts d'opération¹. De plus, les conditions de culture en FMS se rapprochent davantage des conditions de croissance naturelle des mycètes et des levures, ce qui pourrait expliquer la production en plus grande quantité de plusieurs métabolites. Un avantage indéniable de la FMS, avec les microorganismes appropriés, est qu'elle permet de s'attaquer plus directement (i.e. sans prétraitement) à des macromolécules et autres matières non-solubles dans l'eau. La lignine en est un excellent exemple, car certains champignons filamenteux peuvent dégrader directement ce polymère complexe en FMS, alors qu'un prétraitement serait nécessaire en fermentation liquide (Soccol et al., 2017).

Tableau 1 : Exemples de métabolites produits en plus grande quantité en FMS qu'en FML (adapté de Hölker & Lenz, 2005).

Produit	Microorganisme
6-pentyl-alpha-pyrone	<i>Trichoderma harzianum</i>
Bafilomycin B1 + C1	<i>Streptomyces halstedii</i>
Acide benzoïque	<i>Bjerkandera adusta</i>
Alcool benzylique	<i>Bjerkandera adusta</i>
Cephameycine C	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Arôme de noix de coco	<i>Trichoderma sp.</i>
Alcaloïdes de l'ergot	<i>Claviceps fusiformis</i>
Acide gibbérellique	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Iturine	<i>Bacillus subtilis</i>
Ochratoxine	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Oxytétracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>
Pénicilline	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Rifamycine-B	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>
Tétracycline	<i>Streptomyces viridifaciens</i>

Des rendements plus élevés en FMS pour la production de plusieurs enzymes tels que les amylases, pectinases, xylanases, cellulases, chitinases, protéases, lipases et β -galactosidases (Martins et al. 2011), ainsi que les peroxydases et laccases (Rodríguez Couto & Sanromán 2005, Kulkarni et al. 2017) par des mycètes filamenteux ont également été observés.

Il est cependant important de noter que la majorité de ces affirmations reposent sur des essais *in vitro*. Un des principaux obstacles à une utilisation accrue de la fermentation en milieu solide en contexte industriel est la difficulté de mise à l'échelle des procédés (Soccol et al., 2017). Ces difficultés sont principalement liées à la gestion et à l'uniformisation de la chaleur générée par le métabolisme rapide des microorganismes. Contrairement aux systèmes de fermentation en milieu liquide, les substrats solides ne transfèrent pas facilement la chaleur générée, ce qui peut causer des poches de chaleur nocives pour les microorganismes responsables de la fermentation. Cet effet est exacerbé par une augmentation de la masse fermentée. De plus, la diversité des procédés utilisés lors de la mise à l'échelle rend la comparaison et la reproductibilité des études difficiles (Singhania et al. 2009).

1.1.3 Facteurs importants en fermentation solide

Les trois facteurs principaux ayant le plus d'influence sur les procédés de fermentation solide sont les microorganismes utilisés, la nature du support ou de la matrice de production, ainsi que le type d'équipement de fermentation. Dans tous les cas, le choix du type de bioréacteurs (fermenteurs) dépend du produit final désiré. Le choix des microorganismes peut se faire en fonction de la biomasse utilisée ou, au contraire, la biomasse peut être choisie et amendée en fonction du ou des microorganismes choisis (Soccol et al., 2017).

En plus de ces facteurs, les conditions de fermentation, telles que la température, le pH, et l'humidité, jouent également un rôle crucial dans la réussite des procédés de fermentation solide. Ces conditions doivent être optimisées pour chaque combinaison spécifique de microorganismes et de substrats pour maximiser la production de bioproduits. Par conséquent, il est souvent nécessaire de rechercher des organismes dans des environnements particuliers, comme le Saint-Laurent, où les conditions naturelles peuvent favoriser la sélection de microorganismes adaptés à des conditions de fermentation particulières. Ces microorganismes peuvent posséder des caractéristiques uniques qui les rendent particulièrement efficaces dans des procédés de fermentation spécifiques (Rodr & Sanrom 2005, Singhanian et al. 2009).

1.1.3.1 Les microorganismes

En plus d'être guidé par le type de biomasse, le choix des microorganismes est évidemment réalisé en fonction des produits de fermentation désirés. Une grande variété de microorganismes peut s'adapter à des procédés de FMS. Les mycètes, dont certaines levures, ainsi que certaines espèces bactériennes en font partie. Cependant, les champignons filamenteux et les levures sont actuellement les microorganismes les plus fréquemment utilisés en FMS en raison de leur propension à croître dans des milieux avec une faible activité de l'eau (a_w). Pour les champignons filamenteux, la présence ou non d'hyphes septés peut également orienter le choix du microorganisme ou de la technique de production. Cette caractéristique morphologique influence directement la résistance au cisaillement des microorganismes, les hyphes non septés étant plus sensibles à ce stress lors de l'agitation du substrat (Pandey et al. 1999).

Les microorganismes sont une composante cruciale dans les procédés de fermentation, et beaucoup d'innovations sont attendues dans ce domaine dans les prochaines années. L'optimisation des microorganismes peut conduire à des rendements plus élevés et à une meilleure efficacité dans la production de bioproduits, ainsi qu'à la découverte de nouveaux

composés avec des applications potentielles en médecine, agriculture, et industrie alimentaire (Rodríguez Couto & Sanromán 2005). De plus, les procédés basés sur les microorganismes peuvent être plus durables et écologiques, répondant ainsi aux défis environnementaux et à la demande croissante en ressources renouvelables (Thomas et al. 2013, Verduzco-Oliva & Gutierrez-Urbe 2020).

La majorité des travaux de recherche actuels se basent sur des souches déjà présentes en collection, ce qui est avantageux pour la reproductibilité des essais. Cependant, les études visant l'isolement de nouvelles souches, en fonction de caractéristiques spécifiques comme la production de certaines molécules ou l'adaptation à des environnements particuliers, réussissent souvent à identifier des souches avec un potentiel supérieur. Ces nouvelles souches peuvent offrir des conditions optimales de pH et de température, surpassant ainsi celles déjà utilisées pour certains procédés donnés (Niladevi & Prema 2005, Singhania et al. 2009).

À la suite de la sélection de nouvelles souches présentant les caractéristiques attendues, beaucoup de travaux peuvent encore être réalisés afin d'améliorer davantage la production ou la résistance à certaines conditions environnementales. Ces améliorations peuvent être réalisées par sélection de croisements dirigés sexués, par fusion de dicaryons avec ou sans facteurs de mutation, ou encore à l'aide des outils issus du génie génétique. Ces techniques permettent de développer des souches présentant une meilleure stabilité thermique et une activité enzymatique accrue (Hibbert & Dalby 2005, Nirantar 2021).

1.1.3.2 La matrice ou support de culture

Le choix de la matrice ou du substrat de culture est crucial et peut grandement influencer la production des composés d'intérêt. Celui-ci doit présenter des caractéristiques favorables à la croissance des microorganismes et être disponible à faible coût. Plusieurs matières résiduelles lignocellulosiques répondent à ces critères. Une autre caractéristique

pertinente du substrat est sa sélectivité. En effet, un substrat limitant la croissance de nombreux microorganismes, mais pas celle de ceux utilisés pour la fermentation, peut fortement réduire les coûts de production en diminuant ou en éliminant le besoin de stérilisation (Patent No. 9,914,906, 2016 ; Rodríguez Couto & Sanromán, 2005).

D'autres aspects importants à considérer lors de la sélection de biomasses comme matrices de production sont la granulométrie, les prétraitements nécessaires, l'activité de l'eau (a_w), les nutriments, et la présence de substances inhibitrices (Farinas, 2015). Cependant, le facteur le plus important est l'ajustement et le contrôle du niveau d'humidité en fonction des besoins des microorganismes sélectionnés : généralement, ce taux sera situé entre 30 % et 85 % pour éviter la sporulation de certains organismes ou pour que le transfert de l'oxygène ne soit pas limitant (Singhania et al. 2009).

Bien que cet aspect ne soit pas directement lié à l'objet de cette étude, il est pertinent de mentionner que certaines techniques de fermentation en milieu solide (FMS) ont été développées pour utiliser un substrat inerte servant uniquement de support, auquel est ajoutée une solution nutritive. La Figure 2, ci-dessous présente quelques-uns de ces systèmes.

Système à lit fixe : Ce type de réacteur utilise un substrat inerte ou non-inerte disposé en couches fixes. L'air est diffusé par le bas à travers le substrat, permettant l'aération nécessaire pour la croissance des microorganismes. Ce système est simple et permet un bon contrôle des conditions d'aération, mais peut présenter des gradients d'humidité et de nutriments dans le lit.

Système à lit fluidisé : Dans ce réacteur, l'air est insufflé avec suffisamment de force pour soulever partiellement ou totalement les particules du substrat, créant ainsi un environnement plus homogène. Ce système permet une meilleure distribution des nutriments et de l'oxygène, réduisant les gradients internes.

Système rotatif : Ce réacteur utilise un tambour rotatif contenant le substrat inerte. La rotation permet de mélanger régulièrement le substrat et d'assurer une meilleure homogénéité

en termes d'humidité et d'aération. Ce type de réacteur favorise également une meilleure croissance microbienne sur toute la surface du support.

L'intérêt principal de ces systèmes réside dans le fait qu'ils permettent un meilleur contrôle des paramètres environnementaux, tels que l'humidité, l'aération et la température, tout en facilitant l'accès direct à la solution nutritive pour analyse (par exemple, pour ajuster le pH ou les concentrations en nutriments). Cela rapproche ces systèmes des avantages observés en fermentation liquide, où les conditions peuvent être ajustées plus facilement en temps réel.

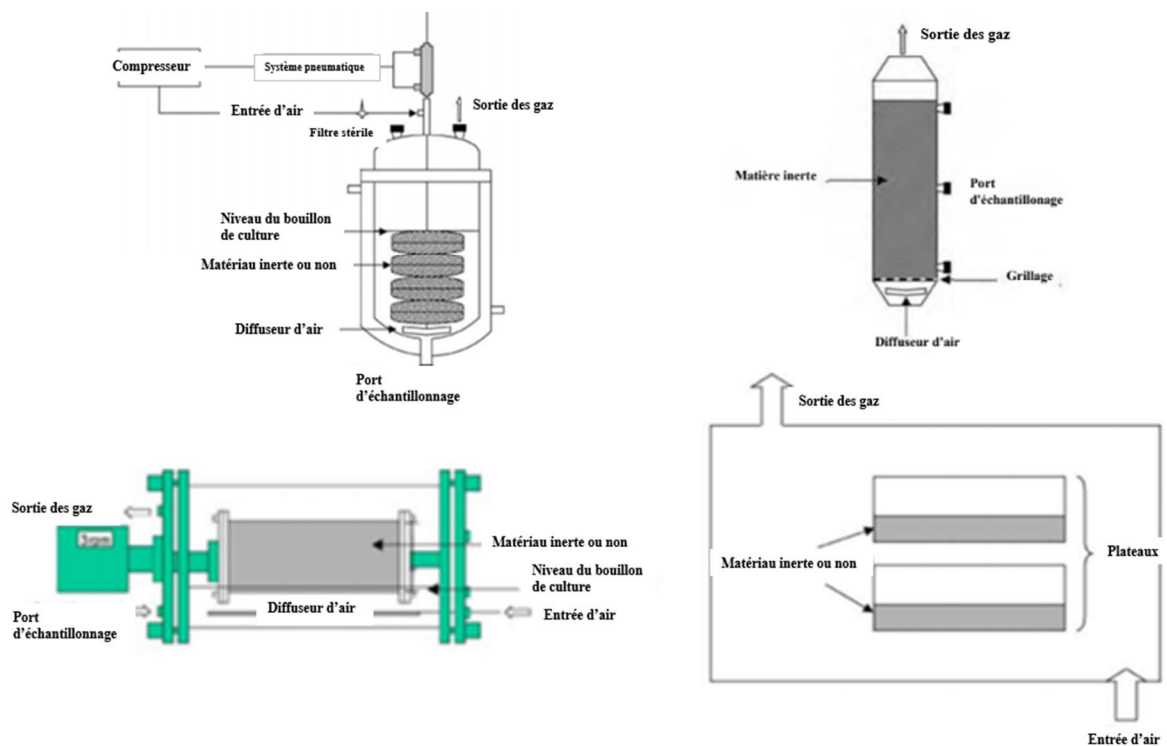


Figure 2: Exemples de systèmes de fermentation en milieux solides sur supports inertes (adaptée de Rodríguez Couto & Sanromán, 2005)

1.1.3.3 Les types de bioréacteurs à FMS

En Asie, l'industrie agroalimentaire des aliments fermentés a permis une grande évolution des bioréacteurs pour la fermentation solide, notamment en termes de mise à l'échelle des équipements de production. Par exemple, certains équipements sont capables de produire plus de 1000 tonnes de Koji par jour. Ces procédés sont réalisés en milieux non stériles, s'appuyant sur des connaissances ancestrales des processus de fermentation. Cependant, les procédés et équipements pour la production d'autres molécules non alimentaires à partir de divers microorganismes et substrats restent à développer dans ces pays (Pandey et al. 1999).

À cet effet, plusieurs types de fermenteurs solides ont été imaginés ou conçus. On peut regrouper ceux-ci dans différentes catégories, les systèmes statiques et les systèmes avec agitation.

Les systèmes de fermentation statiques

Divers types de fermenteurs ou bioréacteurs statiques peuvent être utilisés en FMS. Cette catégorie regroupe des fermenteurs variant de taille laboratoire à industrielle. On y retrouve des boîtes de Petri, des erlenmeyers, des colonnes de Rimbault ainsi que de gigantesques bioréacteurs à plateaux fixes. La caractéristique commune de ces systèmes est l'absence d'agitation. Des exemples de systèmes à colonnes fixes (colonnes de Rimbault) et à plateaux fixes perforés sont décrits plus en détail ci-dessous.

1) Les fermenteurs à colonnes fixes

Le système de colonnes de Rimbault, tel que présenté dans le brevet français #76-06-677 de 1976 intitulé « Procédé d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides », appartient à cette catégorie. Ce système a permis des avancées importantes en FMS grâce à sa simplicité, son faible coût, l'analyse directe des gaz et la possibilité d'isoler des variables

pour un ensemble de réplicats. Il se compose de colonnes remplies de biomasse plongées dans un bain où la température de l'eau est contrôlée. Une injection d'oxygène humide est assurée sous la colonne et les gaz échappés peuvent être directement analysés et le flux d'oxygène ajusté. La figure 3 ci-dessous présente ce système.

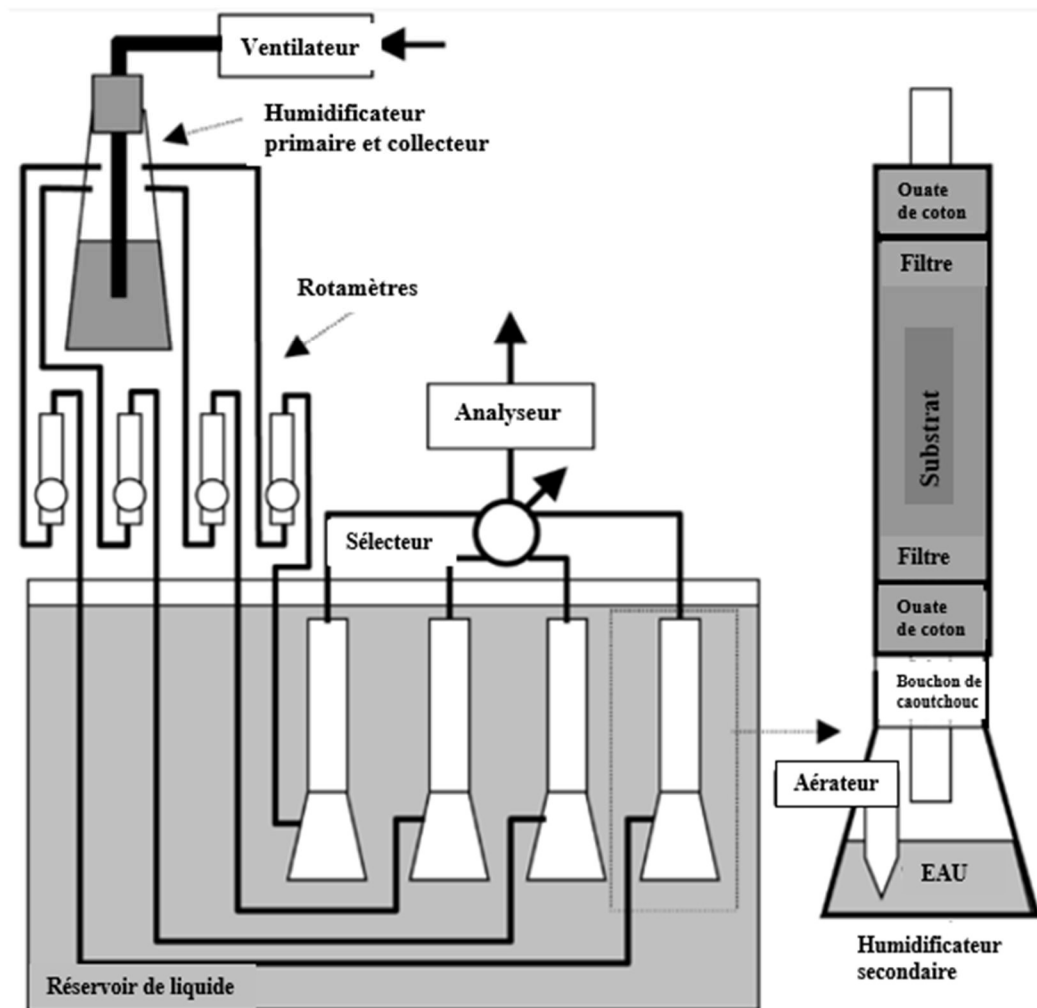


Figure 3: Représentation d'un système de colonnes de Raimbault (adapté de A. Mitchell et al., 2006).

Le système permet une évaluation du métabolisme des microorganismes afin d'acquérir une meilleure connaissance de ceux-ci. Ce système offre une bonne protection

contre la contamination par d'autres organismes. Il peut aussi être dimensionné selon les besoins de l'expérimentation et une extraction des métabolites peut être réalisée à même la colonne. Bien qu'utilisé le plus souvent à l'échelle du laboratoire, certains systèmes utilisant ce principe sont cependant plus volumineux, mais le volume demeure limité (quelques dizaines de litres) en raison de l'absence d'agitation (Soccol et al. 2017b).

2) Systèmes statiques à plateaux perforés

Il s'agit de systèmes où le substrat est étendu sur une couche de 5 cm à 15 cm d'épaisseur sur des plateaux perforés pour en faciliter l'aération. Les plateaux sont incubés dans des salles où l'air est filtré avec l'humidité et la température contrôlées. Ce système peut aisément être réalisé à une échelle industrielle. Il demande cependant beaucoup de superficie et de main-d'œuvre. De plus, la contamination est très difficile à contrôler, ce qui le rend inapproprié pour de nombreuses applications. Il nécessite également une planification importante à l'étape de la conception pour assurer l'uniformité du CO₂, de la chaleur et de l'humidité. Ce système est utilisé à grande échelle pour la production de Koji en Orient (Vandenberghe et al. 2021). Il se rapproche également beaucoup de la culture de champignons gourmets en environnement contrôlé, avec lequel il partage de nombreuses similitudes.

Un système à mi-chemin entre les deux concepts précédents consiste à placer le substrat inoculé dans des cuves de 1000 L munies de plusieurs buses d'injection d'air au fond des bacs de fermentation. Ce système permet de réaliser des blocs de mycomatériaux d'un volume de plus de 500 L (observation personnelle, avril 2019).

Fermenteurs avec système d'agitation

Les fermenteurs avec système d'agitation constituent une autre catégorie de systèmes de production FMS. L'agitation peut être continue ou intermittente. Les systèmes à tonneaux

rotatifs ou avec pales d'agitation appartiennent à cette catégorie. L'agitation permet d'améliorer l'homogénéité et les échanges gazeux, mais elle peut également causer des dommages par cisaillement aux microorganismes (Soccol et al., 2017).

1) Fermenteurs Koji

Ce type de système avec agitation est le plus souvent utilisé en environnement non stérile. Le substrat prétraité est distribué sur un disque rotatif sur une épaisseur maximum de 50 cm. Les conditions environnementales favorisant le microorganisme choisi (agitation, température, aération) sont contrôlées par ordinateur. Le principal inconvénient de ce système est le besoin de préparer et d'inoculer le substrat dans d'autres équipements en amont (conditions stériles). Ce type de fermenteur est très répandu dans les pays asiatiques (Singhania et al., 2009). La figure ci-dessous schématise ce système.

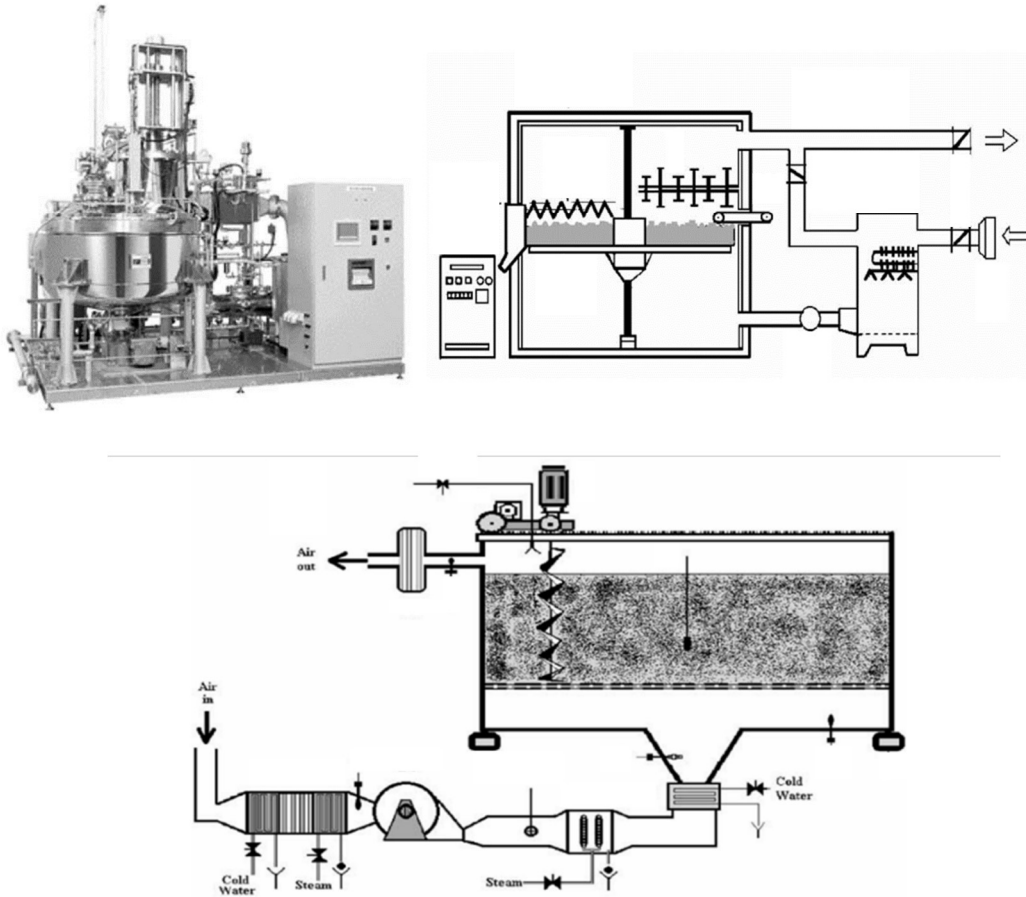


Figure 4: Fermenteur Koji moderne et fermenteur non stérile avec agitation conçu par INRA à Dijon en France (Durand 2003).

2) Systèmes en cylindre horizontal

Ce système, existant depuis 1930, est constitué d'un cylindre dans lequel des pales agitent le substrat au besoin. Ce système possède de nombreux avantages. Cependant, une gestion efficace de l'agitation est nécessaire, car l'agitation permet une homogénéité des conditions mais peut aussi causer des dommages par cisaillement aux microorganismes. Les organismes filamenteux non septés sont particulièrement sensibles à ce type de dommages. La figure 5, ci-dessous, présente un réacteur de ce type.

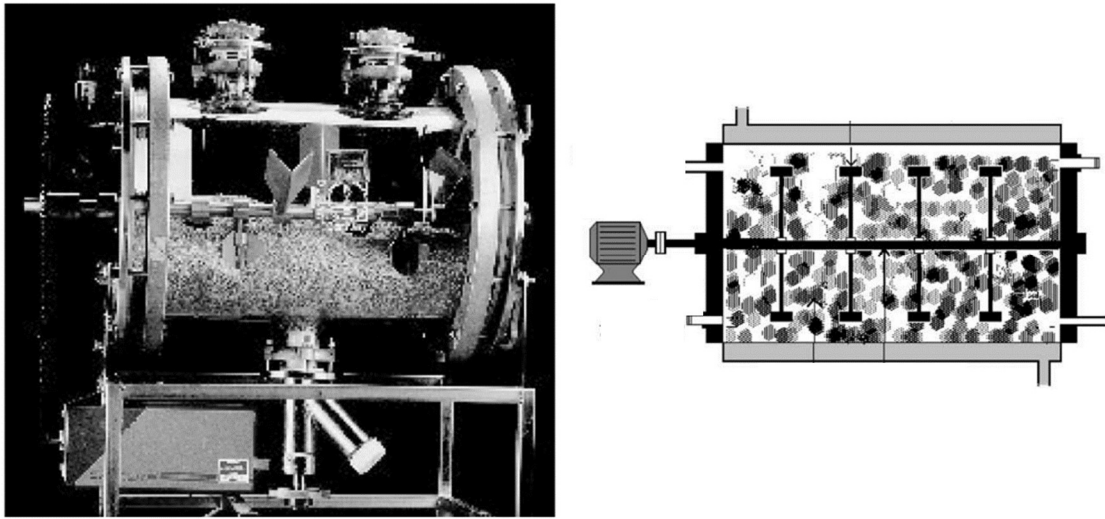


Figure 5: Fermenteur horizontal avec palmes d'agitation (adaptée de Durand, 2003)

Une variante de ce système consiste à ne pas utiliser de pales d'agitation, mais plutôt une rotation de la cuve pour assurer l'agitation. Ce système est moins agressif en termes de cisaillement, mais l'agitation y est moins efficace. De plus, le poids de la cuve à faire tourner représente une limitation pour la mise à l'échelle, particulièrement lorsqu'une double paroi est prévue pour la stérilisation sur place.

Ces bioréacteurs sont fréquemment utilisés à l'échelle laboratoire et pilote. Les appareils modernes permettent la stérilisation du substrat directement dans l'appareil et un contrôle précis de la température grâce à une double paroi dans laquelle circule un fluide pour assurer le transfert de chaleur. De plus, les nouvelles sondes permettent l'acquisition continue de données de pH et d'humidité, ce qui n'était pas possible avant 2018. Ils sont également équipés de systèmes d'injection et d'analyse des gaz (Durand, 2003; comm. pers., Biostream Inc., 2018).

1.1.4 Les voies et stratégies d'optimisation en FMS

Les principales contraintes à une plus large utilisation de la fermentation aérobie sur substrat solide (FMS) sont liées à la diversité des microorganismes, des matrices de production et des conditions optimales pour la production des produits ciblés. De plus, bien qu'il s'agisse d'un défi d'ingénierie stimulant, le manque de variété d'équipements disponibles pour les essais et la mise à l'échelle ralentit le développement des bio-industries basées sur la FMS (Oiza et al. 2022).

Un processus de développement et de mise à l'échelle d'un procédé FMS comprend habituellement les quatre étapes suivantes (Pandey et al. 1999) :

1. Essais au laboratoire en petits contenants tels que des erlenmeyers, boîtes de Petri, colonnes de Rimbault, petits sacs, etc. (50g à 1000g) ;
2. Fermenteurs de paille ou sacs de culture (5 kg à 20 kg) ;
3. Fermenteurs à l'échelle pilote (50 kg à 5000 kg) ;
4. Fermenteurs à l'échelle de production (25 T à 1000 T).

Des progrès importants ont été réalisés ces dernières années, notamment dans les méthodes de transfert thermique, la croissance des microorganismes et la compréhension de leur métabolisme. Par ailleurs, l'intégration de technologies avancées de capteurs et de contrôle automatisé a permis d'optimiser les conditions de fermentation en temps réel, augmentant ainsi l'efficacité globale des procédés de FMS (Carlos Ricardo Soccol et al., 2017; Oiza et al., 2022).

1.1.5 Intégration des procédés FMS dans un contexte de bioraffinerie

Le concept de bioraffinerie repose sur l'utilisation de biomasses pour produire une variété de produits. Le bioraffinage est utilisé depuis longtemps dans l'industrie alimentaire, mais son application à d'autres fins reste limitée, à l'exception de la production d'éthanol. Dans un contexte de réduction de la dépendance aux énergies fossiles et d'utilisation rationnelle des ressources, le bioraffinage devient une alternative intéressante. Il englobe les technologies et procédés permettant de transformer diverses biomasses en carburants, polymères, métabolites secondaires et autres composés à valeur ajoutée (Wert et al. 2017).

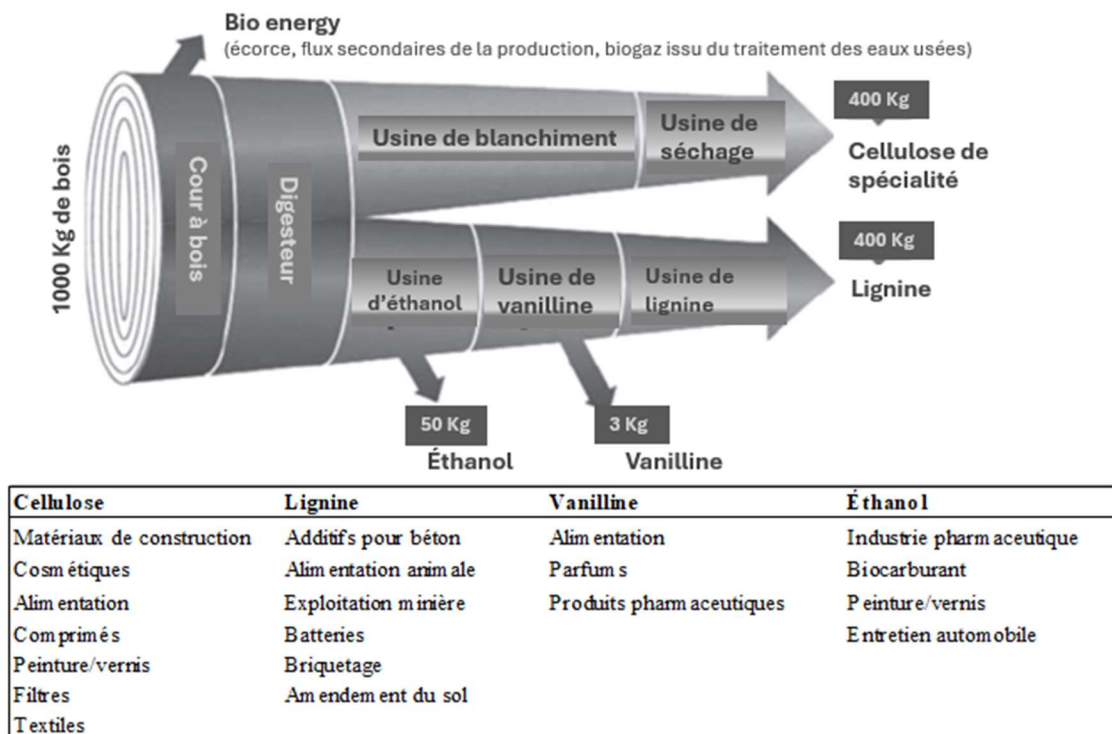


Figure 6: Exemple d'une chaîne de produits issus du bois en bioraffinerie (adapté de Wertz et al., 2017)

Les procédés FMS peuvent être utilisés à plusieurs étapes du bioraffinage, seuls ou en synergie avec le reste de la chaîne de fermentation (FML ou FMS). La figure 7, ci-dessous, montre les étapes typiques d'une bioraffinerie ainsi que les étapes pouvant théoriquement être réalisées en FMS (Wertz et al., 2017).

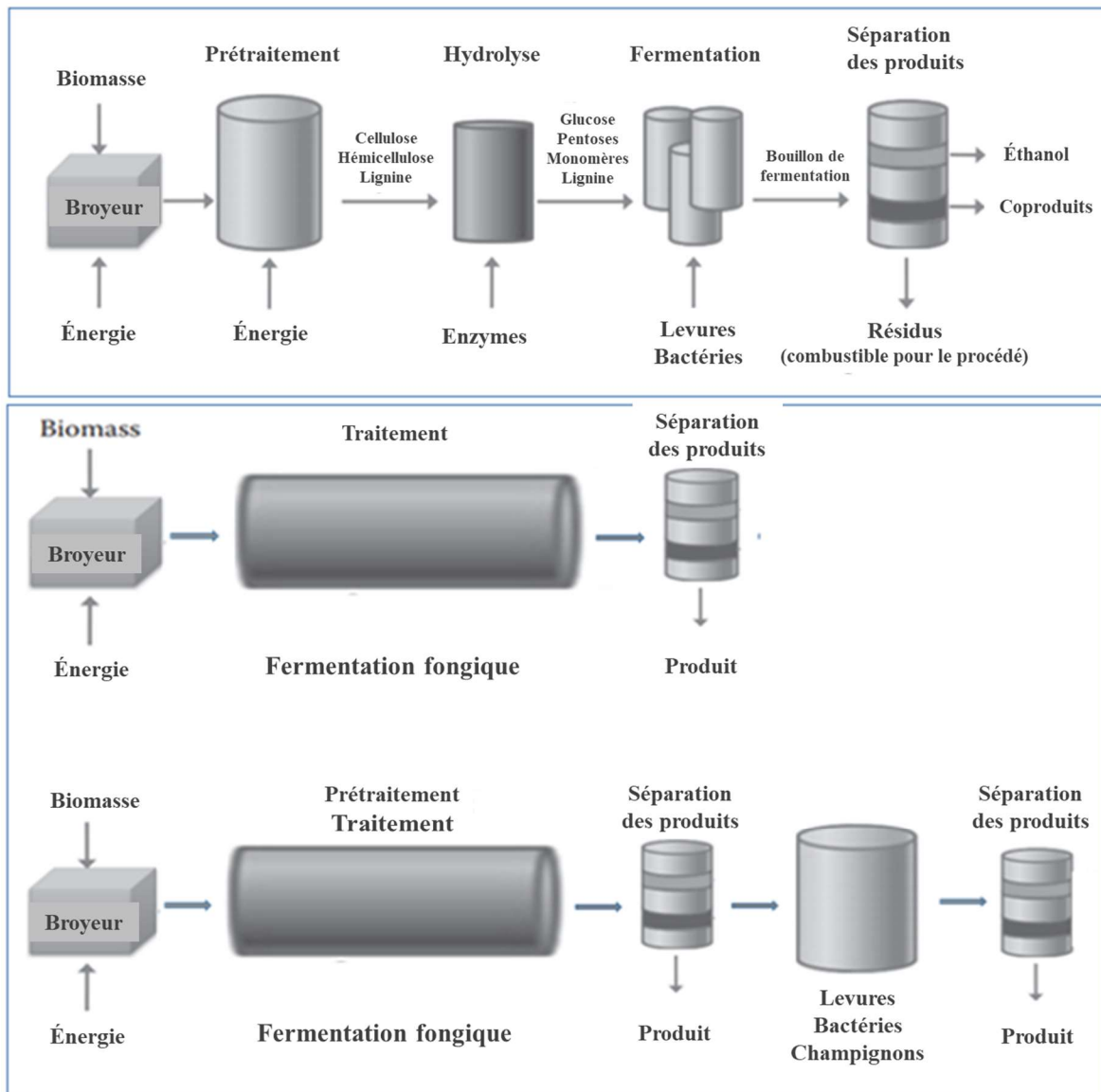


Figure 7: Étapes de bioraffinage avec intégration FMS (Wertz et al., 2017)

Dans la même logique, Farinas (2015) propose un concept visant à réduire les étapes de production d'éthanol en FMS (figure 8, ci-dessous). Cette proposition consiste à utiliser directement la masse entière du fermenteur dans la chaîne de production, avec ou sans ajout d'enzymes externes.

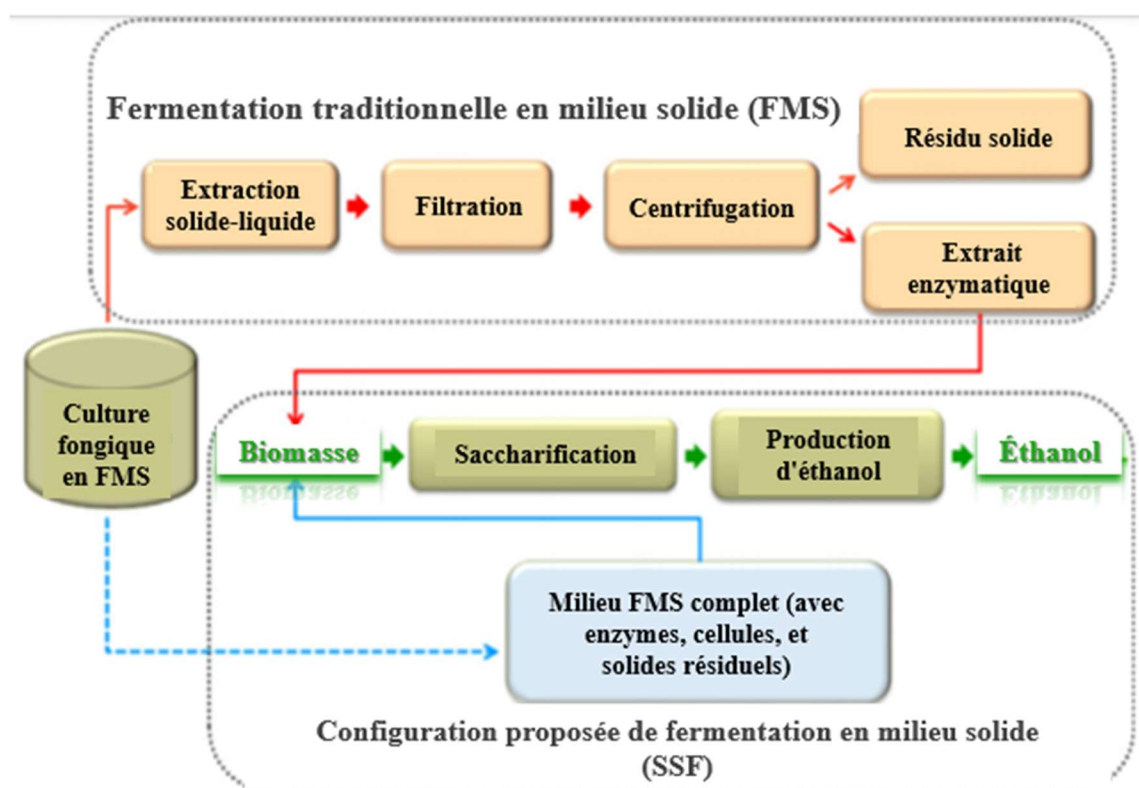


Figure 8: Diminution théorique des étapes de production en FMS (adapté de Farinas, 2015)

Pour plusieurs types de chaînes de production ou de produits, l'utilisation synergique de phases de fermentation liquides et solides serait à privilégier, permettant d'obtenir de meilleurs rendements (Wertz et al., 2017). La plupart des publications récentes sur la production enzymatique à partir de matières lignocellulosiques ciblent les cellulases et les xylanases pour la production d'énergie par la dégradation de la cellulose et de

l'hémicellulose. Cependant, pour atteindre et pouvoir dégrader ces polymères de glucides, la structure solide de la lignine doit d'abord être attaquée mécaniquement, chimiquement ou à l'aide d'enzymes ligninases (Carlos Ricardo Soccol et al., 2017).

1.2 LA LIGNOCELLULOSE ; UNE MATRICE POUR LES ORGANISMES PRODUCTEURS D'ENZYMES DE MODIFICATION DE LA LIGNINE

Les matières lignocellulosiques sont plus ou moins difficiles à dégrader selon leur composition. La lignine constitue la principale barrière à l'utilisation des glucides de la cellulose et de l'hémicellulose. Certains microorganismes ont cependant développé la capacité de dégrader ce polymère aromatique difficile à attaquer en utilisant des enzymes spécifiques ainsi que des métabolites secondaires facilitant l'attaque (Wertz 2010).

1.2.1 Composition des matières lignocellulosiques

Les matières lignocellulosiques sont constituées de cellules dont la paroi est lignifiée. Elles sont composées de trois principaux polymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Ces composants s'interconnectent pour former des structures telles que la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (Valette, 2018). La lignine est liée par des liens covalents à l'hémicellulose, tandis que des liens hydrogène unissent la lignine et la cellulose ainsi que la cellulose et l'hémicellulose. La figure 9, ci-dessous, représente la structure du bois.

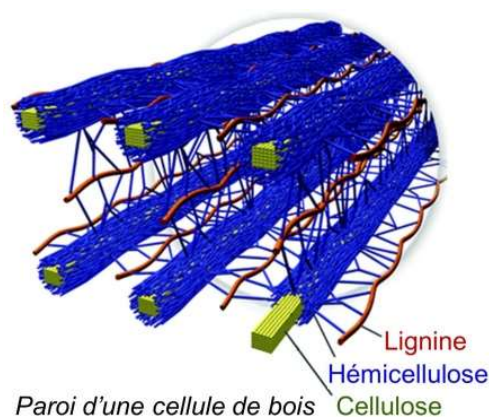


Figure 9: Structure de la paroi d'une cellule de bois (adaptée de Thibault, 2015).

1.2.1.1 La cellulose

La cellulose produite par les végétaux se compose de monomères de glucose assemblés entre eux par des liaisons β -1,4. Les fibres acquièrent leurs propriétés à partir de huit monomères. À ce moment, les chaînes de glucose deviennent insolubles et solides. La taille finale d'une chaîne de cellulose dépend de sa localisation. La cellulose de la paroi primaire du bois est formée de 8 000 unités de glucose, tandis que celle de la paroi secondaire en compte 15 000. La cellulose peut se trouver sous deux formes cristallines : la cellulose I et la cellulose II. Elles divergent uniquement au niveau de l'orientation des chaînes de β -glucanes, disposées de façon parallèle pour la cellulose I et antiparallèle pour la cellulose II. Les cellules du bois sont composées de cellulose de type I.

1.2.1.2 L'hémicellulose

Historiquement, le terme "hémicellulose" désigne les polysaccharides non cellulosiques extraits de la paroi cellulaire à l'aide d'agents alcalins. Environ 30 % de la masse sèche de cette paroi est composée de sucres. Ces polymères sont constitués d'un mélange de monosaccharides, incluant le glucose, le mannose, le galactose, les xyloses, l'arabinose, le rhamnose et des résidus acides comme l'acide galacturonique et l'acide 4-O-méthylglucuronique (Valette, 2018).

1.2.1.3 La lignine

La lignine est l'une des molécules les plus abondantes dans la nature après la cellulose, la chitine et l'hémicellulose. Elle est responsable de la rigidité et de la résistance à la décomposition du bois. On retrouve également des lignines dans la plupart des plantes vasculaires ainsi que dans certaines algues (ex. : algue rouge marine *Calliarthron cheilosporioides*) (Estevez et al. 2009), mais en proportions moindres que dans les

angiospermes et les gymnospermes, où elle atteint des proportions de 25 à 30 %. Elle arrive au troisième rang en proportion dans l'ensemble de la biomasse végétale morte ou vivante (15-25 %), derrière la cellulose (35-50 %) et l'hémicellulose (30-45 %) (Matthews et al. 2015).

Tableau 2 : Composition des matières lignocellulosiques

Constituants matière lignocellulosiques	Type de molécules	Proportion de composition*
Celluloses	Polysaccharides linéaires de glucose	35-60 %
Hémicelluloses	Polysaccharides branchés de sucres à 5 et 6 atomes de carbone	20-45%
Lignines	Polymères aromatiques complexes	10-25%

* Ratios incluant les intervalles de (Matthews et al., 2015) et de (Wertz 2010)

La résistance à la décomposition des lignines provient de leur composition en macromolécules polyphénoliques et aromatiques anamorphes. Elles se composent de trois types de monomères (monolignols) :

- L'alcool coumarylique (**H**, hydroxyphényle) : sans groupe méthoxy, il est surtout présent chez les angiospermes monocotylédones, en association avec les deux autres types ci-dessous. Ce monolignol possède une structure phénolique simple avec un groupe hydroxyle et un groupe hydroxyle de la chaîne latérale.
- L'alcool coniférylique (**G**, guaiacyl) : avec un groupe méthoxy, il est le principal constituant des lignines chez les gymnospermes. Ce monolignol inclut un groupe méthoxy sur le cycle aromatique en plus des groupes hydroxyles.

- L'alcool sinapylique (S, syringyle) : avec deux groupes méthoxy, il se retrouve avec l'alcool coniférylique chez les angiospermes dicotylédones. Ce monolignol possède deux groupes méthoxy sur le cycle aromatique en plus des groupes hydroxyles.

Ces monomères sont eux-mêmes dérivés de la phénylalanine (des phénylpropane). Leurs structures sont représentées ci-dessous :

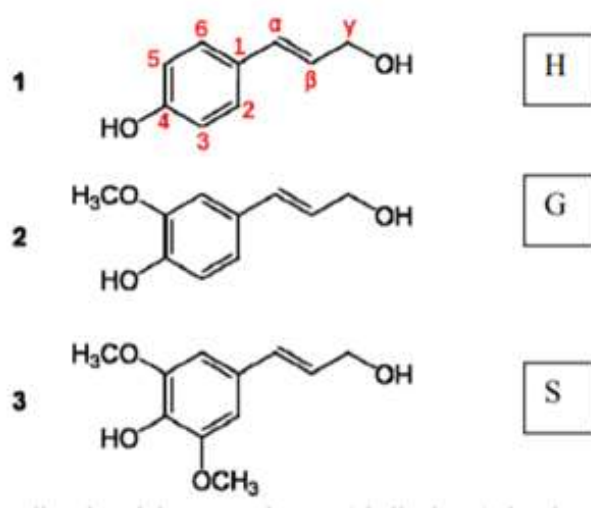


Figure 10: Représentation des trois principaux monolignols (Wertz, 2010)

Les lignines chez les résineux sont homogènes, 95 % des tissus des conifères étant constitués de trachéides lignifiées et les 5 % restants de parenchyme non lignifié (Daniel, 2003). La situation est différente chez les angiospermes, où la structure des lignines dépend de plusieurs facteurs, dont l'espèce, la fonction biologique (ex. : fibres, xylème, strates pariétales, etc.), mais aussi des conditions environnementales (lignine de stress). Le caractère anamorphe de la lignine contribue à sa résistance face aux attaques des microorganismes. La figure 12, ci-dessous, présente la structure type d'une lignine. Chaque lignine se greffe de façon non spécifique à ses homologues pour former des molécules de grande masse

moléculaire, allant de 2000 g/mol à plus de 5000 g/mol, composées de plusieurs unités de lignine (Wertz, 2010).

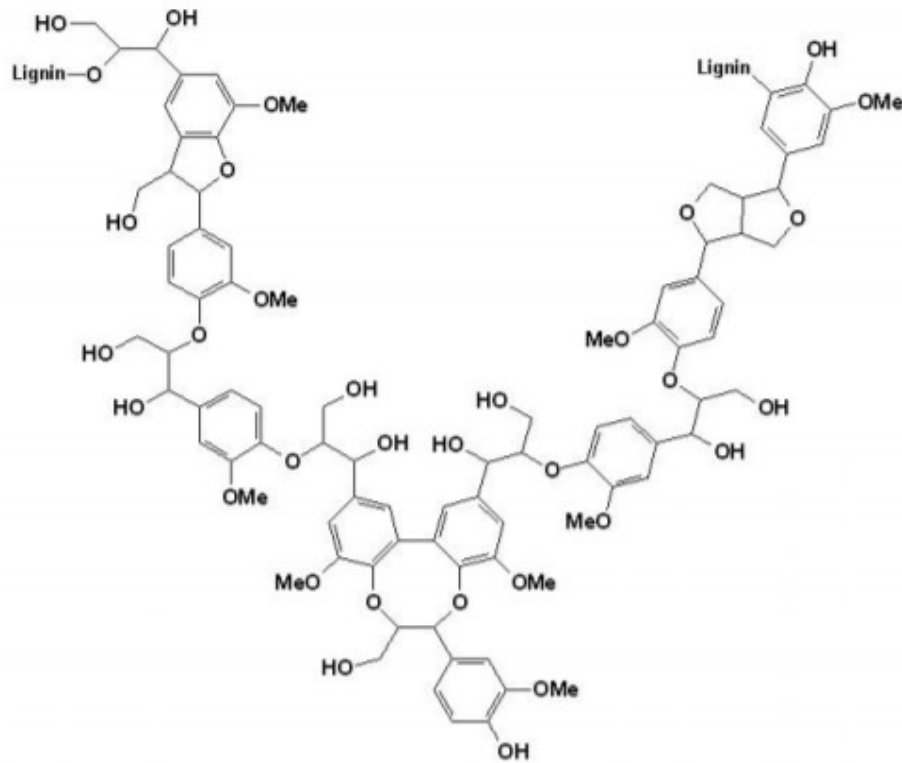


Figure 11: Représentation d'une lignine type (adapté de Wertz, 2010)

Les mycètes, en particulier les champignons de pourriture blanche, sont majoritaires parmi le faible nombre de microorganismes capables de produire des enzymes non spécifiques permettant de décomposer les molécules variées de lignines (Wertz, 2010).

1.2.2 Les lignines en biotechnologie

Si les matières lignocellulosiques résiduelles peuvent servir de support ou de matrice de production pour des enzymes, la transformation de la lignine en partie par ces mêmes enzymes présente également un fort potentiel à développer. Les projets de bioraffinerie, de

plus en plus nombreux en Europe (Biocore, Wertz et al. 2017), ont déjà démontré qu'il était possible d'utiliser la cellulose et l'hémicellulose pour la production d'une variété de produits à valeur ajoutée. Le développement de tels projets, qui utilisent des biomasses lignocellulosiques et se concentrent principalement sur la valorisation des polysaccharides, pourrait générer encore davantage de lignines résiduelles à valoriser.

Bien que la transformation de la lignine en carburant ou en produits de chimie blanche (produits chimiques industriels respectueux de l'environnement) ne soit pas encore économiquement viable, son potentiel est énorme. L'utilisation de microorganismes ou des voies de transformation de ces derniers pourrait permettre de surmonter les difficultés associées à l'hétérogénéité de ces polymères aromatiques pour une utilisation rentable et durable (Zhou et al. 2022). Parmi les produits à haute valeur ajoutée pouvant provenir de lignines, on compte les fibres de carbone, les plastiques d'ingénierie, les élastomères thermoplastiques, les mousses de polymères, les membranes, ainsi que les biocarburants et composés chimiques de base (monomères aromatiques, oligomères de benzène, toluène, xylène, vanilline, monomères de lignine, styrène et composés phénoliques) qui proviennent actuellement des hydrocarbures. La figure 12 ci-dessous présente une variété de sous-produits pouvant être tirés des lignines susceptibles de créer des chaînes de valeurs.

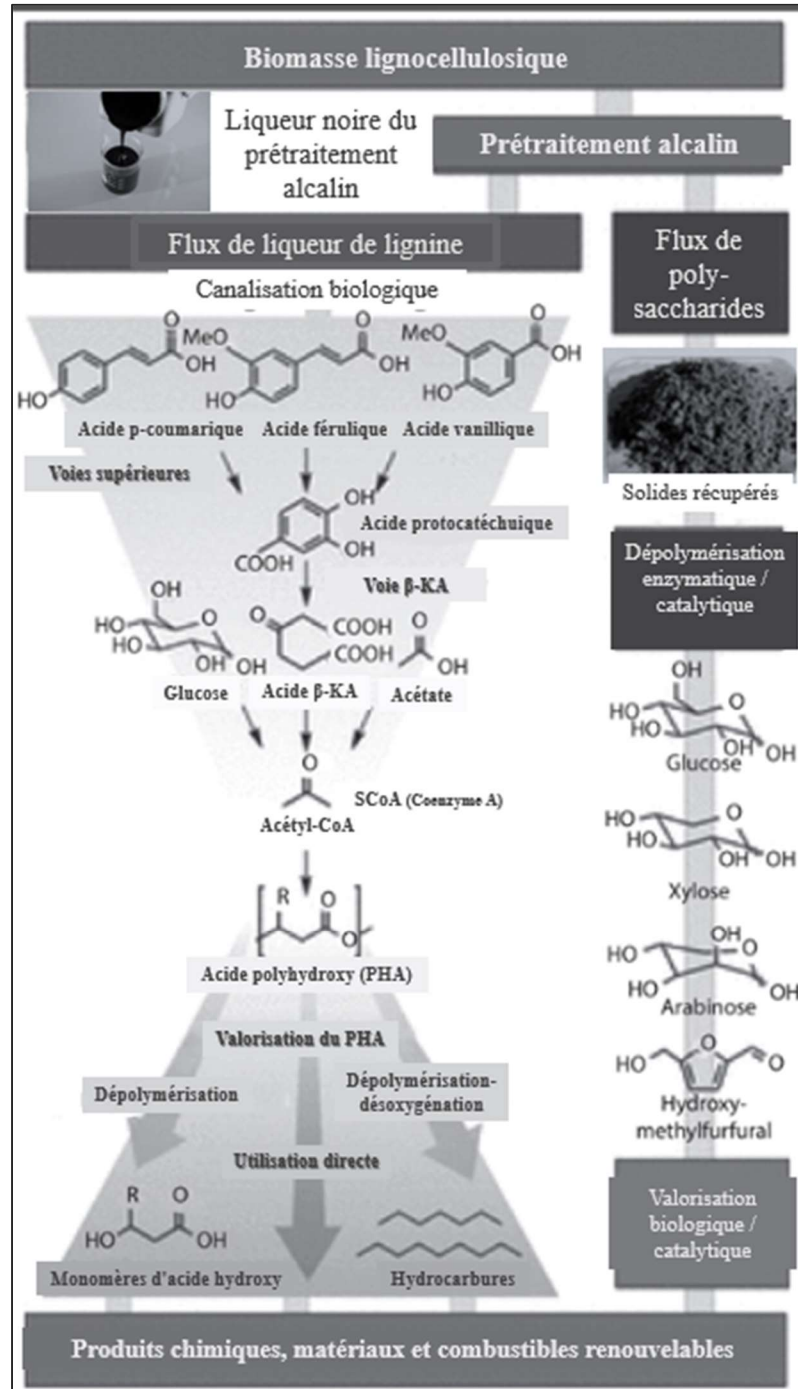


Figure 12: Sous-produits issus de lignines et glucanes (adapté de Wertz et al., 2017)

1.2.3 Les processus enzymatiques impliqués dans la dégradation primaire des matières lignocellulosiques

Les enzymes, de manière générale, sont des protéines capables de catalyser des réactions chimiques essentielles à la vie dans les cellules, ou dans le cas des exoenzymes, à l'extérieur de celles-ci. Contrairement à d'autres catalyseurs, la plupart des enzymes sont très spécifiques en raison de leur structure tridimensionnelle (Blow 2000), ce qui n'est cependant pas le cas des ligninases.

La dégradation complète des matières lignocellulosiques est un processus complexe impliquant un grand nombre de processus enzymatiques et non enzymatiques. L'attaque et la simplification des trois principaux polymères qui les composent diffèrent pour chacun et ont leur propre succession de processus enzymatiques. De manière générale, le terme cellulases désigne les enzymes attaquant la cellulose, les xylanases celles attaquant l'hémicellulose, et les ligninases celles attaquant la lignine. Les composants lignocellulosiques sont liés entre eux de la manière suivante : la cellulose est liée à l'hémicellulose et à la lignine par des liens hydrogène, tandis que la lignine et l'hémicellulose le sont par des liens covalents (Chen 2015). La figure 13, ci-dessous, illustre les mécanismes de dégradation de la lignine sous-jacente à l'attaque de la cellulose et de l'hémicellulose.

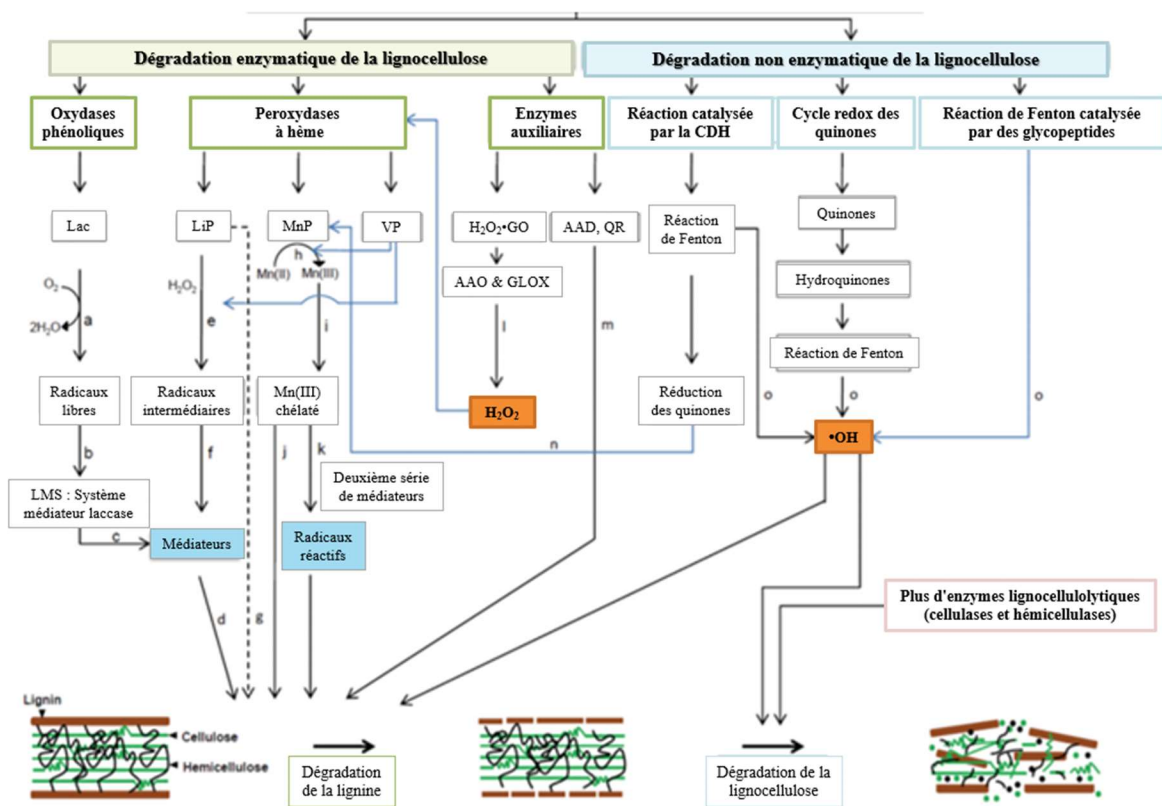


Figure 13: Mécanisme de dégradation de la lignine subacente à l'action des cellulases et xylanases (adapté de Dashtban et al., 2010).

Comme la cellulose et l'hémicellulose sont composées de glucides, elles peuvent être utilisées comme source de nutriments par plusieurs microorganismes. Cependant, dans les matières lignocellulosiques, ces composés sont fortement liés par les lignines, ce qui rend leur accès difficile (figure 9). La lignine, étant un polymère aromatique, est difficilement attaquant pour la plupart des microorganismes. De plus, en présence de lignine, les cellulases sont moins efficaces en raison de leur adsorption par la lignine (Leisola et al. 2012).

1.2.4 Identification des microorganismes producteurs d'enzymes de modification de la lignine

Comme mentionné précédemment, la lignine est un polymère résistant à la dégradation. En liant la cellulose et l'hémicellulose, elle crée une barrière empêchant l'entrée de solutions ou d'enzymes. Cependant, certains organismes comme les champignons de pourriture blanche parviennent à minéraliser complètement la lignine grâce à une combinaison d'enzymes de modification de la lignine (EML) extracellulaires, d'acides organiques, de médiateurs et d'autres enzymes auxiliaires. Bien que les mycètes aient été davantage étudiés à cet égard, certaines bactéries produisent également des enzymes capables de transformer la lignine ou ses sous-produits (Lee et al. 2019).

Des bactéries appartenant au genre *Streptomyces* des Actinomycètes sont connues pour dégrader la lignine. Des études ont montré leur capacité à former des monomères d'acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques) comme l'acide vanillique et l'acide protocatéchique à partir de sous-produits de lignine. Cependant, elles n'atteignent des taux de dégradation de la lignine que de l'ordre de 10 % (Wertz et al., 2017). L'étude de Lee et al. (2019) présente un résumé des bactéries étudiées à cet effet jusqu'à maintenant. Certaines levures possèdent également des enzymes pouvant modifier la lignine.

Les champignons filamenteux présentent un grand potentiel pour la production de composés bioactifs en SSF aérobie, car ils sont les plus adaptés à ces conditions de culture. Ils ont reçu beaucoup d'attention en raison de leurs capacités à produire des enzymes avec un grand potentiel d'innovation commerciale scientifique (ex. : ligninases, amylases, pectinases, xylanases, cellulases, chitinases, protéases, lipases, β -galactosidases, etc.) (Martins et al., 2011). Un autre avantage des mycètes pour la production de métabolites secondaires est leur capacité à les sécréter de façon externe.

1.2.4.1 Les mycètes filamenteux

Les mycètes dégradant le bois se divisent en trois catégories : les champignons de pourriture blanche, de pourriture brune et de pourriture molle. Les espèces des deux premières catégories appartiennent à la famille des basidiomycètes, tandis que la pourriture molle est associée aux ascomycètes. Il convient également de mentionner que plusieurs ectomycorhizes peuvent, à un certain degré, attaquer la lignine (Bending & Read 1997).

1.2.4.2 Basidiomycètes

Les basidiomycètes constituent un vaste embranchement des mycètes et sont relativement récents dans l'évolution de ce règne. Ils se caractérisent par la présence de basides sur lesquelles sont portées les spores. Parmi eux, on retrouve notamment l'ordre des agaricales, qui comprend des champignons avec sporophores munis de lamelles, ainsi que ceux munis de pores du clade des polyporoïdes (polypores).

Les champignons de pourriture blanche

Les champignons de pourriture blanche sont les plus efficaces pour dégrader la lignine, pouvant même aller jusqu'à une minéralisation complète. Bien qu'il existe plus de 10 000 espèces de champignons de pourriture blanche avec des potentiels variables pour dégrader la lignine, la cellulose et l'hémicellulose, seulement quelques dizaines ont été réellement étudiés à cet effet. Ces espèces sont principalement regroupées en six familles : *Phanerochaetaceae* (ex. : *Phanerochaete chrysosporium*), *Poliporaceae* (ex. : *Trametes versicolor* et *Pycnoporus sanguineus*), *Marasmiaceae* (ex. : *Lentinula edodes*), *Pleurotaceae* (les pleurotes comme *Pleurotus ostreatus* et *Pleurotus pulmonarius*), *Hymenochaetaceae* (ex. : *Inonotus hispidus* et *Phellinus igniarius*), *Ganodermataceae* (ex. : *Ganoderma lucidum*

et *Ganoderma applanatum*), et *Meruliaceae* (ex. : *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus*, *Phlebia radiata*) (Peralta et al. 2017).

Ils dégradent la lignine grâce à la sécrétion d'exoenzymes EML. La production de ces enzymes serait régulée par les sources de carbone et d'azote disponibles dans le milieu (Wertz et al., 2017). De plus, la plupart des espèces dégradent simultanément les trois principaux polymères du bois. Cependant, certaines espèces comme *Polyporus brumalis* ne dégradent pas efficacement la cellulose et semblent cibler prioritairement la lignine. Ce type de spécificité peut offrir de nombreuses possibilités en biotechnologie, notamment dans les processus nécessitant une modification de la lignine pour atteindre les polymères glucidiques sans les dégrader (Fackler & Schwanninger 2012).

Les champignons de pourriture brune

Les champignons de pourriture brune, bien qu'étant plus récents dans l'évolution, ne dégradent pas la lignine car ils ne produisent pas d'EML, mais ils sont en revanche capables de la modifier suffisamment pour dépolymériser la cellulose et l'hémicellulose. Dans les stades avancés, seule la lignine modifiée demeure, laissant le bois friable se dégrader en morceaux cubiques de couleur foncée. Ces champignons peuvent dégrader aussi rapidement les feuillus que les résineux sans égard à la composition de la lignine (Arantes et al. 2012). Le mécanisme n'est pas encore parfaitement connu, mais serait issu de processus enzymatiques et surtout non enzymatiques utilisant la réaction de Fenton (figure 17). Cette réaction fait intervenir du Fe^{2+} et du H_2O_2 pour former des radicaux de faible masse moléculaire. Comme ces radicaux sont aussi susceptibles d'endommager le mycélium, les champignons s'en protégeraient par un différentiel de pH. En conservant un pH de moins de trois près de l'hyphe fongique, cela empêcherait la formation de radicaux, mais en se diffusant plus loin où le pH est plus élevé, ils pourraient alors se former (Daniel 2016).

Bien que ces groupes soient souvent décrits selon leurs capacités fonctionnelles distinctes (dégradation complète ou partielle de la

lignine), il est important de noter que cette classification repose également sur des critères phylogénétiques. Les champignons de pourriture brune forment un groupe monophylétique au sein des Agaricomycètes, avec plusieurs origines indépendantes à partir d'ancêtres communs capables de pourriture blanche (Nagy et al., 2015; Floudas et al., 2012). Cette capacité unique aux champignons de pourriture brune à pouvoir atteindre spécifiquement les polymères de glucide en laissant la lignine presque intacte pourrait éventuellement être utilisée dans différents traitements ou prétraitements pour l'obtention de nouveaux composés.

1.2.4.3 Les ascomycètes

Les ascomycètes sont les principaux responsables de la pourriture molle. Pour la plupart, ils ne dégradent pas directement la lignine, mais sont très efficaces pour dépolymériser la cellulose et l'hémicellulose, *Aspergillus niger* étant l'une des espèces les plus étudiées. Lors des phases primaires d'attaque du bois, ils se fauillent à travers les parenchymes non lignifiés. Ils causent également une érosion à la surface des cellules (même celles lignifiées) sans toutefois y creuser de véritables trous comme le font les champignons de pourriture blanche (Daniel 2016).

Dans les dernières décennies, une nouvelle classe d'enzymes à hème, les DyP (Dye-decolorizing peroxidases), a été découverte dans des bactéries et serait également sécrétée par des ascomycètes supérieurs comme *Auricularia auricula-judae* ou *Xylaria polymorpha*. Des essais in vitro avec des précurseurs de lignine ont montré un fort potentiel redox, laissant entrevoir un potentiel d'attaque primaire des lignines par ces enzymes (Wertz et al., 2017). En milieux terrestres, peu d'ascomycètes produisent des EML, cependant, en milieux marins ou côtiers, plusieurs espèces d'ascomycètes semblent être en mesure de produire des enzymes EML (Sette & Paulo 2013).

1.2.5 Les enzymes EML

Les enzymes de dégradation (ou de modification) des lignines (LME) se distinguent de la plupart des enzymes par le fait qu'elles sont peu spécifiques, ce qui permet l'attaque d'une grande variété de polymères aromatiques. Les enzymes intervenant dans ce processus peuvent être divisées en deux groupes : les enzymes modifiant les lignines (LME : lignin-modifying enzymes) et les auxiliaires de dégradation de la lignine (LDA : lignin-degrading auxiliary).

Les enzymes du deuxième groupe ne peuvent pas directement attaquer la lignine, mais elles permettent au premier groupe d'accomplir leur travail en synthétisant des substances nécessaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par des processus oxydatifs. Elles permettent également de compléter le processus de dégradation. Les enzymes auxiliaires associées à la dégradation des lignines incluent la glyoxal oxydase (GLOX; EC 1.2.3.5), l'aryl alcool oxydase (AAO; EC 1.1.3.7), la pyranose-2-oxydase (POX; EC 1.1.3.10), la cellobiose déshydrogénase (CDH; EC 1.1.99.18) et la glucose oxydase (EC 1.1.3.4) (Silva Coelho-Moreira et al. 2013).

Les enzymes de modification de la lignine pouvant s'y attaquer directement (les LME) sont de deux types. Premièrement, les laccases (LAC) sont des enzymes qui catalysent l'oxydation des phénols et appartiennent au groupe des polyphénols-oxydases. Deuxièmement, les peroxydases héminiques (porteur d'hème), connues sous le nom de peroxydases II. Les peroxydases LME connues incluent la lignine peroxydase (LiP), la manganèse peroxydase (MnP) et la peroxydase versatile (VP), qui sont des oxydoréductases. Ce sont toutes des glycoprotéines glycosylées comprenant des cystéines et des histidines (Levasseur 2008).

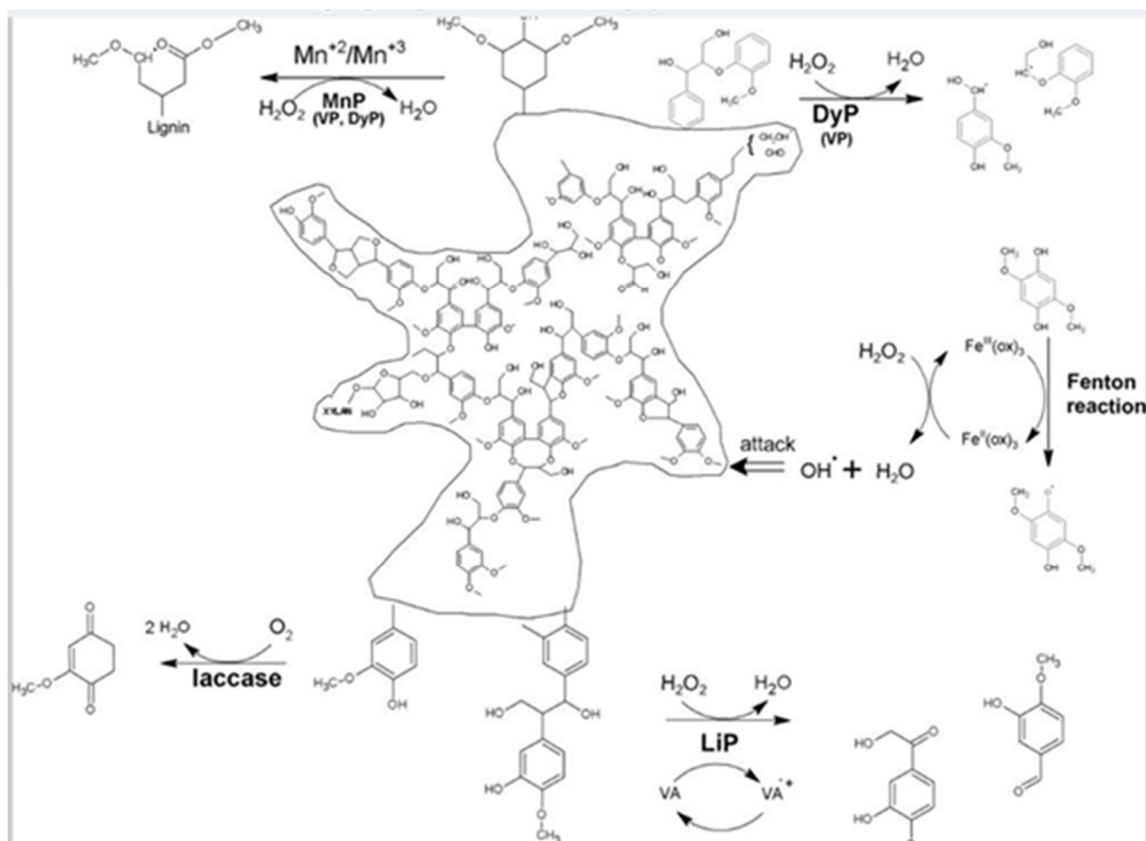
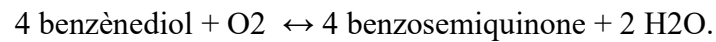


Figure 14: Actions enzymatiques des LME de dégradation de la lignine (adapté de Janusz et al., 2017).

En 1995, un nouveau groupe de peroxydases à hème a été découvert, les DyPs (Dye-decolorizing peroxidases). Des essais *in vitro* réalisés avec des précurseurs de lignine ont montré qu'elles présentent un fort potentiel redox, ce qui pourrait être associé à une attaque primaire des lignines. Ces enzymes sont présentes chez les mycètes et les bactéries, mais leurs actions sur des substrats lignocellulosiques bruts restent à démontrer (Wertz et al., 2017).

1.2.5.1 Les phénols oxydases (LAC)

Les laccases (EC 1.10.3.2; benzènediol: oxygène oxydoréductases) sont des enzymes qui catalysent la réaction suivante :



Elles font partie des "multicopper oxidases" (MCO) qui sont des enzymes le plus souvent composés de quatre cuivres disposés sur deux sites réactionnels, l'un composé d'un seul noyau de cuivre et l'autre de trois. La figure 18, ci-dessous, représente cette conformation (Gandier et al. 2017).

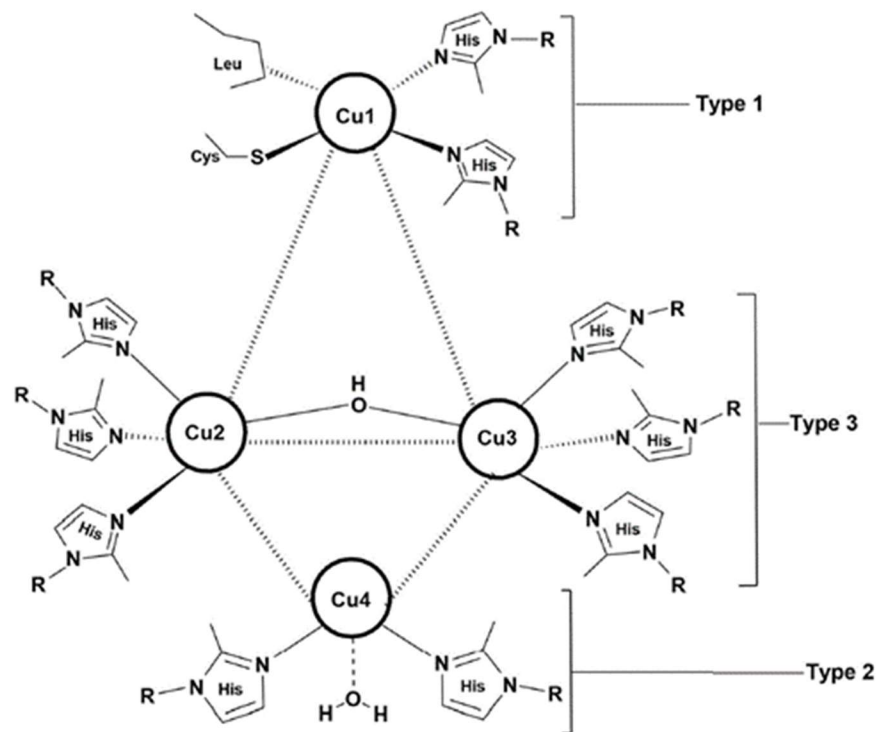


Figure 15: Configuration type des cuivres dans une laccase (adapté de Agrawal et al., 2018).

Les laccases se présentent sous forme de monomères ou de divers polymères. Elles agissent principalement sur les groupes phénols en transformant le dioxygène en deux molécules de H₂O, ce qui permet l'ouverture du cycle aromatique lors de la dégradation des lignines. L'affinité des laccases pour les phénols ou autres composés non phénoliques riches en électrons est dû à leur potentiel redox pouvant atteindre $\pm 0,8V$. Le cuivre en T1 possède le potentiel redox le plus élevé et est généralement considéré comme un indicateur de l'intérêt de la laccase pour son utilisation dans des bioprocédés. En général, les mycètes synthétisent des laccases avec un potentiel redox plus élevé que celui des bactéries (Wertz et al., 2017).

En considérant seulement le potentiel redox, on constate que les substrats non phénoliques nécessitant des potentiels redox de plus de 1,3V ne peuvent pas être attaqués directement par les laccases. Cependant, lors de l'attaque de la lignine, des radicaux libres sont produits et servent de médiateurs, ce qui augmente l'efficacité de l'enzyme. Cette réaction se nomme "laccase-mediator system" (LMS) (Peralta et al., 2017).

Certains sous-produits des lignines peuvent agir comme médiateurs en présence des laccases. Le 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), l'acide violurique (VLA), le 1-hydroxybenzotriazole (HBT), l'acétosyringone, la syringaldéhyde, l'acide paracoumarique, la vanilline et l'acide 4-hydroxybenzoïque en sont des exemples. En présence de ces médiateurs, l'oxydation sélective des composés phénoliques produit des résidus tels que des aldéhydes, des cétones et des acides. Ces fragments oxydés peuvent ensuite pénétrer et déstabiliser les polymères de lignine plus récalcitrants. La figure 16 ci-dessous schématise cet effet.

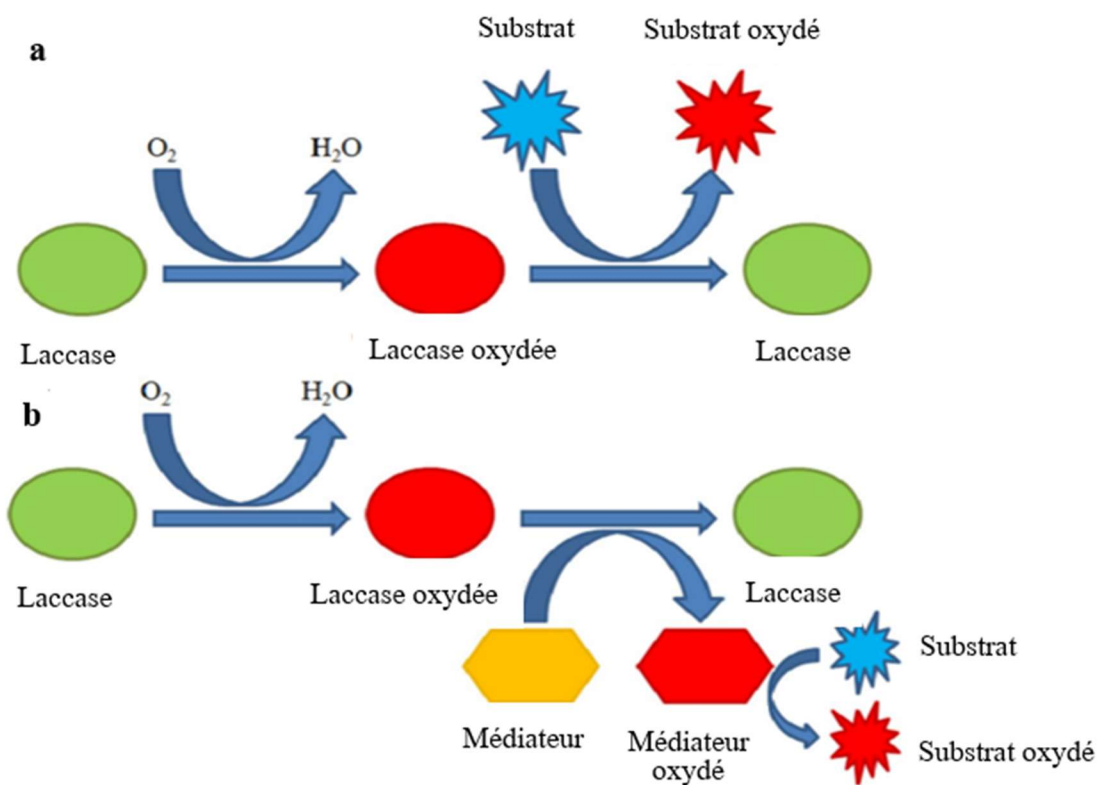


Figure 16: Mécanisme d'action des laccases et du système laccase-médiateur. **(a)** action directe, **(b)** avec médiateur (adapté de Agrawal et al., 2018).

En plus des composés phénoliques tels que l'aminophénol, les polyphénols, les ortho- et paradiphénols, et les méthoxyphénols, les laccases peuvent également oxyder les polyamines, les arylamines, les amines aromatiques, les thiols et des composés inorganiques comme les ions cyanure et les ions ferreux (Christopher et al. 2014).

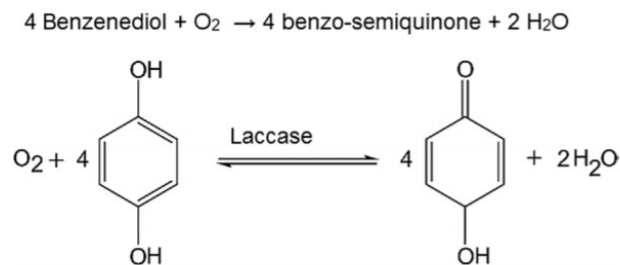


Figure 17 : Réactions chimiques catalysées par une laccase (adapté de Peralta et al., 2017).

À l'inverse, les laccases permettent aussi la synthèse biologique de plusieurs polymères, dont l'assemblage des monolignols de la lignine (Solomon et al. 1996, Quintanar et al. 2007). En effet, les laccases sont présentes dans plusieurs organismes eucaryotes où elles accomplissent de nombreux rôles biologiques essentiels. Leur faible spécificité permet de réaliser diverses réactions avec un faible coût énergétique, tout en étant biodégradables. Elles présentent donc un grand intérêt pour plusieurs secteurs industriels recherchant des alternatives plus écologiques (Chenthamarakshan et al. 2017). Cependant, pour augmenter leur utilisation industrielle, il est nécessaire de développer une production à grande échelle de laccases à faible coût (Peralta et al. 2017).

Un des facteurs majeurs expliquant la quantité élevée d'enzymes nécessaire à la réalisation de procédés industriels est le fait qu'elles ne sont pas immuables, étant plus ou moins rapidement désactivées. Certaines conditions accélèrent la désactivation de la molécule, par exemple, la présence de cations de mercure (Hg^{2+}), de magnésium (Mg^{2+}) et, dans une moindre mesure, de calcium (Ca^{2+}) et de zinc (Zn^{2+}), qui diminuent également leur efficacité. D'autres molécules peuvent avoir un effet inhibiteur par chélation du cuivre de l'enzyme, comme le dithiothreitol, le glutathion, les acides gras, les réactifs sulfhydryles et l'hydroxylysine. Enfin, le cyanure et certains résidus d'acides aminés peuvent totalement désactiver les laccases de façon non réversible. De plus, le processus de polymérisation ou de dépolymérisation produit un ensemble de composés qui finissent par désactiver l'enzyme,

c'est pourquoi plusieurs recherches visent à trouver la meilleure méthode pour l'immobiliser afin d'en améliorer la durée de vie utile (Quintanar et al. 2007, Bou-mitri 2013).

L'efficience optimale des enzymes est influencée par plusieurs facteurs dont la température, le pH, la quantité d'enzymes, et le substrat. Cependant, dans le cas des laccases et des LME en général, la situation est encore plus complexe puisque la température et le pH préférentiels diffèrent selon la source des enzymes. Des pH optimaux de 2 à 10 sont cités dans la littérature avec des températures variant de 20 °C à 80 °C (Dashtban et al. 2010). Ainsi, les laccases extraites de nouvelles sources devraient être testées afin d'en connaître les conditions d'action optimales avant d'en comparer l'efficacité (Bou-mitri, 2013).

Il est aussi possible d'augmenter l'efficacité des laccases par l'ajout de certaines substances comme la syringaldazine ou le sulfate de cuivre. La syringaldazine agit comme médiateur (comme les autres médiateurs cités plus haut) et le sulfate de cuivre empêche que le cuivre ne soit un élément limitant pour la production de l'enzyme (Rosales et al. 2007).

D'autres types de laccases ont aussi été identifiées chez les mycètes, où l'un ou plusieurs cuivres sont remplacés par d'autres substituants. Par exemple, chez *Pleurotus ostreatus*, l'une des laccases isolées présente un cuivre, deux zincs et un fer (laccases blanches). D'autres laccases, dont le cuivre en T1 est réduit par une molécule aromatique, par un lien avec des acides aminés ou par glycosylation, sont nommées laccases jaunes et peuvent agir seules comme si elles étaient en présence de médiateurs (Agrawal et al. 2018a).

1.2.5.2 Peroxydases à hème

Ces peroxydases sont des glycoprotéines de la famille des peroxydases de classe II qui contiennent un hème (hémoprotéines). Ce site actif est composé d'un dérivé de porphyrine

(noyau tétrapyrrolique) au centre duquel un ion de fer (III) est penta-coordonné (Valette, 2018). La figure 21 ci-dessous représente cette configuration.

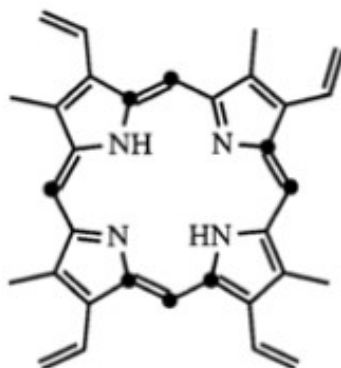


Figure 18: Protoporphyrine IX ($C_{34}H_{34}N_4O_4$) au centre duquel un cation de fer peut s'intégrer pour constituer l'hème (adapté de Rivera et al., 1999).

Ces enzymes ne peuvent dégrader la lignine qu'en présence de peroxydes d'hydrogène (ou de cofacteurs de remplacement). Typiquement, ces peroxydases agissent en deux étapes. Dans un premier temps, le centre ferrique est oxydé (perte de 2 électrons), produisant un cation de porphyrine intermédiaire et scindant le H_2O_2 au niveau de la liaison O-O. Par la suite, une double réduction consécutive de 1 électron par le substrat donneur d'électrons (ex. : alcool vératrylique) ramène l'enzyme à son état initial (Wertz 2010).

De façon générale, les peroxydases associées à la modification des lignines ont des températures optimales d'action assez élevées. Cependant, il semble que leur production soit plus importante à de faibles températures (Hofrichter 2002a).

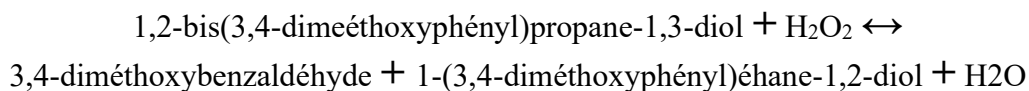
Certaines peroxydases pourraient rivaliser avec les laccases dans de nombreux processus en biotechnologie ou technologies environnementales (Dashtban et al. 2010, Wertz 2010). La principale limitation réside dans leurs capacités de production, qui sont encore assez faibles jusqu'à présent. Cette limite pourrait être surmontée par l'utilisation d'outils génétiques recombinants pour produire ces enzymes dans des bactéries. Cependant, cela ne

permet pas d'utiliser efficacement les biomasses résiduelles, ce qui augmente les coûts du média de culture et les impacts environnementaux associés.

Il convient de mentionner que des techniques de bio-ingénierie permettent de combiner génétiquement différentes peroxydases pour obtenir de nouvelles enzymes avec des capacités nouvelles ou complémentaires (Dashtban et al. 2010).

Lignine peroxydases (LiP)

Les peroxydases de lignine (EC 1.11.1.14), connues sous le nom de LiP, ont été découvertes en 1983. Elles fonctionnent en réalisant plusieurs transferts d'électrons pour former des radicaux intermédiaires phénoxy et des cations alcool vératrique (alcool 3,4-diméthoxybenzylique). Le mécanisme d'action se résume par l'équation générale suivante :



La figure 19 ci-dessous représente cette réaction (A) ainsi que celle de l'oxydation de l'alcool de vératryl souvent utilisée pour estimer l'activité des LiP (B).

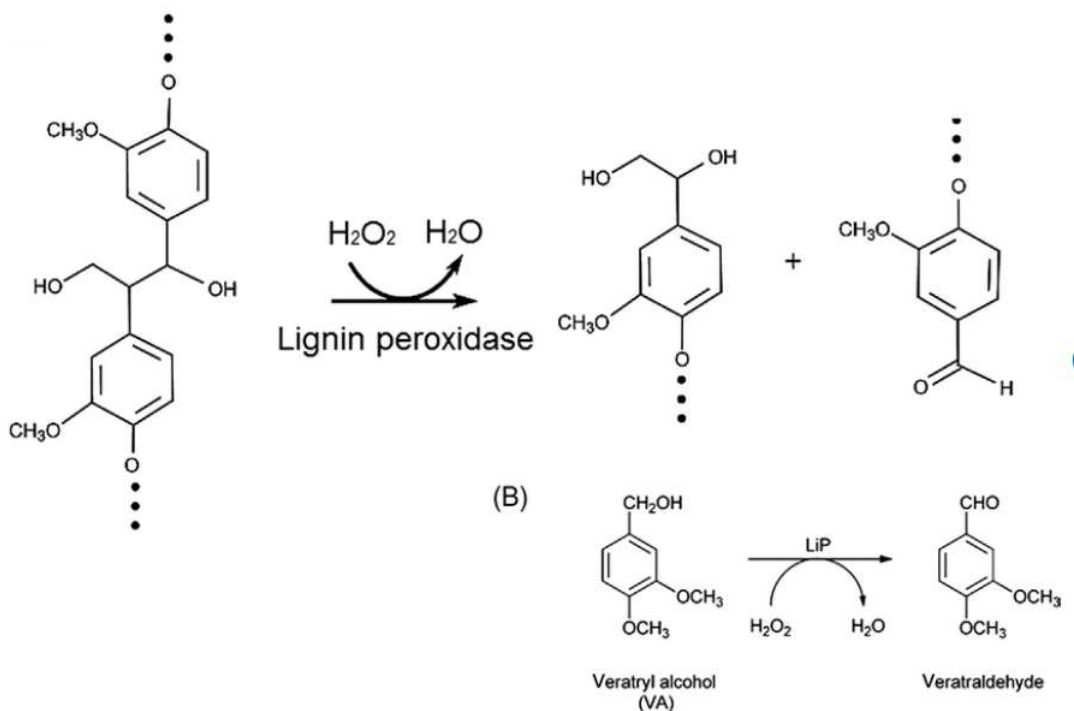


Figure 19: Modèle de réaction chimique des lignines peroxydases (adapté de Dashtban et al., 2010)

Les radicaux intermédiaires créés participent également à la dégradation en réalisant des réactions non enzymatiques telles que le couplage et la polymérisation radicalaire. Cette enzyme se distingue par deux caractéristiques importantes. Premièrement, son fort potentiel redox (jusqu'à 1.4V) lui permet, contrairement aux autres peroxydases et laccases, d'oxyder des composés aromatiques non phénoliques. Deuxièmement, elle peut opérer à un pH optimum très bas (proche de 3) avec un intervalle de pH variant de 1 à 5 (Dashtban et al., 2010). La température optimale d'activité de l'enzyme est le plus souvent comprise entre 35 °C et 55 °C.

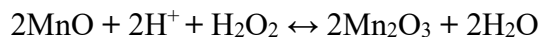
Morphologiquement, cette molécule cristalline retient son hème en son centre, qui n'est accessible que par un canal. Ce canal est trop petit pour qu'une grosse chaîne de lignine puisse s'y insérer, mais les plus petites fractions peuvent y accéder. Dans sa conformation,

on retrouve huit résidus de cystéines formant des ponts disulfures ainsi que deux sites de liaison au calcium (Wert et al. 2017).

Les lignine peroxydases demandent, pour leur synthèse biologique, un ratio d'une mole de protoporphyrine IX de fer par mole de protéine. Cette enzyme se caractérise par le fait que le seul atome métallique ou ion requis est le fer.

Manganèse peroxydases (MnP)

Les manganèse peroxydases (EC 1.11.1.13) ont été découvertes en 1985. Elles font également partie des peroxydases à hème, mais sont dépendantes du manganèse pour la catalyse de leurs réactions. Cette enzyme est sécrétée en de multiples isoformes avec des potentiels redox différents. La formule générale suivante représente sa réaction chimique :



La figure 21 ci-dessous représente cette réaction durant laquelle du CO₂ est libéré et le produit final est de l'acide humique.

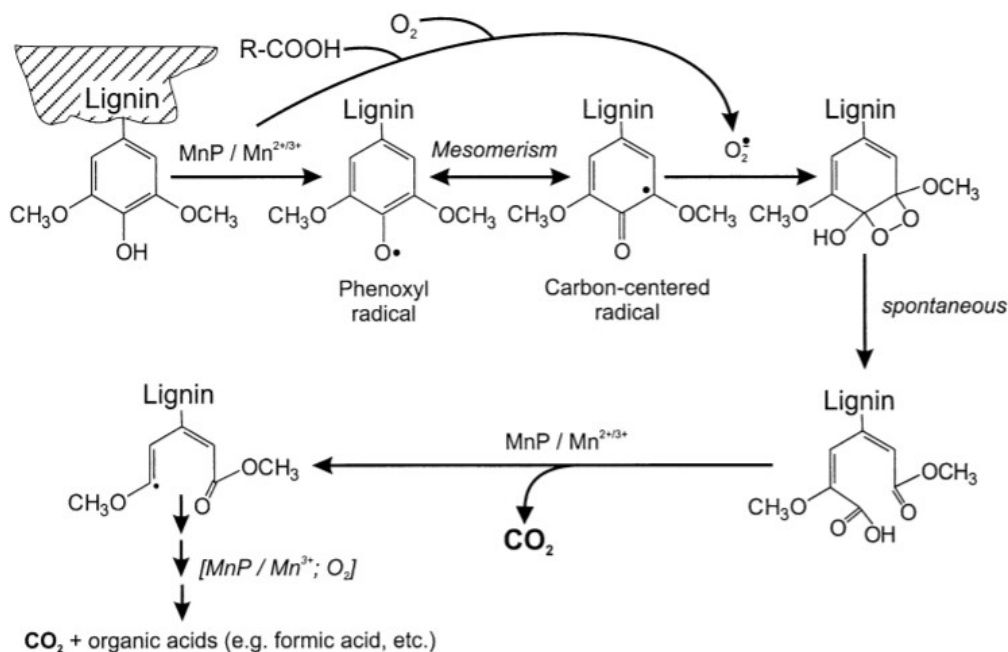


Figure 21: Modèle de réaction chimique des lignines peroxydases (adapté de Dashtban et al., 2010)

Il s'agit de l'enzyme EML la plus souvent identifiée durant les processus de dégradation de la lignine par les basidiomycètes de pourriture blanche ainsi que par ceux de litière. Cette enzyme oxyde le MnO (Mn(II)) présent dans le sol et le bois pour former du Mn₂O₃ (Mn(III)) qui est hautement actif. Le Mn(III) chélate avec des acides carboxyliques (ex: acide malonique présent dans le jus de pommes oxydé ou l'acide oxalique présent dans le son des céréales) pour attaquer la lignine en formant des radicaux instables. Contrairement aux laccases qui sont inhibées par certaines de ces molécules, comme des thiols (ex.: glutathion) ou des acides gras insaturés et leurs dérivés (exemple: Tween 80), les MnP les utilisent comme médiateurs. Ces observations ont été réalisées lors d'essais in-vitro (Hofrichter, 2002).

Le potentiel redox des manganèses peroxydase (1.0V ou moins) ne permet pas d'attaquer directement les molécules aromatiques non phénoliques (80% de la composition

de la lignine). Cependant, la formation de Mn_2O_3 chélatés avec des acides carboxyliques (exemple: oxalate, malonate, malate, tartrate, lactate) est en mesure d'oxyder des composés aromatiques non polaires pour former à leur tour des radicaux. Cette chaîne est représentée dans la figure 24, ci-dessous.

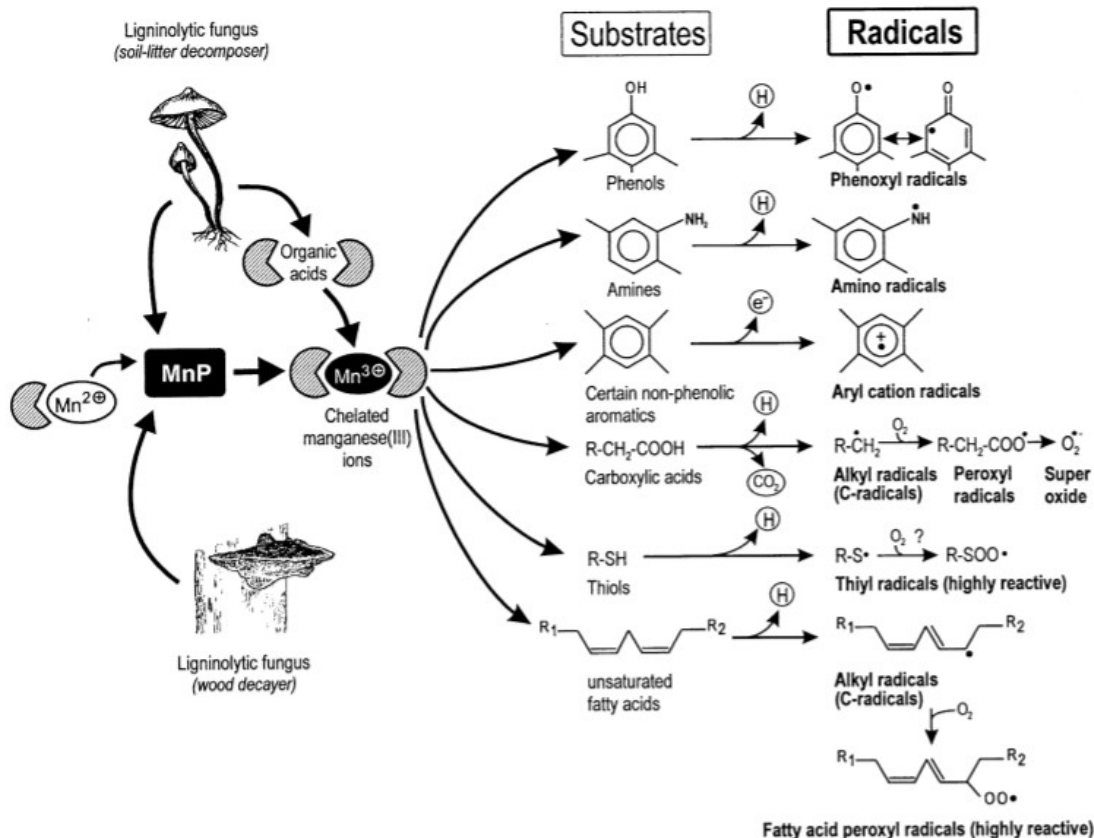


Figure 22: Schématisation du mécanisme d'action des chélates de Mn(III) et d'acides organiques dans la formation de radicaux (adapté de Hofrichter 2002).

Dans sa conformation, cette enzyme se distingue de la lignine peroxydase par la présence d'un site de liaison cationique à sa surface (dans un second canal), occupé par un Mn(II), où il agit comme agent réducteur pour la formation de Mn_2O_3 à partir du H_2O_2 . Ce type d'enzyme présente des températures optimales d'action comprises entre 30 °C et 60 °C et des pH de 2,5 à 6,8.

Peroxydases versatiles (VP)

Le groupe des enzymes peroxydases versatiles (EC 1.11.1.16) n'a été découvert qu'en 1999. Elles étaient auparavant considérées comme des manganèses peroxydases jusqu'au début des années 2000 (Hofrichter, 2002). Cette situation s'explique par le fait qu'elles peuvent oxyder le Mn(II) en Mn (III) comme le font les manganèses peroxydases pour l'attaque des substrats phénoliques et peuvent aussi faire des chélates avec des acides carboxyliques. Par contre, elles peuvent aussi attaquer les composés non phénoliques directement comme les LiP.

Les réactions chimiques impliquées seraient très semblables à celle des deux autres groupes soit les MnP et les LiP. La versatilité de cette enzyme permet son action sans présence de Mn(II) comme les LiP ou sans la présence alcool vératrylique comme les MnP.

Dashtban et collaborateurs (2010) (Dashtban et al., 2010), indique des pH optimums de 3 à 5 ce qui est semblable aux LiP et aux MNP.

Comparativement, aux lignines peroxydases et aux manganèses peroxydases peu d'études ont été réalisées jusqu'à maintenant spécifiquement sur les peroxydases versatiles (adaptée de Rao et al. 2018).

1.2.5.3 Applications des ligninases en biotechnologie

Le potentiel des enzymes EML en biotechnologie pour la création de produits et de procédés est bien établi. Elles peuvent également constituer des solutions vertes à des procédés chimiques polluants et énergivores (Wertz et al., 2017).

Les EML sont non spécifiques, elles peuvent donc dégrader une grande variété de polluants incluant ceux composés de molécules aromatiques comme les HAP, des pesticides, des colorants, certains médicaments et les hydrocarbures en général. Cette caractéristique permet leur emploi en bioremédiation des sols et de l'eau ainsi que pour le traitement des

eaux usées. Le fort potentiel redox des peroxydases de type II et de certaines laccases les rend particulièrement intéressantes pour ces usages ainsi que pour des procédés de blanchiment (ex.: papeteries et usines de textiles). Elles constituent également des outils intéressants pour le traitement ou le prétraitement de matières lignocellulosiques ou de lignines pour la création de molécules à valeurs ajoutées (voir section 4.4 pour le potentiel bioindustriel des lignines) pouvant remplacer celles issues des hydrocarbures en diminuant ainsi notre dépendance à ceux-ci. Les peroxydases nécessitent cependant la présence de H_2O_2 pour opérer. Celui-ci peut être apporté par ajout externe ou par des consortiums enzymatiques complémentaires (Wertz et al., 2017).

Les laccases bien que présentant un potentiel redox inférieur à celui des peroxydases ne nécessitent que du dioxygène (O_2) pour son action catalytique et le produit de sa réaction est constitué de deux molécules d'eau. Sa forte capacité catalytique, particulièrement pour la réduction de composés phénoliques, a ouvert la porte pour de nombreuses applications en biotechnologie ou en bioingénierie. Le greffage de composés sur des produits de bois pour en améliorer certaines caractéristiques ou comme liant pour les panneaux de contre-plaqués, la création de biodétecteur, de biobatteries ainsi que d'autres applications en biotechnologies et nanotechnologies pour l'industrie alimentaire ou encore pharmaceutique en sont quelques exemples (Agrawal et al. 2018). La figure 23, ci-dessous, résume certaines utilisations actuelles ou potentielles.

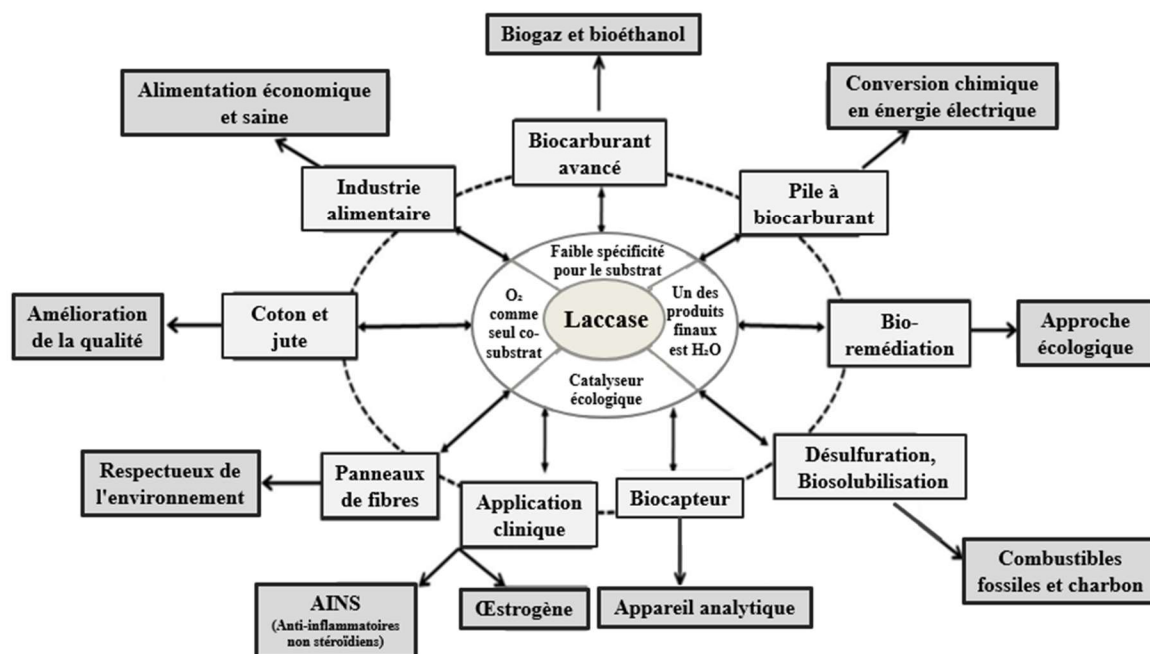


Figure 23: Avantages et potentiels des laccases en biotechnologies
(adapté de Agrawal et al., 2018)

En plus des applications des laccases présentées ci-dessus, celles mentionnées précédemment pour les peroxydases sont également possibles avec les laccases, puisque l'utilisation de médiateurs permet d'en augmenter le pouvoir redox. D'ailleurs, la tendance actuelle dans la production d'enzymes à partir de souches fongiques n'est plus de purifier des enzymes spécifiques, mais plutôt d'obtenir des cocktails d'enzymes agissant en synergie pour des utilisations industrielles spécifiques (Peralta et al. 2017, Wertz et al. 2017). Cependant, le coût et la capacité de production de ces enzymes restent des limitations pour l'industrie et le développement de nouveaux procédés (Peralta et al., 2017).

1.3 LA SÉLECTION DES SOUCHES DE MICROORGANISMES

Dans la plupart des recherches publiées, les souches utilisées pour la production d'EML en fermentation en milieu solide proviennent de collections officielles telles que l'ATCC, l'UAMH ou la CBS. Bien que de nombreuses espèces aient été utilisées, les plus souvent citées dans les études sur les conditions générales de production telles que *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta* et, dans une moindre mesure, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus eryngii*, ainsi que le genre *Bjerkandera sp.* (Rodríguez Couto & Sanromán 2005). Cependant, lors d'études plus spécifiques sur chacun des métabolites, un spectre généralement plus large d'espèces est ciblé. Le tableau 3 ci-dessous présente des exemples de souches reconnues pour produire les molécules ciblées.

Tableau 3 : Exemples de souches reconnues pour produire les molécules ciblées

Molécules ciblées	Espèces
Laccases	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>B.adusta</i> , <i>Coprinus cinereus</i> , <i>G.lucidum</i> , <i>P.radiata</i> , <i>P.ostreatus</i> , <i>P.pulmonarius</i> , <i>Rigidoporus lignosus</i> , <i>T.versicolor</i> *, <i>Pycnoporus coccineus</i> *, <i>P.sanguineus</i> *
Lignines peroxydases (LiP)	<i>B.adusta</i> , <i>P.chrysosporium</i> , <i>Trametes cervina</i> , <i>T.versicolor</i>
Manganèses peroxydases (MnP)	<i>C.subvermispora</i> , <i>D.squalens</i> , <i>I.lacteus</i> , <i>L.edodes</i> , <i>P.chrysosporium</i> , <i>P.ostreatus</i> , <i>P.pulmonarius</i> , <i>T.versicolor</i>
Peroxydases versatiles (VP)	<i>P.eryngii</i> , <i>P.pulmonarius</i> , <i>P.ostreatus</i> , <i>B.adusta</i> , <i>Bjerkandera sp.</i>
*Potentiel redox élevé	

(Wessels 2000, Peralta et al. 2017, Wu & Shin 2017)

Ces souches sont évidemment très utiles en recherche, servant de modèles de comparaison ou de références standards. Cependant, plusieurs études ont montré que des résultats supérieurs en FMS pouvaient être atteints à l'aide de souches indigènes (Cicatiello et al. 2017). Ce constat pourrait s'expliquer par la grande variabilité des conditions et des substrats de culture ainsi que par les réponses des diverses souches. Par exemple, pour plusieurs espèces comme *P.chrysosporium*, la production de LiP et de MnP est plus importante lorsque le milieu est pauvre en nutriments et presque à l'arrêt lorsque le niveau d'azote est très élevé. En revanche, pour d'autres espèces comme *Pleurotus ostreatus* et *Trametes trogii*, des taux importants de laccases et de MnP sont produits en présence de fortes concentrations en azote, alors que pour *Dichomitus squalens*, ce paramètre ne semble pas avoir d'effet (Daniel 2016).

Ces observations démontrent l'importance de la sélection des microorganismes en fonction des substrats de culture disponibles ou inversement. De plus, il existe une grande variabilité dans les enzymes produites par différentes espèces, certaines étant plus ou moins stables en fonction de la température, du pH ou du niveau de salinité (Overy et al. 2017). Par exemple, certaines souches doivent être capables de tolérer des températures extrêmes, des niveaux de pH très acides ou basiques, ou encore des environnements à haute salinité. De nouvelles souches capables de tolérer ces conditions de croissance difficiles, tout en permettant de produire un maximum d'enzymes avec une faible consommation énergétique, sont en grande demande (Agrawal et al. 2018b).

Dans ce contexte, depuis le début des années 2000, de plus en plus de publications mettent en avant le potentiel des souches fongiques marines, ou retrouvées en zones côtières, pour la découverte de nouveaux métabolites ou d'enzymes produites à de basses températures et à des niveaux de pH et de salinité élevés. De plus, certaines souches ne produisent des enzymes ligninolytiques (EML) qu'en présence d'une pression osmotique élevée. C'est notamment le cas de certains ascomycètes comme *Aspergillus terreus* et *Penicillium chrysogenum* qui produisent des peroxydases MnP et LiP uniquement dans ces conditions de haute salinité (Angelova et al., 2018).

La résistance et les propriétés intéressantes que certains mycètes ont acquises en présence de fortes concentrations en ions sodium confèrent à ces souches des avantages pour l'industrie, notamment pour des procédés où la salinité est élevée ou pour permettre l'utilisation d'eau salée au lieu de précieuses ressources en eau douce. En effet, le sodium, à diverses concentrations, même faibles dans certains cas, est toxique pour de nombreux organismes terrestres ou d'eau douce, perturbant leur équilibre osmotique et inhibant divers processus cellulaires, ce qui limite leur utilisation dans certains environnements. La résistance à des niveaux de salinité élevés peut donc être exploitée afin de créer des conditions de culture plus spécifiques et ainsi diminuer les besoins de stérilisation ou pasteurisation (Rohrmann & Molitoris 1992, Sette & Paulo 2013, Bonugli-Santos et al. 2015, Pang et al. 2016, Raghukumar 2017).

La sélection de souches présentant un fort potentiel de culture et de production n'est qu'une première étape. Pour améliorer et adapter les souches aux conditions spécifiques recherchées, diverses approches peuvent être utilisées. Ces approches incluent l'utilisation d'outils génétiques, les mutations dirigées, les sélections sexuées, la fusion de dicaryons, ou encore l'adaptation par repiquage dans des milieux de plus en plus sélectifs. Ces techniques permettent d'améliorer considérablement certaines caractéristiques des souches ou même d'en développer de nouvelles (Nevalainen 2001). Un exemple pertinent est la sélection et l'utilisation de souches mutantes ne produisant pas d'hydrophobines, ce qui faciliterait la récupération des enzymes ligninolytiques en FMS (Peddireddi 2008).

1.4 CONCLUSION

Pour conclure ce chapitre sur l'état des connaissances concernant la valorisation des matières lignocellulosiques par fermentation de mycètes filamenteux en milieu solide, il est essentiel de rappeler les avantages et les défis de cette méthode innovante. La fermentation en milieu solide se distingue par sa capacité à utiliser efficacement des biomasses résiduelles tout en nécessitant moins d'eau et d'énergie par rapport à la fermentation en milieu liquide. Les mycètes filamenteux, en particulier les champignons de pourriture blanche, se révèlent être des agents efficaces pour la dégradation de la lignine et la production d'enzymes de modification de la lignine.

Cependant, la mise à l'échelle de la FMS et la production économique d'enzymes restent des défis importants. La sélection rigoureuse des souches fongiques et l'optimisation des conditions de culture sont des étapes cruciales pour maximiser les rendements enzymatiques et assurer la viabilité industrielle des procédés. De plus, l'exploration de nouvelles souches, notamment celles provenant de milieux extrêmes comme les zones côtières et marines, ouvre des perspectives prometteuses pour la découverte d'enzymes aux propriétés uniques.

En intégrant les avancées récentes en biotechnologie, telles que les techniques de bio-ingénierie et les systèmes de capteurs avancés, il est possible de surmonter les limitations actuelles et de développer des procédés plus efficaces et durables. Cette approche peut non seulement améliorer la gestion des résidus lignocellulosiques, mais aussi contribuer à la production de biomolécules à haute valeur ajoutée, renforçant ainsi la transition vers une bioéconomie circulaire et durable.

Les chapitres suivants de ce mémoire détailleront les méthodes spécifiques de bioprospection, de sélection, et de caractérisation des souches fongiques, ainsi que des enzymes EML et des premières étapes de FMS.

CHAPITRE 2

BIOPROSPECTION ET CRIBLAGE DE MYCÈTES FILAMENTEUX ISSUS DE L'ESTUAIRE DU FLEUVE SAINT-LAURENT

La bioprospection vise à la découverte et à l'identification de nouvelles ressources biologiques d'intérêt socio-économique. Elle s'effectue fréquemment dans des environnements perçus comme inhospitaliers pour certains organismes afin d'augmenter la probabilité de découverte d'organismes présentant des fonctions originales. En plus de contribuer à une meilleure compréhension de la biodiversité des sites d'étude, de telles initiatives peuvent conduire à la découverte de nouvelles espèces ou souches de microorganismes dotées de caractéristiques utiles pour résoudre des problèmes contemporains, comme la découverte de nouveaux gènes d'intérêt en bioingénierie, de nouvelles molécules présentant un potentiel pharmaceutique, de nouvelles enzymes pour remplacer des procédés industriels plus polluants, ou pour assister à la restauration de sites contaminés (Bonugli-Santos et al., 2015; Pang et al., 2016; Raghukumar, 2017).

L'estuaire du Saint-Laurent demeure un territoire largement inexploré en ce qui concerne sa biodiversité fongique. Cet environnement semble, à premier égard, peu propice à la prolifération de nombreux champignons filamenteux, notamment ceux associés à la production d'enzymes modifiant la lignine (EML). Ces derniers sont souvent associés à la dégradation de matières lignocellulosiques en contextes agricoles ou forestiers, où les conditions environnementales sont généralement caractérisées par des températures estivales plus élevées, un pH moins alcalin et une pression osmotique réduite, comparativement aux conditions observées dans l'estuaire du fleuve Saint-Laurent (Rohrmann & Molitoris, 1992; Sette & Paulo, 2013; Wertz et al., 2017).

La découverte d'enzymes ligninolytiques (EML) demeurant actives à des températures réduites, dans des conditions de pH élevées, et présentant une meilleure résistance aux environnements salins que celles actuellement disponibles commercialement, présente un potentiel intéressant pour l'avancement des technologies environnementales. Les enzymes

actuellement disponibles sont souvent limitantes par leur besoin de conditions spécifiques souvent plus coûteuses à maintenir, comme des températures élevées, des pH peu alcalins ou des environnements peu salins. En revanche, la découverte de nouvelles enzymes qui pourraient fonctionner efficacement dans des conditions plus tempérées ou de pression osmotique élevée ouvrirait ainsi des possibilités nouvelles pour des applications dans des environnements plus variés pour le développement de solutions innovantes dans les domaines de la chimie verte et de la bioremédiation (Bonugli-Santos et al., 2015; Pang et al., 2016; Raghukumar, 2017).

L'abondance de matières lignocellulosiques flottantes ou présentes sur les berges de l'estuaire en fait un terrain propice à la recherche de champignons filamenteux susceptibles de produire de telles enzymes. La procédure de bioprospection et de criblage mise en œuvre comprenait les étapes d'échantillonnage, d'isolement sur milieux sélectifs, d'évaluation de l'activité enzymatique, du potentiel de conservation à long terme et de l'identification moléculaire. L'objectif était de sélectionner les souches de mycètes filamenteux les plus prometteuses pour la production d'EML actives dans des conditions similaires à celles de l'estuaire du fleuve Saint-Laurent, pour des applications biotechnologiques spécifiques.

Ce chapitre présente les étapes de criblage, d'identification et de sélection de quatre souches isolées de l'estuaire du Saint-Laurent entre juillet et octobre 2020. L'objectif principal de cette étude était de sélectionner et d'identifier des souches fongiques présentant un potentiel pour la découverte et la production d'enzymes de modification des lignines dans des conditions environnementales similaires à celles de l'estuaire du fleuve Saint-Laurent. Il détaille le processus de sélection et la caractérisation des souches en fonction de leur température cardinale de croissance, leur capacité d'absorption de diverses sources de carbone et d'azote, leur plasticité face au pH, leur halotolérance face à différents électrolytes, ainsi que leur identification moléculaire et leur potentiel de conservation à long terme.

2.1 MATERIEL ET METHODE

2.1.1 Échantillonnage

La campagne de bioprospection a débuté avec l'échantillonnage de débris lignocellulosiques sur les rives de l'estuaire du fleuve Saint-Laurent, dans la zone des marées, ainsi que de particules en suspension en mer, entre juillet et octobre 2020. Les principaux critères de sélection utilisés pour orienter le choix des souches étaient la facilité de culture in vitro, la vitesse de croissance à basse température et l'activité enzymatique des EML.

La collecte d'échantillons a été réalisée par une équipe de Biopterre (Centre collégial de transfert technologique, La Pocatière, Québec, Canada) dans l'estuaire du Saint-Laurent. Une première campagne a permis d'échantillonner différents environnements côtiers le long de ses rives, tandis qu'une seconde, réalisée à bord du navire de recherche *Lampsilis* de juillet à octobre 2020, a permis de compléter l'échantillonnage, par filtration d'eau de mer. Les échantillons marins ont été collectés à bord du navire de recherche, géré par Reformar Inc dans le cadre d'une mission financée par le Réseau Québec Maritime (RQM) dans cadre du programme *Odysée Saint-Laurent*. Le dispositif de prélèvement consistait en une motopompe Honda GX200 équipée d'un préfiltre à mailles de 10 mm et de sacs filtrants en monofilament de nylon de 800 µm de maille. Chaque échantillon a été obtenu en filtrant l'eau pendant 30 minutes, ce qui correspond à un volume total estimé de 6000 litres par échantillon. Les particules retenues dans les sacs filtrants ont ensuite été traitées de la même manière que les échantillons côtiers. Les échantillons de matières lignocellulosiques, tels que le bois, la paille, les algues, etc., prélevés sur chaque site et en mer, ont été immédiatement conditionnés selon la procédure décrite ci-dessous, puis conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation en novembre 2020.

Les sites de collecte côtiers (présentés à la figure 24, ci-dessous) ont été subdivisés en quatre secteurs distincts : l'estuaire moyen sud (couvrant la zone entre les villes de Montmagny et Rivière-du-Loup, zone sud-ouest), l'estuaire moyen nord (de Saint-Joachim à

la rivière Saguenay, zone nord-ouest), l'estuaire maritime sud (de Cacouna à Matane, zone sud-est) et l'estuaire maritime nord (de la rivière Saguenay à Baie-Comeau, zone nord-est). Dans chacun de ces secteurs, des sites d'échantillonnage ont été établis à des intervalles d'environ 20 km en fonction de l'accessibilité. À chaque site, un échantillon de matière ligneuse, un échantillon de matière cellulosique (paille, algue, etc.) et un échantillon d'eau du fleuve Saint-Laurent ont été prélevés.

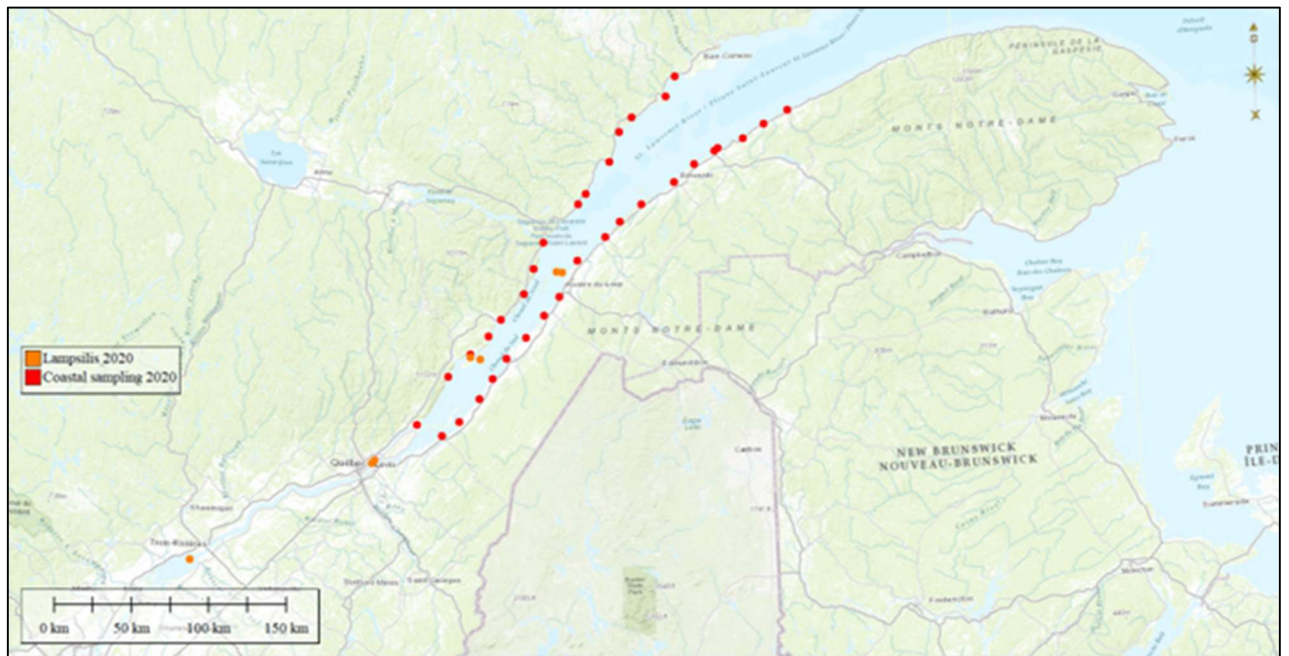


Figure 24 : Localisation des sites d'échantillonnages

Pour la collecte des échantillons ligneux, un ciseau à bois a été utilisé pour prélever des fragments d'environ 1 cm x 5 cm de matière ligneuse. La surface des échantillons a ensuite été soigneusement nettoyée à l'aide d'une solution saline stérile à 0,1 %. Parallèlement, un deuxième échantillon, composé de matière fibreuse présentant une concentration moindre en lignine que le bois, mais riche en cellulose ou en hémicellulose (débris de graminées, tiges de roseaux, algues, etc.), a également été prélevé sur les sites et lavé avec la solution saline. Les échantillons ont ensuite été placés individuellement dans des tubes Falcon™ de 50 ml contenant 25 ml d'eau du fleuve, prélevée sur le site et filtrée au préalable à l'aide d'une

seringue munie d'un filtre de 0,2 micron de porosité. Afin de limiter la contamination bactérienne, 40 µl d'une solution de chloramphénicol (Alfa Aesar™) ont été ajoutés dans chaque tube pour une concentration visée de 100 µg/L.

Pour chaque site, plusieurs données ont été colligées, dont la date de prélèvement, les coordonnées géographiques, la hauteur de la marée et l'heure de la dernière marée haute, ainsi que la température de l'eau. De plus, des photographies et des descriptions des échantillons ont été consignées. Lors du retour au laboratoire, la salinité et le pH de l'eau des sites de prélèvement ont été mesurés.

2.1.2 Isolement sur milieux sélectifs

Toutes les manipulations relatives à l'isolement ont été effectuées de manière stérile sous une hotte biologique. Pour isoler les souches fongiques, chaque échantillon a été traité en duplicata en s'inspirant de la méthode décrite par Bills & Polishook (1994), mais en l'adaptant aux spécificités de nos échantillons et objectifs. Contrairement à la méthode originale, qui privilégie une stratégie de filtration des extraits de sol et des matières organiques de surface pour isoler des champignons issus du filtrat, nos particules de matières solides en suspension ont été directement placées sur les milieux d'isolement.

Les échantillons ont été préparés en veillant à les réduire à une taille de particules d'au plus 2 mm. Un scalpel ou une lame dentée, préalablement stérilisés, ont été utilisés pour cette opération. Les échantillons ont ensuite été replacés dans la solution utilisée pour l'échantillonnage et agités vigoureusement. Après décantation, pour améliorer l'uniformité du dispositif, le volume de matières solides dans les tubes a été ajusté à 2,5 ml. Ensuite, la majeure partie du surnageant a été retirée des tubes, et une solution saline stérile à 0,1 % a été ajoutée pour atteindre un volume total de 15 ml.

Un volume de 0,1 ml d'échantillons homogénéisés (préalablement vortexés à haute intensité pendant 30 secondes) a été inoculé sur les milieux d'isolement non nutritif stériles

décrits ci-après. Ce milieu contenait du gaïacol, un réactif colorimétrique de type phénol constitué d'un cycle benzénique avec un groupe hydroxyle (-OH) et un groupe méthoxy (-OCH₃) attachés, réagissant à la présence d'enzymes de modification de la lignine afin de détecter la production d'EML par les souches isolées. Les échantillons ainsi préparés ont été déposés dans des boîtes de Petri, puis incubés à une température de 18°C ± 1°C pendant un maximum de 1 mois.

Le milieu d'isolement non nutritif était composé de 1 L d'eau de mer à 15 ‰ de salinité, 150 µL de gaïacol labo ITC, 100 µg/ml de chloramphénicol, 15 g d'agar, et le pH a été ajusté entre 6,5 et 7 avec du HCl à 1M. Le milieu d'isolement nutritif faux-bois (FB) contenait 3 g/L de lignine alcali Sigma, 4,5 g/L de filocell™ préparés, 0,78 g/L de xylose (proportion de xylose dans le bois), 1 L d'eau de mer à 15 ‰ de salinité, une quantité appropriée d'agar, 0,5 g/L de nitrate d'ammonium, 0,018 g/L de sulfate de manganèse, 0,005 g/L de sulfate de cuivre, 0,1 mg/L de thiamine, 100 µg/mL de chloramphénicol, 15 g d'agar, et le pH a été ajusté entre 6,5 et 7 avec du HCl à 1M.

Un suivi bi-hebdomadaire a été réalisé, et dès l'apparition d'un réseau d'hyphes fongiques, les colonies ont été transférées sur des milieux nutritifs faux-bois (FB) décrits précédemment ainsi que sur des géloses de PDA (Difco™) fabriquées selon les directives du manufacturier et additionnées de la même concentration de chloramphénicol. Les géloses ont été préparées en utilisant une solution d'eau de mer à 1,5 ‰ afin de s'approcher des conditions de salinité moyenne des secteurs étudiés.

Lorsque des colonies, provenant d'un même échantillon, présentaient des morphologies similaires, une réaction semblable avec le gaïacol et des taux de croissance comparables, une seule de ces colonies a été repiquée afin de réduire le nombre d'unités expérimentales totales. Dans certains cas, plusieurs cycles de repiquage ont été nécessaires pour parvenir à l'obtention de souches pures, lesquelles ont ensuite été transférées sur des milieux exempts d'antibiotiques afin de s'assurer de leur pureté. Les souches isolées ont été repiquées en triplicata.

Les colonies atteignant un diamètre de trois centimètres ont été réfrigérées (4°C). De plus, la capacité de certaines souches à continuer de croître à une température de 4°C a été monitorée.

À cette étape, des espèces de référence disponibles et conservées chez Biopterre, avec lesquelles l'équipe avait déjà de l'expérience et pour lesquelles une documentation scientifique plus importante existe, ont été incluses dans le dispositif expérimental pour des fins de comparaisons. Ces espèces sont *Pleurotus ostreatus* (Biop-F007), *Ganoderma lucidum* (Biop-F152), *Polyporus brumalis* (UAMH 11652), *Trametes versicolor* (Biop-F009), *Penicillium chrysogenum* (Biop-F098), et *Trichoderma atrovirides* (Biop-F080). Il est à noter que ces souches proviennent de la collection de microorganismes de Biopterre, à l'exception de la souche UAMH 11652, qui a été acquise auprès du Centre for Global Microfungal Biodiversity situé à Toronto.

2.1.3 Criblage

2.1.3.1 Milieux réactionnels liquides

Après avoir sélectionné les souches capables de croître sur les milieux nutritifs en moins d'un mois, nous avons entamé un criblage plus spécifique pour sélectionner les souches produisant des EML. Lors de cette étape de criblage, nous recherchions une méthode rapide et économique permettant d'évaluer un grand nombre de souches. À cet effet, deux solutions nutritives liquides ont été préparées, l'une contenant du gaïacol et l'autre contenant du Remazol Brilliant Blue R (RBBR), un colorant azoïque anthraquinonique utilisé en tant que réactif colorimétrique. Ces réactifs réagissent en présence d'enzymes de modification de la lignine, entraînant des changements d'absorbance à des longueurs d'onde spécifiques (470 nm pour le gaïacol et 595 nm pour le RBBR).

La solution nutritive liquide avec gaïacol était composée de 1 litre d'eau de mer à 15 ‰ de salinité, 0,5 g de nitrate d'ammonium, 2 g de carboxyméthylcellulose, 0,2 g de xylose, 150 µL de gaïacol, et le pH était ajusté à 7 avec du HCl 1M. La solution nutritive liquide avec RBBR était composée de 1 litre d'eau de mer à 15 ‰ de salinité, 0,5 g de nitrate d'ammonium, 2 g de carboxyméthylcellulose, 0,2 g de xylose, 0,2 g (33 µmol) de RBBR, et le pH était également ajusté à 7 avec du HCl 1M.

Les mesures d'absorbance ont été effectuées dans des microplaques de 96 puits à l'aide d'un spectromètre UV/VIS Agilent Cytation 5. Pour le gaïacol, les lectures ont été effectuées à deux moments différents, soit à 10 et à 20 jours. Comme le RBBR est une molécule plus difficile à dégrader, une seule lecture a été effectuée après 20 jours d'incubation (Machado et al. 2005, Sya & Ali 2021). De plus, comme il s'agit d'une molécule dont la toxicité pour certains organismes est connue, la résistance à ce colorant azoïque constitue une caractéristique de sélection supplémentaire (Farhan Hanafi & Sapawe 2020).

Lors de la mise en place du dispositif, 5 ml des deux solutions stériles contenant les réactifs ont été versés dans des tubes Falcon™ de 15 ml en deux répliques. L'inoculation des tubes a été réalisée en prélevant un disque de 4 mm de diamètre à partir de cultures en boîte de Petri cultivées sur le milieu de maintien PDA. Les tubes ont été incubés dans un incubateur agitateur réglé à 18°C et 160 tours/min.

2.1.3.2 Évaluation de la croissance

Afin de valider que les souches sélectionnées avaient la capacité de croître relativement rapidement en culture, leur vitesse de croissance a été comparée à celles de souches de référence couramment utilisées dans la littérature : *Pleurotus ostreatus* et *Trametes versicolor*. Ces souches peuvent couvrir la surface de gélose nutritive en boîtes de Petri de 9 cm de diamètre en moins de deux semaines à des températures de 20-25°C (Chmelová et al. 2022). La capacité de ces souches à croître rapidement est souvent citée en exemple pour des

productions économiquement viables à plus grande échelle, c'est-à-dire dans des volumes de plusieurs centaines de litres ou plus. Bien que la vitesse de croissance ne garantisse pas à elle seule le succès ou la viabilité d'une production à grande échelle, elle en constitue un aspect essentiel.

Les souches sélectionnées ont été inoculées sur quatre milieux de culture : PDA (Difco™), YMA (Himedia™), ainsi que les deux milieux d'isolement FB et gaïacol sans antibiotique. Les milieux PDA et YMA ont été préparés conformément aux instructions des fabricants. La culture a été réalisée en boîtes de Petri et incubée à 18°C, avec un nombre d'échantillons (n) égal à 4.

Les souches cultivées dans la solution contenant du RBBR ont servi d'inoculum pour les boîtes de Petri afin de confirmer qu'elles étaient toujours viables après une exposition prolongée à cette substance. Cette caractéristique pourrait s'avérer intéressante pour des applications potentielles telles que des procédés de bioremédiation.

Les cultures en boîtes de Petri ont été incubées à une température de $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Des mesures de croissance radiale ont été effectuées à des intervalles de deux jours sur une période de 14 jours. Cette méthode consiste à mesurer la distance entre l'inoculum de départ et l'extrémité de la zone de croissance sur quatre axes équidistants, la figure 25 ci-dessous illustre la méthode. Les axes sont numérotés pour permettre un enregistrement indépendant de la croissance, un aspect particulièrement important lorsque des colonies présentent une croissance irrégulière (non circulaire).

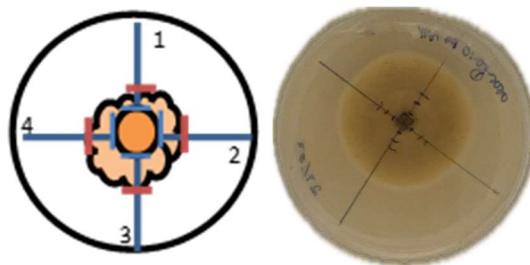


Figure 25 : Mesure de croissance radiale en boîte de Petri

À ce moment, la densité apparente des souches est également évaluée. Cette donnée permet de s'assurer que la vitesse de croissance n'est pas due à une incapacité à utiliser les nutriments du milieu. Dans de tels cas, la vitesse de croissance est habituellement rapide mais avec peu d'embranchements, ce qui conduit à une faible densité ou épaisseur de mycélium (Madusanka et al. 2024). Ainsi, lorsque la souche fongique ne présente pas un mycélium épais et dense, le milieu est considéré comme inapproprié pour celle-ci.

2.1.3.3 Identification moléculaire des souches

Les souches ont été sélectionnées en fonction de leur score normalisé (min-max) avec une pondération égale pour les critères suivants : augmentation de l'absorbance en présence de gaïacol aux jours 10 et 20, et diminution de l'absorbance en présence de RBBR. Un exemple de calcul est présenté à l'annexe 1. Seules les souches présentant un diamètre supérieur à 10 mm sur gélose nutritive PDA ou YMA après 14 jours de croissance à 18°C ont été retenues (critères basés sur des observations spécifiques). Ainsi, 20 souches ont été choisies pour le séquençage, ce nombre étant limité pour correspondre au nombre maximum d'échantillons par plaque séquencée, afin de réduire les coûts.

Voici la version révisée de votre texte, incluant le modèle de thermocycleur et les cycles d'amplification : L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide du DNeasy Plant Mini Kit® de Qiagen. L'ADN a été extrait à partir de mycéliums purs cultivés en boîtes de Petri, en utilisant 50 µL d'eau distillée stérile. L'amplification a été effectuée à l'aide du Master Mix Froggmix et des amorces ITS1(F) et ITS4(R), comme décrit par White et al. (1990), ciblant les régions ITS de l'ADN ribosomal. Le protocole d'amplification a été réalisé sur un thermocycleur Bio-Rad T100, avec les cycles suivants :

95°C pendant 3 minutes (1 cycle)

95°C pendant 45 secondes

58°C pendant 30 secondes

72°C pendant 1 minute et 30 secondes (40 cycles)

72°C pendant 10 minutes (1 cycle)

4°C en maintien

Le séquençage a été effectué par la plateforme de séquençage et de génotypage du CHUL de Québec. Les résultats ont été analysés en comparant les séquences obtenues avec celles disponibles dans la base de données publique GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) à l'aide de l'outil BLAST+ version 2.13.0.

2.1.4 Caractérisation physiologique des souches fongiques

À la suite de l'identification des souches, quatre espèces fongiques ont été sélectionnées pour des analyses plus approfondies. Cette sélection s'est basée principalement sur les scores les plus élevés obtenus à l'étape précédente et sur la vérification qu'elles ne présentaient pas de risques significatifs pour la santé humaine. *Filospora exilis* a été conservée car il s'agit de la seule espèce strictement aquatique isolée et identifiée.

Ces analyses visaient à caractériser leurs propriétés physiologiques, incluant :

- L'étude des températures cardinales de croissance.
- La capacité d'absorption de diverses sources de carbone et d'azote.
- L'impact du pH sur la croissance.
- L'halotolérance (résistance aux stress osmotiques).

Ces caractéristiques ont pour but de permettre une meilleure compréhension de besoins et capacités de croissance et de leurs applications potentielles.

2.1.5 Profil d'absorption de diverses sources de carbone et d'azote, plage de pH et halotolérance

Pour évaluer l'assimilation de diverses sources de carbone et d'azote, ainsi que les tolérances au pH et à la salinité, des microplaques de phénotypage Biolog™ à 96 puits (plaques #pm1, pm2, pm3, pm9, pm10) ont été utilisées. Les plaques numéro pm1 et pm2 contiennent diverses sources de carbones, les plaques pm3 diverses sources d'azote, les plaques pm9 permettent d'analyser la croissance en fonction du pH et les plaques pm10 en fonction du niveau de salinité. Les inoculums ont été préparés en collectant le mycélium à la surface des géloses à l'aide d'un coton-tige stérile préalablement trempé dans une solution saline à 0,1 %, assurant ainsi la récupération maximale de mycélium sans gélose. Les solutions contenant le mycélium ont été homogénéisées deux fois pendant 10 secondes à l'aide d'un vortex, avec un intervalle de 30 secondes entre les homogénéisations. Ensuite, ces solutions ont été diluées dans la solution "FF-IF" de Biolog™ jusqu'à atteindre une transmittance cible de 50 % à 75 % à 750 nm.

Après dilution, 100 µL de chaque solution ont été pipetés dans les puits correspondants des microplaques. Pour les microplaques sans carbone, une solution nutritive contenant du saccharose à une concentration équivalente à celle du glucose recommandé par Biolog™ a été utilisée. Après correction des blancs d'expérience, la valeur maximale d'absorbance pour chaque courbe a été enregistrée. Les lectures ont été effectuées toutes les huit heures à l'aide d'un spectromètre UV/VIS Agilent Cytation.

Pour évaluer l'assimilation de diverses sources de carbone et d'azote, ainsi que les tolérances au pH et à la salinité, des microplaques de phénotypage Biolog™ à 96 puits (plaques #PM1, PM2, PM3, PM9, PM10) ont été utilisées. Les plaques sont pré-remplies et prêtes à l'emploi. Les plaques PM1 et PM2 contiennent une variété de substrats carbonés, permettant d'évaluer l'utilisation de différentes sources de carbone par les microorganismes. Cela aide à déterminer les préférences métaboliques et les capacités de dégradation des composés carbonés. Les plaques PM3 permettent de tester l'assimilation de différentes sources d'azote, y compris les composés inorganiques comme les nitrates et les nitrites, ainsi

que les composés organiques comme les acides aminés et les peptides. Les plaques PM9 contiennent des milieux de culture ajustés à différents pH, permettant d'évaluer la croissance des microorganismes dans une gamme de conditions de pH. Enfin, les plaques PM10 sont conçues pour tester la croissance des microorganismes à différentes concentrations de sel. Elles sont utilisées pour étudier l'halotolérance et la capacité des souches à survivre et croître dans des environnements salins.

Les inoculums ont été préparés en collectant le mycélium à la surface des géloses à l'aide d'un coton-tige stérile préalablement trempé dans une solution saline à 0,1 %, assurant ainsi la récupération maximale de mycélium sans gélose. Les solutions contenant le mycélium ont été homogénéisées deux fois pendant 10 secondes à l'aide d'un vortex, avec un intervalle de 30 secondes entre les homogénéisations. Ensuite, ces solutions ont été diluées dans la solution tampon "FF-IF" de Biolog™ jusqu'à atteindre une transmittance cible de 50 % à 75 % à 750 nm.

Après dilution, 100 µL de chaque solution ont été pipetés dans les puits correspondants des microplaques. Pour les microplaques sans carbone, une solution nutritive contenant du saccharose à une concentration équivalente à celle du glucose recommandé par Biolog™ a été utilisée. Après correction des blancs d'expérience, la valeur maximale d'absorbance pour chaque courbe a été enregistrée. Les lectures ont été effectuées toutes les huit heures à l'aide d'un spectromètre UV/VIS Agilent Cytation 5.

2.1.6 Détermination des températures cardinales de croissance

Afin de déterminer les températures cardinales de croissance, la croissance radiale moyenne a été mesurée sur quatre axes distincts, comme décrit précédemment, pendant une période de six jours. Cette expérience a été divisée en trois phases, chacune comprenant trois températures de croissance et quatre répétitions (n) : 15°C, 25°C, 37°C ; 20°C, 25°C, 27°C ;

et enfin, 20°C, 22°C et 25°C. Pour garantir la cohérence des résultats, les trois mêmes incubateurs ont été utilisés pour chacune des phases.

2.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.2.1 Échantillonnage et isollements des mycètes filamenteux

Soixante-dix-sept échantillons ont été prélevés sur 44 sites distincts (voir Figure 24). Chaque échantillon a ensuite été inoculé sur géloses en triplicata, pour un total de 231 unités expérimentales.

Tableau 4 : Répartition des sites d'échantillonnages

Zones d'échantillonnage	Nombre de sites échantillonnés	Types d'échantillons
Sud-ouest (Montmagny à Rivière-du-Loup)	8	Ligneux et cellulosiques
Sud-est (Cacouna à Matane)	10	Ligneux et cellulosiques
Nord-ouest (Saint-Joachim à la rivière Saguenay)	8	Ligneux et cellulosiques
Nord-est (rivière Saguenay à Baie-Comeau)	7	Ligneux et cellulosiques
Navire de recherche Lampsilis (Québec à Cacouna)	11	Particules lignocellulosiques < 800 µm

Quatre-vingt-trois souches fongiques filamenteuses ont ainsi pu être discriminées. Parmi celles-ci, neuf ont présenté une réaction hâtive positive avec le gaïacol sur le premier milieu d'isolement non nutritif, se traduisant par une coloration spécifique caractéristique en présence d'EML (voir Figure 26).



Figure 26 : Réaction de coloration du gaïacol en présence d'enzymes de modification des lignines

Par la suite, les souches présentant une physiologie et une morphologie similaires ont été regroupées. L'apparence du mycélium, la provenance de l'échantillon, l'intensité et la taille de la zone oxydée (colorée) dans les milieux avec gaïacol, ainsi que le diamètre moyen sur les deux milieux de culture, ont été utilisés comme critères de regroupement. Cette étape a permis de réduire le nombre de souches à un total de 83. Parmi celles-ci, 46 ont produit la réaction attendue avec le gaïacol en présence d'enzymes de modification des lignines (EML). Le tableau 5, ci-dessous, présente les secteurs d'échantillonnage associés

Tableau 5 : Origine des souches isolées

Secteurs de prélèvement	Substrats ligneux	Substrats cellulositiques	Particules ligno-cellulosiques en mer	TOTAL
Sud-ouest*	7	9	n/a	16
Sud-est*	9	10	n/a	19
Nord-ouest*	16	8	n/a	24
Nord-est*	8	7	n/a	15
En mer	n/a	n/a	9	9
TOTAL	40	34	9	83

*Échantillons côtiers

2.1.1 Criblage en milieu réactionnel liquide

Les 83 souches retenues ont été utilisées pour le dispositif de criblage en milieu réactionnel liquide et comparées aux 6 souches de référence présentées à la section 2.1.2 de ce chapitre.

Le tableau 6 ci-dessous présente de manière concise les pointages normalisés obtenus pour les souches sélectionnées, celles ayant le plus grand potentiel pour notre étude, comparativement aux souches de référence et identifiées moléculairement dans les étapes subséquentes. Les souches de références y figurent également.

Les pointages normalisés obtenus avec le gaïacol au jour 10 varient entre 0 et 1.8398, avec le gaïacol au jour 20 entre 0 et 1.9708, et avec le RBBR au jour 20 entre 0 et 0.22. Les 20 meilleurs pointages des souches isolées varient de 0.3 à 2.37.

Tableau 6 : Pointage normalisé par souche

Souches	Pointages normalisés gaïacol jours 10 (Δ_{max})	Pointages normalisés gaïacol jours 20 (Δ_{max})	Pointages normalisés RBBR jours 20 (Δ_{max})	Pointages totaux
<i>Graphium rubrum</i> (#113)*	0.94	1	0.43	2,37
<i>Pestalotiopsis linearis</i> (#46)*	0.85	0.9	0.48	2,23
<i>Pleurotus ostreatus</i> (#91)*	0.98	0.93	0	1,91
<i>Filosporella exilis</i> (#71)*	0.81	0.89	0	1,7
<i>Magnaporthiopsis agrostidis</i> (#115)*	0.35	0.67	0.28	1,3
<i>Ganoderma lucidum</i> (#96)*	0.12	0.31	0.73	1,16
<i>Polyporus brumalis</i> (#90)*	0.004	0.014	1	1,018
<i>Penicillium chrysosporum</i> (#117)*	0	0	0.34	0,35
<i>Trametes versicolor</i> (#93)*	0.059	0.071	0	0,13
<i>Trichoderma atrovirides</i> (#116)*	0	0	0	0

*Numéro d'identifiant attribué avant l'identification moléculaire des souches

2.2.2 Évaluation de la croissance sur différents milieux

Parmi les souches ayant obtenu un résultat supérieur aux contrôles lors des essais en milieux liquides réactionnels, 39 ont pu recommencer à croître après un contact prolongé avec le RBBR. Le tableau 7 ci-dessous présente les résultats pour les quatre souches sélectionnées suite à l'identification, comparativement à ceux obtenus pour deux souches de référence.

Tableau 7 : Moyenne de croissance radiale (mm) et réaction gaïacol à 18±1°C sur quatre milieux de culture en 14 jours

Souche	Milieu GUA	Réaction GUA	PDA	YMA	FB
<i>Pleurotus ostreatus</i>	≥35	25	≥35	≥35	≥35
<i>Polyporus brumalis</i>	17	17	≥35	≥35	≥35
<i>Graphium rubrum</i>	16	17	22	25	10
<i>Filosporella exilis</i>	10	15	8	11	5
<i>Magnaporthiopsis agrostidis</i>	15	15	5	5	0
<i>Pestalotiopsis linearis</i>	≥35	40	≥35	≥35	≥35

*Une boîte est considérée pleine lorsque les mesures radiales moyennes atteignent 35 mm.

La souche 113 (*Graphium rubrum*), qui avait obtenu un pointage élevé lors des essais en milieux réactionnels liquides, montre cependant une moyenne de croissance radiale plus limitée. Parmi les souches isolées, seule la souche 46 présente une croissance équivalente à celles des souches de référence *Pleurotus ostreatus* et *Polyporus brumalis*. De plus, durant la période d'incubation de 14 jours, seule cette souche a produit une réaction avec le gaïacol qui s'est diffusée sur l'ensemble de la gélose.

Dans l'ensemble, la croissance des souches n'est pas significativement différente sur les milieux gélifiés PDA et YMA. Ces deux milieux peuvent donc être utilisés indifféremment pour ces souches.

2.2.3 Identification

2.2.3.1 Résultats du séquençage

La procédure d'identification a été réalisée sur les vingt souches ayant obtenu les scores les plus élevés lors du criblage, tel que décrit à la section 2.1.3.3, en utilisant les amorces ciblant les régions ITS1(F) et ITS4(R). L'utilisation de ces amorces est courante pour l'identification des champignons au niveau du genre, car la région ITS présente une grande variabilité interspécifique et est largement utilisée dans les études de taxonomie fongique. Cependant, pour une identification précise au niveau de l'espèce, il peut être nécessaire d'utiliser des amorces spécifiques à d'autres régions génomiques (par exemple, RPB2 ou TEF1). Dans le cadre de cette étude, les amorces ITS ont été jugées suffisantes en raison de leur capacité à différencier la majorité des espèces fongiques et de leur large applicabilité dans la taxonomie fongique. Toutefois, l'identification au niveau de l'espèce reste incertaine pour certaines souches en raison des limites inhérentes à l'utilisation des séquences ITS pour distinguer des espèces très proches.

Les résultats de similitude obtenus lors de l'analyse des séquences montrent des correspondances variées avec les espèces référencées dans les bases de données publiques.

- Similitudes élevées (99 % et plus) : Ces résultats indiquent une forte correspondance avec les espèces référencées dans les bases de données, ce qui signifie que les souches isolées sont probablement les mêmes espèces que celles déjà connues. Une correspondance de 99 % ou plus est généralement considérée comme une identification fiable au niveau de l'espèce. Nilsson et al. (2008) ont montré que des pourcentages de similitude élevés (>99 %) dans les séquences ITS permettent une identification précise au niveau de l'espèce pour la plupart des champignons.
- Similitudes entre 95 % et 98 % : Bien qu'il y ait une bonne correspondance, il est possible que ces souches représentent des variations d'espèces connues ou

même des espèces proches mais distinctes. Dans cette plage, il peut être nécessaire d'examiner d'autres marqueurs génétiques pour confirmer l'identification au niveau de l'espèce. Gazis et al. (2011) ont suggéré que des pourcentages de similitude dans cette plage peuvent indiquer soit une espèce très proche, soit une variation intraspécifique.

- Similitudes inférieures à 95 % : Ces résultats pourraient indiquer des divergences importantes par rapport aux espèces répertoriées, ce qui peut suggérer l'existence d'espèces nouvelles ou non encore bien caractérisées. Des analyses supplémentaires, telles que l'utilisation d'autres marqueurs génétiques ou des analyses phylogénétiques, seraient nécessaires pour confirmer cela. Tedersoo et al. (2014) ont montré que des similitudes inférieures à 95 % dans les séquences ITS peuvent indiquer la présence d'espèces non décrites ou mal caractérisées dans les bases de données.

Ce constat pourrait expliquer pourquoi, malgré les efforts déployés pour regrouper les souches selon leurs caractéristiques macromorphologiques et leurs taux de croissance similaires afin d'éviter l'identification répétée d'une même espèce, plusieurs souches ont été identifiées comme appartenant aux mêmes espèces. Les caractéristiques morphologiques seules ne suffisent souvent pas à distinguer des espèces étroitement apparentées, nécessitant ainsi le recours à des méthodes moléculaires pour une identification plus précise. Par ailleurs, les différences morphologiques ou de croissance observées au sein d'une même espèce pourraient également résulter de variations inter-souches (Manawasinghe et al., 2021).

Tableau 8 : Identification moléculaire des souches

Similitude avec la séquence de référence (%)	Genre	Espèces
96.19	<i>Filosporella</i>	<i>Filosporella exilis</i>
99.81	<i>Graphium</i>	<i>Graphium rubrum</i>
99.43	<i>Graphium</i>	<i>Graphium Rubrum</i>
98.81	<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium novozelandicum</i>
98.78	<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium novozelandicum</i>
98.05	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria pobletensis</i>
97.7	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria obclavata</i>
99.81	<i>Graphium</i>	<i>Graphium rubrum</i>
99.81	<i>Graphium</i>	<i>Graphium rubrum</i>
100	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Pestalotiopsis linearis</i>
99.81	<i>Graphium</i>	<i>Graphium rubrum</i>
98.47	<i>Neonectria</i>	<i>Neonectria lugdunensis</i>
98.11	<i>Magnaporthiopsis</i>	<i>Magnaporthiopsis agrostidis</i>
96.19	<i>Filosporella</i>	<i>Filosporella exilis</i>
99.81	<i>Graphium</i>	<i>Graphium rubrum</i>
97.26	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria obclavata</i>
96.42	<i>Septoriella</i>	<i>Septoriella phragmitis</i>
99.56	<i>Neonectria</i>	<i>Neonectria lugdunensis</i>
98.79	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria pobletensis</i>
100	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Pestalotiopsis linearis</i>

Parmi les souches identifiées, seules *Filosporella* et *Septoriella* appartiennent à des genres spécifiquement associés aux milieux aquatiques d'eau saumâtre (Shearer et al., 2007). L'origine de l'échantillon duquel *Filosporella exilis* a été isolée correspond à ce type d'écosystème, puisqu'il provient d'une tige herbacée avec aérénchymes (Maharning & Bärlocher, 1996).

Tableau 9 : Origine des échantillons des souches retenues

Espèce	Secteur de récolte	Type de matière
<i>Graphium rubrum</i> (#113)	Côtier, nord-ouest. Petite-Rivière St-François	Cellulosique : tige herbacée avec aérénchymes
<i>Filosporella exilis</i> (#71)	Côtier, sud-est, Métis	Cellulosique : tige herbacée avec aérénchymes
<i>Magnaporthiopsis agrostidis</i> (#115)	Côtier, sud-ouest, Cap St-Ignace	Ligneuse : bois de grève
<i>Pestalotiopsis linearis</i> (#46)	Eau libre, port de Québec	Particules organiques et plastiques (800 µm à 5 mm)

Les souches sélectionnées proviennent de divers secteurs et ont été isolées à partir de différents types de matières. Aucun type de matière, qu'il soit plus cellulosique ou ligneux, ni aucun secteur d'échantillonnage en particulier, n'a présenté un avantage significatif pour l'isolement des souches produisant des EML lors de cette campagne de bioprospection.

2.2.3.2 Présentation des souches sélectionnées

Graphium rubrum :

Tableau 10 : Classification scientifique de *G.rubrum*

Règne	Division	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Mycètes	<i>Ascomycota</i>	Sordidario-mycètes	<i>Microascales</i>	<i>Microascaceae</i>	<i>Graphium</i>	<i>Rubrum</i>

Graphium rubrum est une espèce fongique qui a été identifiée dans diverses régions, y compris au Québec. Ce champignon est reconnu pour son rôle de phytopathogène affectant plusieurs espèces d'arbres, où il est souvent associé à une coloration de l'aubier, une condition potentiellement préjudiciable à la santé et à l'esthétique de l'arbre (Lundell et al. 2014, Verkleij 2020).

Au-delà de son impact en phytopathologie, *G. rubrum* a attiré l'attention pour sa capacité à dégrader des composés organiques complexes, notamment des hydrocarbures pétroliers tels que ceux ayant des chaînes carbonées de longueur C10 à C16. Cette propriété le rend particulièrement intéressant pour des applications en bioremédiation, où il pourrait contribuer à la décontamination de sites affectés par des déversements pétroliers ou des accumulations d'hydrocarbures.

La distribution de *G. rubrum* est globale, avec des signalements dans de nombreuses régions du monde. Cette ubiquité suggère une grande capacité d'adaptation à divers environnements et un potentiel pour diverses applications biotechnologiques. En raison de ces attributs, *G. rubrum* pourrait représenter une souche fongique d'intérêt pour des études approfondies axées sur l'écologie, la pathogénicité des plantes, et les applications environnementales de restauration (Lowery et al. 1968).

Filosporella exilis

Tableau 11 : Classification scientifique de *F.exilis*

Règne	Division	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Mycètes	Ascomycota	Leotiomycètes	Helotiales	Helotiaceae	<i>Filosporella</i>	<i>Exilis</i>

Cette espèce se rencontre principalement sur des débris végétaux submergés en eaux douces ou saumâtres. Sa présence a été signalée dans diverses régions, notamment au Bélarus, en Corée et au Canada dans la région des Grands Lacs, soulignant sa capacité à prospérer dans différents habitats aquatiques (Czeczuga et al. 2005, Mun et al. 2019).

Magnaporthiopsis agrostidis

Tableau 12 : Classification scientifique de *M.agrostidis*

Règne	Division	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Mycètes	Ascomycota	Sordidario-mycètes	Magnaporthales	Magnaporthaceae	Magnaporthiopsis	Agrostidis

Magnaporthiopsis agrostidis est une espèce de champignon principalement connue pour son rôle pathogène dans les maladies des graminées, en particulier dans des cultures importantes comme le gazon et les céréales. Elle est impliquée dans des maladies du système racinaire et de la base des tiges, pouvant parfois causer des pertes significatives dans les cultures affectées.

Par ailleurs, ce champignon semble aussi jouer un rôle d'endophyte chez certaines espèces d'arbres sans y manifester de caractéristiques pathogènes. Cette dualité de comportement suggère que *M. agrostidis* pourrait contribuer à des phénomènes écologiques complexes similaires aux "brûlés" observés sous les arbres mycorhizés par des truffes (espèces du genre *Tuber*). Ce stade pourrait être nécessaire au cycle de reproduction sexuée selon Wong et Walker (Wong & Walker 1975).

Pestalotiopsis linearis

Tableau 13 : Classification scientifique de *P.linearis*

Règne	Division	Classe	Sous-classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Mycètes	Ascomycota	Sordidario-mycètes	Xalariomycetidae	Xylariales	Amphisphaeriaceae	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Linearis</i>

Le genre *Pestalotiopsis*, comme celui de *Magnaporthiopsis*, comporte des espèces appartenant à divers groupes écologiques pouvant se chevaucher : endophyte, parasite et

saprophyte. Bien que *Pestalotiopsis linearis* soit cité dans plusieurs études de classification phylogénétique, peu d'isolations de ce champignon semblent avoir été réalisées, à l'exception de celle présentée par Maharachchikumbura et al. (2012) à partir de feuilles saines de *Trachelospermum* (jasmin) provenant du Jardin botanique de Kunming, dans la province du Yunnan en Chine. Il s'agit également de la séquence avec laquelle notre isolation a été comparée avec BLAST®. Les auteurs citent également le genre *Tsuga sp.* comme hôtes potentiels pour ce champignon.

Pestalotiopsis linearis est une espèce de champignon qui se distingue par sa capacité à décomposer divers matériaux organiques et parfois à agir en tant que pathogène sur les plantes. Cette espèce est particulièrement intéressante pour la recherche en raison de sa capacité à produire des composés naturels aux propriétés antibiotiques ou antifongiques. Elle est également étudiée dans le cadre de la bioremédiation pour sa faculté à dégrader les polluants organiques, ce qui pourrait être utilisé pour le traitement des déchets ou la décontamination des sols (de Gruyter et al. 2013, Song et al. 2013).

2.2.3.3 Conservation des souches

Les quatre souches sélectionnées ont été placées en conservation sur grains de millet dans une solution de glycérol à -80°C pendant une durée de quatre mois. Cette méthode de conservation n'a produit aucun impact significatif sur la vitesse de croissance post-conservation des quatre souches en comparaison avec celle obtenue lors de leur repiquage régulier. Cette méthode de conservation est donc appropriée pour les quatre souches ciblées.

De plus, les souches conservées à -80°C ont également conservé leur capacité à réagir avec le gaïacol après remise en culture, indiquant ainsi la préservation de leur activité enzymatique. Cette observation démontre que les souches conservées maintiennent leurs caractéristiques fonctionnelles, ce qui est essentiel pour toute application future.

2.2.4 Caractérisation physiologique

2.2.4.1 Températures cardinales de croissance

Pour déterminer les températures de croissance cardinales, les quatre espèces sélectionnées : *Filosporrella exilis*, *Pestalotiopsis linearis*, *Graphium rubrum* et *Magnaporthiopsis agrostidis* ainsi que les souches de référence *Pleurotus ostreatus* et de *Polyporux brumalis* ont été cultivées à l'intérieur sur géloses nutritive YMA à l'intérieur d'une plage de température allant de 15°C à 37°C sur une période de 6 jours. Les mesures de la longueur radiale ont servi d'indicateur de la croissance fongique. Le graphique de la figure 27 ci-dessous résume ces données.

Les quatre souches sélectionnées montrent des températures de croissance optimales plus faibles que celles des deux souches de références. Leurs températures cardinales se trouvant entre 20°C et 25°C, comparativement à 25°C et 27°C pour la souche *Pleurotus ostreatus*.

Dans le cas de *Polyporux brumalis*, malgré son nom commun français de "polypore hivernal", la température de croissance optimale mesurée dépasse 37°C. Des essais supplémentaires, bien que non présentés dans cette étude, ont même démontré sa tolérance jusqu'à une température de 44°C. Ces observations soulignent une adaptation thermique inhabituelle pour une espèce communément associée aux environnements tempérés.

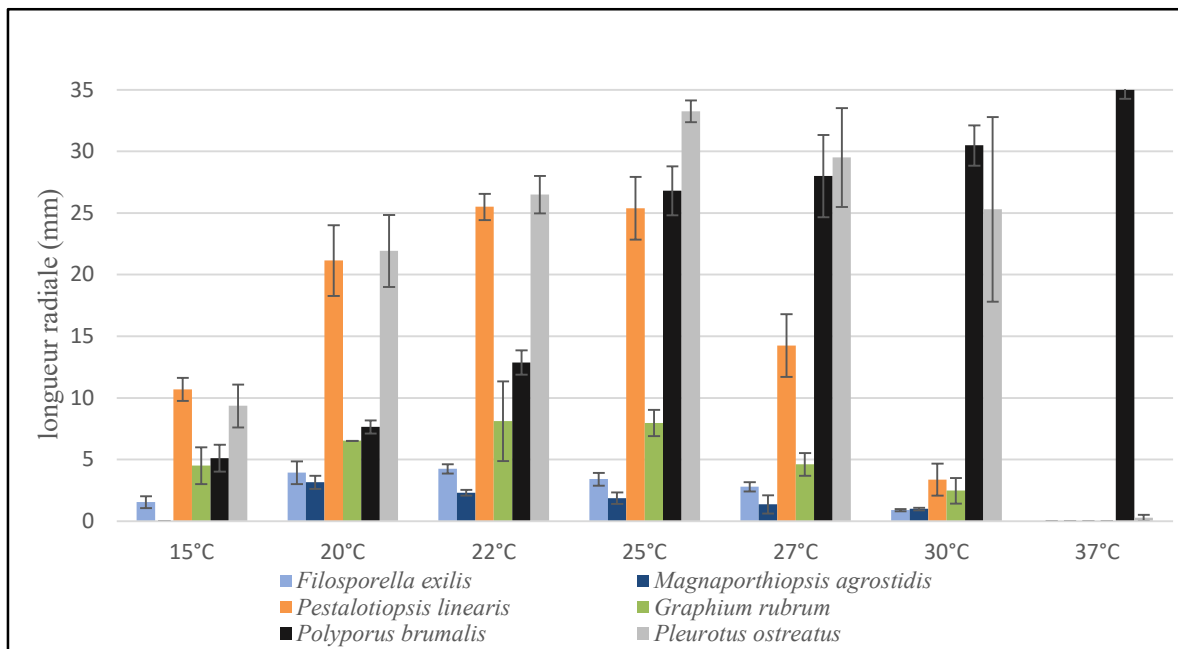


Figure 27 : Comparaison de la croissance entre les espèces en 6 jours en fonction de la température d'incubation

Parmi les espèces isolées sélectionnées, seule *Pestalotiopsis linearis* présente une vitesse de croissance comparable, jusqu'à 22°C, à celle de *Pleurotus ostreatus*, une espèce souvent citée en raison de sa grande vitesse de croissance. Les trois autres souches montrent des vitesses de croissance moyennes de moins de 1 mm par jour, tandis que les vitesses de croissance de *P. linearis*, *P. ostreatus*, et *P. brumalis* sont plus de quatre fois supérieures, dépassant 4 mm par jour. Le profil de croissance de chaque souche en fonction des températures de croissance sont détaillées dans les graphiques 28, 29, 30, 31, 32 et 33, ci-dessous.

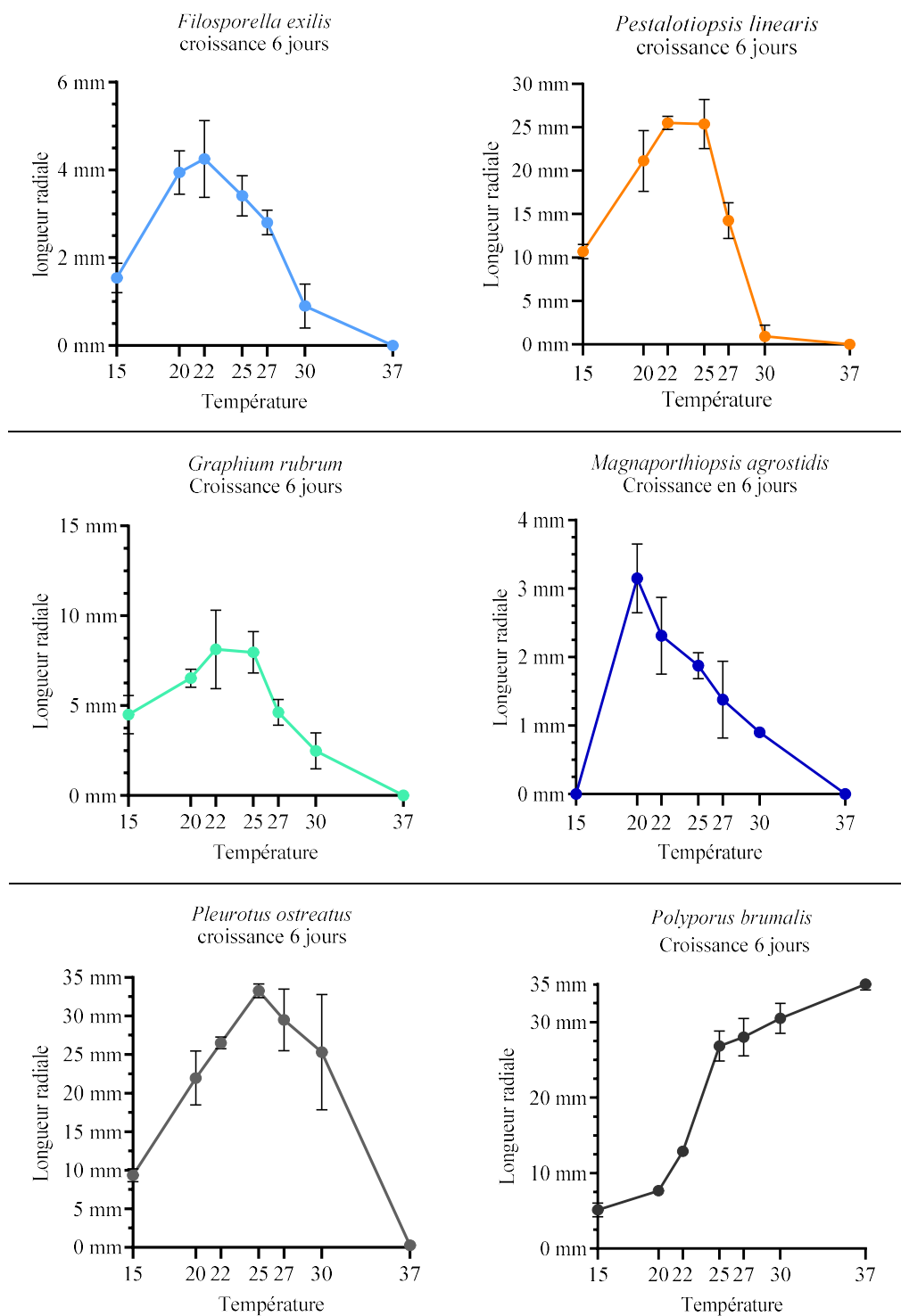


Figure 28 à 33: Cinétique de croissance radiale par espèce en 6 jours en fonction de la température

Ces données peuvent être particulièrement utiles pour déterminer les plages de températures convenables pour diverses applications avec ces souches. La température est un facteur clé qui influence la vitesse de croissance et peut affecter directement la production de biomasse ainsi que la synthèse de métabolites secondaires.

2.2.4.2 Sources de carbones et d'azotes préférentielles et conditions limites de salinité et de pH

Bien que le coût élevé des plaques de phénotypage limite le nombre de répétitions par souche ($n=2$), les résultats obtenus à l'aide des microplaques de phénotypage Biolog™ servent de premier outil d'évaluation des tendances et de comparaison préliminaire. Les données fournissent des indications précieuses sur les préférences métaboliques des souches étudiées et peuvent orienter des études subséquentes (ZAK et al. 1994).

Les données issues des microplaques PM1 et PM2, comprenant 95 types de carbone et un contrôle par plaque, ont été classées par ordre décroissant en fonction des valeurs d'absorbance mesurées à 750 nm après soustraction du blanc expérimental. Les effets des molécules sans azote ont été comparés entre elles afin de distinguer l'influence de la source de carbone, sachant que dans certains puits, les sources de carbone sont associées à une molécule azotée.

Concernant les sources d'azote des microplaques PM3, seuls certains puits contenant des sources d'azote simples ont été pris en compte. Il s'agit des molécules organiques telles que l'urée et le biuret, ainsi que des molécules inorganiques telles que l'ammoniaque, le nitrate et le nitrite de sodium. Cette approche avait pour objectif de cibler spécifiquement l'effet des différentes sources d'azote sur la croissance des souches étudiées.

Il est important de mentionner que pour toutes les souches, les acides aminés ont permis d'obtenir les plus fortes augmentations d'absorbance sur les microplaques. Cependant,

comme de nombreux acides aminés sont présents sur les plaques Biolog™ PM3 et que la réponse des champignons varie considérablement entre les espèces et pour chaque acide aminé, cette donnée n'est pas présentée en détail. Les principaux résultats obtenus sont présentés au tableaux 14.

Pestalotiopsis linearis

Pour *Pestalotiopsis linearis*, les polyols comme le D-Sorbitol et le D-Mannitol ont produit les plus hauts résultats d'absorbance, indiquant une préférence pour ces sources de carbone. Ces composés sont probablement facilement assimilables par *P. linearis*, permettant une croissance ou une activité métabolique plus importante. Le D-Glucose, souvent considéré comme une source de carbone privilégiée pour de nombreux microorganismes, se trouve plus bas dans la liste, ce qui peut indiquer une spécificité métabolique ou une adaptation à des sources de carbone alternatives. Cette observation est en ligne avec des études précédentes montrant que les espèces de *Pestalotiopsis* peuvent utiliser divers substrats de manière efficace pour produire des métabolites secondaires bioactifs (Maharachchikumbura et al. 2014).

Au niveau des sources d'azote, l'urée se classe au sommet pour cette souche, ce qui suggère qu'il s'agit d'une source d'azote efficace pour celle-ci. Cela peut être dû à la capacité du champignon à hydrolyser l'urée pour libérer de l'ammoniac, utilisé ensuite dans la biosynthèse des acides aminés. Les nitrates et nitrites se sont avérés moins efficaces (Dube 1971).

Graphium rubrum

Graphium rubrum montre une préférence marquée pour le D-Fructose comme source de carbone, avec une absorbance significativement élevée, suivie par le Maltotriose, le D-Mannitol, et le Maltose. Cette préférence pour le D-Fructose suggère une adaptation à des substrats riches en fructose ou une capacité métabolique optimisée pour l'assimilation de ce sucre simple. Les polysaccharides et les alcools de sucre comme le Maltotriose et le D-Mannitol suivent de près, indiquant une flexibilité dans l'utilisation des sources de carbone, ce qui peut être avantageux dans des environnements où la disponibilité des nutriments varie (Seifert & Gams 2011).

Concernant l'azote, le nitrite (NO_2^-) est la source la plus efficacement utilisée par *G. rubrum*. L'urée et le nitrate (NO_3^-) suivent, indiquant une capacité à utiliser une gamme d'ions azotés, ce qui peut refléter une flexibilité métabolique en termes de nutrition azotée. L'utilisation moins efficace de l'ammoniaque (NH_4^+) par rapport à d'autres sources d'azote peut indiquer une spécificité enzymatique ou des mécanismes de transport préférant le nitrite et l'urée (Eckhardt 2002).

Filospora exilis

Pour *Filospora exilis*, le D-Glucose est la source de carbone la plus efficacement utilisée, ce qui est cohérent avec de nombreux microorganismes pour lesquels le glucose est souvent la source de carbone privilégiée en raison de sa facilité d'assimilation et de son efficacité énergétique (Buchan et al. 2014). Le D-Mannose et l'acide formique suivent, indiquant une capacité notable à utiliser des sucres simples ainsi que des composés carboxyliques, ce qui peut refléter une flexibilité métabolique dans l'utilisation des substrats. La présence de sources de carbone plus exotiques, comme le Tween 40 et le succinate d'oxyde de méthyle, plus bas dans le classement, souligne la capacité de ce champignon à métaboliser une gamme variée de substrats, bien qu'avec une efficacité moindre que le

glucose. Cela est soutenu par des études démontrant que de nombreux mycètes possèdent une flexibilité métabolique pour utiliser divers substrats (Weinhandl et al. 2014).

Le biuret se distingue comme la source d'azote la plus efficace pour *F. exilis*, ce qui est intéressant car le biuret n'est pas communément utilisé comme source d'azote principale par la plupart des microorganismes. Cela pourrait indiquer une adaptation spécifique ou un mécanisme enzymatique efficace pour hydrolyser le biuret et utiliser l'azote libéré. L'urée et l'ammoniac suivent, ce qui montre sa capacité à utiliser diverses sources d'azote pour sa croissance. Bien que moins courante, l'utilisation efficace du biuret est plausible et soutenue par des mécanismes enzymatiques spécifiques (Dube 1971).

Magnaporthiopsis agrostidis

Magnaporthiopsis agrostidis montre une préférence notable pour le turanose, suivi par le propylène glycol, le xylitol, le méthylglucoside, et le mélibiose, comme indiqué par les valeurs d'absorbance. Ces résultats suggèrent une capacité du champignon à utiliser des sucres moins communs ainsi que des polyalcools et des dérivés de glucose pour sa croissance. La préférence pour le turanose, un disaccharide moins fréquent, pourrait indiquer une niche écologique spécifique ou une adaptation à des sources de carbone spécialisées dans son environnement naturel. Le D-glucose, généralement considéré comme une source de carbone primaire pour de nombreux microorganismes, se classe plus bas, ce qui pourrait refléter une spécialisation pour l'exploitation de niches écologiques où les sucres simples sont moins disponibles. Cela est aligné avec des études montrant la flexibilité métabolique des champignons dans l'utilisation de diverses sources de carbone, y compris des polyalcools et des disaccharides moins fréquents (Mende et al. 2017).

En ce qui concerne les sources d'azote, le nitrite (NaNO_2) se classe le plus haut, suivi par l'urée ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) et le nitrate (NaNO_3). Cette tendance indique que cette souche peut utiliser diverses formes inorganiques d'azote. La capacité à utiliser le nitrite efficacement pourrait suggérer une adaptabilité à des environnements où les formes réduites d'azote sont

plus abondantes ou facilement disponibles. Cette observation est bien documentée pour de nombreux champignons (Machado et al. 2018).

Tableau 14: Valeurs d'absorbance de différentes sources de carbone et d'azote pour les souches fongiques sélectionnées

Souche	Type	Substrat	Classement	Absorbance (750 nm)
<i>P. linearis</i>	Carbone	D-Sorbitol	1	1.267
		D-Mannitol	2	1.162
		D-Fructose	3	1.155
		D-Galactose	7	0.997
		D-Glucose	10	0.944
		Maltose	11	0.943
		Maltotriose	12	0.92
		D-Mannose	13	0.832
		D-Xylose	14	0.83
	Azote	Urée (CH ₄ N ₂ O)	8	0.42
		Ammoniaque (NH ₄ OH)	16	0.345
		Nitrite (NaNO ₂)	26	0.268
		Nitrate (NaNO ₃)	34	0.216
		Biuret (C ₂ H ₅ N ₃ O ₂)	48	0.139
		Contrôle négatif	83	0.078
<i>G. rubrum</i>	Carbone	D-Fructose	1	0.905
		Maltotriose	3	0.828
		D-Mannitol	4	0.775
		Maltose	5	0.773
		Méthyl-β-glucoside	6	0.752
		D-tréhalose	9	0.724
		Glycérol	10	0.701
		D-Glucose	11	0.66
	Azote	Nitrite (NaNO ₂)	10	0.604
		Urée (CH ₄ N ₂ O)	13	0.569
		Nitrate (NaNO ₃)	14	0.568
		Ammoniaque (NH ₄ OH)	24	0.518
		Biuret (C ₂ H ₅ N ₃ O ₂)	48	0.465
		Contrôle négatif	71	0.223

Souche	Type	Substrat	Classement	Absorbance (750 nm)
<i>F. exilis</i>	Carbone	D-Glucose	1	0.956
		D-Mannose	4	0.657
		Acide formique	5	0.6
		D-Fructose	6	0.583
		Méthty- α -D-galactose	7	0.559
		Tween 40	8	0.544
		Succinate d'oxyde de méthyle	9	0.531
		Lactulose	10	0.512
		D-Cellobiose	11	0.5
	Azote	Biuret (C ₂ H ₅ N ₃ O ₂)	7	0.802
		Urée (CH ₄ N ₂ O)	24	0.664
		Ammoniaque (NH ₄ OH)	28	0.655
		Contrôle négatif	58	0.477
<i>M. agrostidis</i>	Carbone	Turanose	1	0.224
		Propylène glycol	2	0.121
		Xylitol	3	0.118
		Méthylglucoside	4	0.116
		Mélibiose	5	0.092
		β -Cyclodextrine	6	0.07
		L-Sorbose	7	0.067
		D-glucose	11	0.04
	Azote	Nitrite (NaNO ₂)	10	0.604
		Urée (CH ₄ N ₂ O)	13	0.569
		Nitrate (NaNO ₃)	14	0.568
		Ammoniaque (NH ₄ OH)	24	0.518
		Biuret (C ₂ H ₅ N ₃ O ₂)	48	0.465
		Contrôle négatif	71	0.223

Seule *Filospora exilis* montre un gain d'absorbance plus important avec le glucose comme source de carbone. En effet, *Graphium rubrum* montre un résultat supérieur avec le fructose et *Pestalotiopsis linearis* avec les sucres d'alcools. *Magnaporthe oryzae*, malgré une faible croissance, a montré une préférence pour les sources de sucres complexes comme le turanose et également pour le propylène glycol.

Parmi les hypothèses pouvant expliquer l'affinité de *P. linearis*, de *G. rubrum* et, dans une moindre mesure, de *M. oryzae* pour les sucres d'alcools (polyols), il est possible de citer leur utilisation en réponse à des stress environnementaux, notamment les stress osmotiques. Les polyols pourraient également jouer un rôle dans les interactions entre les champignons endophytes ou phytopathogènes avec les végétaux (Williamson et al. 2002).

Pour les sources d'azote préférentielles des microplaques pm3, il est important de mentionner que, pour toutes les souches, les acides aminés ont permis d'obtenir les plus fortes augmentations d'absorbance sur les microplaques. Cependant, comme de nombreux acides aminés sont présents sur les plaques Biolog™ pm3 et que la réponse des champignons est très variable entre les espèces et pour chaque acide aminé, cette donnée n'est pas présentée en détail.

Pour les sources d'azotes simples (tableau 14), l'urée semble convenir pour les quatre espèces, mais ne serait une source préférentielle que pour *P. linearis*. Les souches étudiées pourraient donc produire l'enzyme uréase pour transformer l'urée en ammoniac assimilable. L'utilisation de nitrite comme source d'azote est cependant moins commune puisqu'il est habituellement considéré comme toxique pour les cellules. Cependant, certains microorganismes ont la capacité de le transformer en ammonium par une réaction enzymatique de nitrite réductases.

La concentration des composés azotés utilisés dans les microplaques pm3 est cependant inconnue. Or, cet aspect est susceptible d'influencer grandement les résultats observés.

Halotolérance

Les microplaques pm9 de Biolog™ ont été utilisées pour étudier l'halotolérance des souches en présence de différents électrolytes à diverses concentrations. Certains des électrolytes inclus dans ces microplaques Biolog™ peuvent également agir comme source d'azote et, par conséquent, avoir un effet sur la croissance des souches.

Tableau 15 : Effets des électrolytes sur l'absorbance en fonction des concentrations pour *Filosporella exilis*

Électrolytes (abs.: contrôles glucoses: 0.956±0.134)*	Favorable à neutre**	Neutre à défavorable**	Limite
Chlorure de sodium (NaCl) (Plage de concentration : 1% à 10%)	≤ 1% (abs. :1.334)	2% à 4% (abs. :0.518 à 0.879)	≥ 5% (abs. :-0.59 à 0.304)
Éthylène glycol (C₂H₆O₂) (Plage de concentration : 5% à 20%)	≤ 15% (abs. 1.138 à 1.437)	20% (abs :0.811)	n/a
Sulfate d'ammonium à pH:8 (NH₄)₂SO₄ (Plage de concentration :10 mM à 100 mM)	10 mM à 100 mM (abs :1.221 à 1.298)	n/a	n/a
Nitrate de sodium (NaNO₃) (Plage de concentration : 10 mM à 100 mM)	10 mM à 100 mM (abs.1.216 à 1.298)	n/a	n/a
Lactate de sodium (NaC₃H₅O₃) (Plage de concentration : 1% à 12%)	≤ 1% (abs.1.216 à 1.298)	2% (abs.0.62)	3% à 6% (abs :-0.029 à 0.315)
Urée (CH₄N₂O) (Plage de concentration : 2% à 7%)	n/a	2% (abs.0.51)	3% à 7% (abs.-0.58 à 0.54)
Forminate de sodium (HCOONa) (Plage de concentration : 1% à 6%)	≤ 1% (abs :1.034)	2% à 4% (abs.0.51)	≥ 5% (abs :-0.205 à 0.05)
Phosphate trisodique à pH:7 (Na₃PO₄) (Plage de concentration : 20 mM à 200 nM))	≤ 20 mM (abs :0.951)	50 mM à 100 mM (abs :0.852 à 0.869)	≥ 200 mM (abs.0.195)
Chlorure de potassium (KCl) (Plage de concentration : 3% à 6%)	3% (abs :0.904)	4% à 5% (abs :0.686 à 0.733)	≥ 6% (abs.0.296)
Sulfate de sodium (Na₂SO₄) (Plage de concentration : 2% à 5%)	≤ 4% (abs :1.156 à 1.122)	5% (abs.-0.58 à 0.54)	n/a
Benzoate de sodium pH:5.2 (NaC₆H₅COO) (Plage de concentration : 20 mM à 200 mM)	n/a	n/a	≥ 20 mM (abs :-0.022 à 0.048)
Nitrite de sodium (NaNO₂) (Plage de concentration : 10 mM à 100 mM)	≤ 10 mM (abs : 1.128)	20 mM (abs : 0.366)	≥ 40 mM (abs :0 à 0.013)

*Ces plaques Biolog™ n'incluent pas de contrôles négatifs. Afin de permettre au lecteur de se représenter l'amplitude des deltas d'absorbance présentés, la valeur moyenne des puits avec glucose des plaques PM1, PM2 et les contrôles négatifs des plaques PM3, qui ne contiennent que du glucose, est présentée.

** Les valeurs qualifiées de "favorable à neutre" sont celles ayant obtenu un résultat d'absorbance situé dans le premier quartile. Celles qualifiées de "neutre à défavorable" appartiennent au deuxième quartile, tandis que les troisièmes et quatrièmes quartiles correspondent à la colonne "limite".

Tableau 16 : Effets des électrolytes sur l'absorbance en fonction des concentrations pour *Pestalotiopsis linearis*

Électrolytes (abs. :contrôles glucoses : 1.163±0.1)*	Favorable à neutre**	Neutre à défavorable**	Limite**
Chlorure de sodium (NaCl) (Plage de concentration : 1% à 10%)	≤ 4% (abs. :1.408 à 1.929)	5% à 6.5% (abs : 0.811 à 1.50)	≥ 7% (abs :0.658 à 0.918)
Éthylène glycol (C₂H₆O₂) (Plage de concentration : 5% à 20%)	≤ 20% (abs. :1.817 à 1.926)	n/a	n/a
Sulfate d'ammonium à pH:8 (NH₄)₂SO₄ (Plage de concentration :10 mM à 100 mM)	≤ 100 mM (abs. :1.487 à 1.983)	n/a	n/a
Nitrate de sodium (NaNO₃) (Plage de concentration : 10 mM à 100 mM)	10 mM à 100 mM (abs. :1.872 à 2.01)	n/a	n/a
Lactate de sodium (NaC₃H₅O₃) (Plage de concentration : 1% à 12%)	1% à 5% (abs. :1.64 à 1.89)	n/a	≥ 6% (abs. : -0.075 à 0.23)
Urée (CH₄N₂O) (Plage de concentration : 2% à 7%)	n/a	2% à 3% (abs. :0.583 à 0.666)	≥ 4% (abs. :0.021 à 1.88)
Forminate de sodium (HCOONa) (Plage de concentration : 1% à 6%)	≤ 1% (abs. :1.811)	3% à 6% (abs. :0.671 à 1.096)	n/a
Phosphate trisodique à pH:7 (Na₃PO₄) (Plage de concentration : 20 mM à 200 nM))	20 mM à 50 mM (abs. :1.354 à 1.717)	100 mM à (abs.1.178)	200 mM (abs. :0.228)
Chlorure de potassium (KCl) (Plage de concentration : 3% à 6%)	≤ 6% (abs. :1.755 à 1.987)	n/a	n/a
Sulfate de sodium (Na₂SO₄) (Plage de concentration : 2% à 5%)	2% à 4% (abs. :1.784 à 1.963)	5% (abs.1.211)	n/a
Benzoate de sodium pH:5.2 (NaC₆H₅COO) (Plage de concentration : 20 mM à 200 mM)	n/a	n/a	≥ 20 mM (abs. : -0.032 à -0.01)
Nitrite de sodium (NaNO₂) (Plage de concentration : 10 mM à 100 mM)	n/a	10 mM à 20 mM (abs. :1.02 à 1.186)	≥ 40 mM (abs. : -0.005 à 0)

*Ces plaques Biolog™ n'incluent pas de contrôles négatifs. Afin de permettre au lecteur de se représenter l'amplitude des deltas d'absorbance présentés, la valeur moyenne des puits avec glucose des plaques PM1, PM2 et les contrôles négatifs des plaques PM3, qui ne contiennent que du glucose, est présentée.

** Les valeurs qualifiées de "favorable à neutre" sont celles ayant obtenu un résultat d'absorbance situé dans le premier quartile. Celles qualifiées de "neutre à défavorable" appartiennent au deuxième quartile, tandis que les troisièmes et quatrièmes quartiles correspondent à la colonne "limite".

Tableau 17 : Effets des électrolytes sur l'absorbance en fonction des concentrations pour *Graphium rubrum*

Électrolytes (abs. : contrôles glucoses : 0.666±0.05)*	Favorable à neutre**	Neutre à défavorable**	Limite**
Chlorure de sodium (NaCl) (Plage de concentration : 1% à 10%)	≤ 4% (abs :0.825 à 1.189)	5% à 6.5% (abs :0.356 à 0.641)	≥ 7% (abs :0.356 à 0.641)
Éthylène glycol (C₂H₆O₂) (Plage de concentration : 5% à 20%)	≤ 5% (abs :0.825 à 1.189)	10% à 20% (abs :0.334 à 0.758)	n/a
Sulfate d'ammonium à pH:8 (NH₄)₂SO₄ (Plage de concentration :10 mM à 100 mM)	10 mM à 100 mM (abs :1.032 à 1.27)	n/a	n/a
Nitrate de sodium (NaNO₃) (Plage de concentration : 10 mM à 100 mM)	10 mM (abs :0.822)	20 mM à 100 mM (abs :0.628 à 0.784)	n/a
Lactate de sodium (NaC₃H₅O₃) (Plage de concentration : 1% à 12%)	1% à 3% (abs :0.905 à 1.433)	4% à 7% (abs :0.202 à 0.633)	≥ 8% (abs :0.019 à 0.176)
Urée (CH₄N₂O) (Plage de concentration : 2% à 7%)	n/a	2% à 5% (abs :0.194 à 0.427)	≥ 6% (abs :0.001 à 0.002)
Forminate de sodium (HCOONa) (Plage de concentration : 1% à 6%)	1% à 2% (abs :0.881 à 1.263)	3% à 6% (abs :0.247 à 0.686)	n/a
Phosphate trisodique à pH:7 (Na₃PO₄) (Plage de concentration : 20 mM à 200 nM))	20 mM à 200 mM (abs :0.865 à 1.109)	n/a	n/a
Chlorure de potassium (KCl) (Plage de concentration : 3% à 6%)	3% à 4% (abs :1.052 à 0.848)	5% à 6% (abs :0.392 à 0.778)	n/a
Sulfate de sodium (Na₂SO₄) (Plage de concentration : 2% à 5%)	2% à 5% (abs :1.131 à 1.199)	n/a	n/a
Benzoate de sodium pH:5.2 (NaC₆H₅COO) (Plage de concentration : 20 mM à 200 mM)	n/a	n/a	≥ 20 mM (abs :-0.012 à 0.009)
Nitrite de sodium (NaNO₂) (Plage de concentration : 10 mM à 100 mM)	n/a	10 mM à 20 mM (abs :0.408 à 0.574)	≥ 40 mM (abs :0 à 0.168)

*Ces plaques Biolog™ n'incluent pas de contrôles négatifs. Afin de permettre au lecteur de se représenter l'amplitude des deltas d'absorbance présentés, la valeur moyenne des puits avec glucose des plaques PM1, PM2 et les contrôles négatifs des plaques PM3, qui ne contiennent que du glucose, est présentée.

** Les valeurs qualifiées de "favorable à neutre" sont celles ayant obtenu un résultat d'absorbance situé dans le premier quartile. Celles qualifiées de "neutre à défavorable" appartiennent au deuxième quartile, tandis que les troisièmes et quatrièmes quartiles correspondent à la colonne "limite".

Pour *Magnaporthe oryzae*, la croissance apparente, mesurée par le gain d'absorbance à 750 nm, s'est avérée faible dans la plupart des milieux. Cependant, les puits contenant de l'éthylène glycol à 5 %, du phosphate de sodium à un pH de 7 à une concentration de 20 mM, et en présence de nitrate de sodium à des concentrations de 10 mM à 80 mM avec un optimum à 40 mM ont montré de meilleures performances.

Pour les quatre espèces, la tolérance au NaCl et aux autres électrolytes démontre une résistance au stress osmotique plus importante que prévu. Bien qu'il s'agisse d'une souche associée aux milieux aquatiques d'eau douce ou saumâtre, *F. exilis* a présenté la plus faible tolérance aux concentrations élevées de NaCl. Un effet défavorable a été observé à partir d'une concentration de 1 % de NaCl, alors que pour les trois autres espèces, l'impact sur le gain en absorbance n'a été observé qu'à partir de 4 %. Ces niveaux de salinité étant plus de 10 fois supérieurs aux eaux de l'estuaire ou du golfe Saint-Laurent, cet aspect ne serait donc pas limitant pour la croissance de ces espèces en présence de sources de sucres simples (comme le glucose ajouté aux plaques Biolog™ PM3, PM9 et PM10). Cependant, ces niveaux de salinité pourraient nuire au fonctionnement d'autres métabolites, comme des exo-enzymes nécessaires à l'assimilation de sources de carbone plus complexes, dont les activités peuvent être fortement influencées par le niveau de salinité (Hölker et al. 2004).

Plage de pH tolérable

Le pH constitue également un élément crucial à considérer pour la croissance fongique. Il affecte directement la conformation et la stabilité des exo-enzymes fongiques nécessaires à la dégradation des matières organiques, influençant ainsi la nutrition des champignons (Griffin 1996). L'effet du pH sur le développement en biomasse des espèces a été mesuré indirectement par la différence d'absorbance à 750 nm.

Tableau 18 : Effet du pH sur le développement des souches fongiques

Espèce	pH 3.5	pH 4	pH 4.5	pH 5	pH 5.5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 8.5	pH 9	pH 9.5
<i>F.exilis</i>					+	+	+	++	++	+	+
<i>P.linearis</i>	++	++	++	+	+	+	+	+			
<i>M.agrostidis</i>				+	++	++	++				
<i>G.rubrum</i>	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	

*La cases ++ correspond aux valeurs d'absorbance des puits du premier quartile et les +, aux deuxièmes quartiles.

Les champignons de pourriture blanche, principaux responsables de la dégradation des matières ligneuses en milieux terrestres grâce, entre autres, aux enzymes de modification des lignines, sont souvent associés à des pH acides. Or, selon les résultats obtenus, seules *P. linearis* et *G. rubrum* ont démontré un gain de biomasse plus important à des pH inférieurs à 5.

Il est intéressant de constater que *F. exilis* semble mieux adapté aux pH alcalins. Cet aspect, ainsi qu'une résistance aux pressions osmotiques, en fait une espèce potentiellement bien adaptée aux conditions de l'estuaire. Bien que cela ne soit pas optimal pour toutes les espèces, un pH situé entre 5,5 et 7 permettrait le développement des espèces étudiées en présence de sucres simples. Cependant, il est probable que pour l'attaque de sources de carbone plus complexes ou diversifiées, des plages de pH différentes pourraient être observées en fonction des pH optimaux des différentes enzymes impliquées.

Dans l'ensemble, bien qu'elles ne soient pas initialement destinées à cette utilisation, les microplaques de phénotypage Biolog™ ont permis de dégager des tendances utiles sur les conditions de croissance des souches fongiques. Elles ont notamment permis de faire des observations qui divergent de ce qui était attendu, notamment pour les sources de carbone où le propylène glycol, des sucres complexes ou des sucres d'alcool ont fourni des résultats supérieurs au glucose pour certaines souches.

Les résultats concernant les sources d'azote, en plus d'exposer les sources d'azote inorganiques utilisables selon les souches, ont montré l'intérêt d'inclure des sources d'acides aminés aux substrats de culture. La résistance aux stress osmotiques a également été mise en évidence, avec des souches manifestant une capacité surprenante à prospérer en présence de concentrations d'électrolytes dépassant les seuils présumés. Les concentrations des sources d'azote de la microplaque PM3 n'étant pas connues, les données de la microplaque PM9 peuvent permettre d'améliorer l'interprétation des données. Par exemple, l'urée, qui était adéquate comme source d'azote avec les microplaques PM3, a produit l'effet inverse sur les microplaques de stress osmotique PM9, ce qui permet de formuler l'hypothèse selon laquelle la concentration idéale de cette source d'azote doit être inférieure à 2 %.

Les données de pH des microplaques PM10 ont dévoilé des différences entre les espèces pour les plages de pH préférentielles en présence de glucose comme source de carbone. La compréhension de ces préférences de pH peut influencer le design des procédés biotechnologiques, permettant la maximisation de la croissance et de la production de métabolites. Les plages de pH optimales doivent cependant être réévaluées en fonction de la nature du substrat de culture puisque les enzymes impliquées dans l'attaque de celui-ci peuvent avoir un optimum d'activité différent de celui observé avec le glucose.

L'utilisation des microplaques de phénotypage n'est cependant pas parfaite pour la caractérisation de souches dans le cadre d'une campagne de bioprospection, puisque le coût élevé des microplaques Biolog™ limite le nombre de répétitions réalisables. De plus, les concentrations des composés utilisés dans les puits des microplaques carbone et azote ne sont pas connues, ce qui limite l'interprétation des résultats.

Bien que le nombre de sources de carbone et d'azote inclus dans les microplaques Biolog™ soit élevé, elles ne fournissent pas de renseignements sur les conditions d'assimilation des nutriments favorables, comme le pH, par exemple. Une solution intéressante serait, après l'observation des plaques de phénotypage, de réaliser nos propres microplaques en sélectionnant parmi les sources de carbone et d'azote favorables celles propices à la confection de milieux de culture, mais pour différents pH. Un tel dispositif en microplaques 96 puits permettrait de réaliser à faibles coûts plusieurs répétitions et donc de fournir des données statistiquement plus solides.

De plus, l'ajout d'un réactif colorimétrique réagissant avec l'ATP permettrait d'obtenir des résultats plus précis. En effet, même si la lecture de l'absorbance à 750 nm est moins sensible aux variations de coloration des souches ou à une éventuelle production de pigments qu'une lecture à une longueur d'onde inférieure à 690 nm, elle n'est pas parfaite. La croissance n'étant pas nécessairement homogène dans les puits, sans utilisation de réactifs colorimétriques solubles, il est possible que la lecture de l'absorbance soit sur ou sous-évaluée en fonction de la distribution du mycélium dans les puits.

2.3 CONCLUSION

La bioprospection de souches fongiques dans l'estuaire du fleuve Saint-Laurent a permis d'isoler plusieurs souches d'intérêt et d'en présélectionner quatre présentant un potentiel pour la production d'enzymes ligninolytiques dans des conditions de température, de salinité et d'alcalinité proches de celles de l'estuaire. Ces souches ont été identifiées et caractérisées pour déterminer leurs températures de croissance optimales. Les sources de carbone et d'azote pertinentes pour la préparation de milieux de culture adaptés, ainsi que les conditions de salinité et de pH limites pour leur culture, ont également été documentées.

Ces opérations ont permis de développer ou de mettre en pratique des méthodes d'échantillonnage et d'isolement adaptées aux milieux estuariens. La méthode de criblage, bien qu'orientée ici vers la sélection de souches produisant des laccases ou des peroxydases, peut facilement être adaptée à d'autres métabolites en variant les milieux et les réactifs colorimétriques. De plus, les microplaques de phénotypage Biolog™ et les essais de croissance se sont avérés être des outils utiles pour aider à l'élaboration de milieux et de conditions de culture adaptées aux souches sélectionnées.

Cependant, plusieurs pistes d'amélioration des méthodes de bioprospection utilisées peuvent être proposées. Par exemple, la réduction du nombre de milieux de culture lors de l'isolement et des essais de croissance, ainsi que la réalisation de microplaques "maison" pour observer l'influence du pH ou d'autres paramètres sur l'assimilation des sources de carbone et d'azote. Cela permettrait également d'augmenter, à peu de frais, le nombre de répliquas par traitement. L'utilisation de réactifs colorimétriques pour l'ATP permettrait d'augmenter la fiabilité et la précision des résultats obtenus avec les microplaques.

Ces améliorations permettraient de rendre les méthodes de bioprospection plus rapides, robustes et adaptées à l'exploration de la diversité fonctionnelle des souches fongiques dans divers environnements.

CHAPITRE 3

CARACTERISATION D'ENZYMES DE MODIFICATION DES LIGNINES PRODUITES PAR DES MYCETES FILAMENTEUX ISOLEES DANS L'ESTUAIRE OU LES BERGES DU FLEUVE SAINT-LAURENT

3.1 INTRODUCTION

À la suite des étapes de bioprospection et de criblage, quatre souches de mycètes filamenteux associés à l'estuaire du Fleuve Saint-Laurent ont été sélectionnées (voir chapitre 2). Ce troisième chapitre vise à caractériser les cinétiques de croissance, la production protéique, les enzymes lignocellulosiques, ainsi que les enzymes de modification des lignines (EML) produites par ces souches. Ces enzymes pourraient présenter des valeurs cardinales différentes de celles des enzymes issues de champignons de pourriture blanche plus couramment disponibles sur le marché, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour des applications dans divers secteurs industriels ainsi que pour des applications de bioremédiation.

Ce chapitre est structuré comme suit : la première étape fut d'abord de réaliser un portrait général des cinétiques à l'aide d'un dispositif en culture liquide sur une période de 18 jours avec des prises de données toutes les 48 heures. Pendant cette période, les masses fongiques sèches, la concentration générale de protéines en solution ainsi que la production de certaines enzymes associées à l'attaque de matières lignocellulosiques telles que les endo-cellulases, xylanases, peroxydases et laccases ont été observées.

Les endo-cellulases jouent un rôle crucial dans la fragmentation de la cellulose en segments plus petits, qui peuvent ensuite être décomposés par d'autres enzymes. Les xylanases attaquent principalement le xylane, un composant majeur de l'hémicellulose. À la différence des enzymes précédemment mentionnées, qui facilitent directement la production de sources de carbone assimilables, les ligninases, telles que les peroxydases et les laccases,

catalysent la rupture des liaisons chimiques dans la lignine, permettant ainsi la dégradation de ce composé robuste et l'accès à des sources de carbones.

Suite à ce dispositif, les cocktails enzymatiques bruts ont été soumis à une première étape de purification par précipitation au sulfate d'ammonium. Les enzymes EML ont ensuite été comparées à une enzyme commerciale de référence (*Trametes versicolor*), et les conditions optimales d'activité enzymatique en termes de pH et de température ont été déterminées.

La souche *Magnaportheiopsis agrostidis*, sélectionnée durant la bioprospection décrite dans le chapitre précédent, a été retirée du dispositif en raison de son risque phytosanitaire pour les graminées. Cette souche a été remplacée par *Pleurotus ostreatus* (Biop-F007), un champignon de pourriture blanche bien connu en raison, entre autres, de sa culture à grande échelle pour l'alimentation humaine.

3.2 MATERIEL ET METHODE

3.2.1 Cinétique de production sur 18 jours de quatre enzymes associées à l'attaque de matières lignocellulosiques

La cinétique de production a été réalisée en triplicats, dans des tubes Falcon™ de 50 mL contenant 10 mL de la solution de culture décrite ci-dessous au point 3.2.1.1. Ces tubes ont été incubés à une température régulée de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, avec une agitation constante de 160 rotations par minute (rpm). Cette configuration a été maintenue pendant 18 jours. Pour chaque souche étudiée, un jeu de trois tubes (un triplicat) a été prélevé tous les deux jours et immédiatement stocké au congélateur (-80°C) pour les analyses subséquentes.

3.2.1.1 Composition de la solution de culture

La solution de culture était composée de 1 L d'eau de mer naturelle ajustée à une salinité de 15 ‰ avec de l'eau distillée. À cette solution ont été ajoutés 3,4 g de nitrate de sodium (NaNO_3) comme source d'azote inorganique, 9,88 g de carboxyméthylcellulose de sodium (Sigma) et 1,0 g d'azo-cellulose (Megazyme®) comme source de carbone structurée pour encourager l'activité cellulase, et 1,0 g d'azo-xylan de bouleau (Megazyme®) pour stimuler et observer l'activité des enzymes de dégradation du xylane, un des composants majeurs de l'hémicellulose. Des sucres simples tels que 17,5 g de saccharose, 17,5 g de xylose et 5 g de mannitol ont été inclus pour fournir des sources de carbone facilement assimilables. Le mannitol est également susceptible d'agir comme agent osmoprotecteur pour aider les champignons à gérer le stress osmotique. De plus, 150 μL de gaïacol ont été ajoutés pour le suivi visuel de l'activité enzymatique associée à l'attaque des lignines. La solution a également été supplémentée avec 50 mg de sulfate de manganèse (MnSO_4) comme cofacteur enzymatique pour les manganèses peroxydases et 0,1 mg de sulfate de cuivre (CuSO_4) pour encourager l'activité des laccases (Vrsanska et al. 2016).

3.2.1.2 Préparation des inocula et inoculation

Suite à une stérilisation à l'autoclave d'une durée de 20 minutes à 121°C, les unités expérimentales décrites au point 3.2.1 ont été inoculées. Pour préparer les inocula, des fragments de mycélium et des conidies ont été prélevés en brossant délicatement la surface de cultures fongiques sur milieu solide à l'aide de cotons-tiges stériles, avant d'immerger ces derniers dans 10 mL de solution saline de NaCl stérile à 0,9 %. Cette opération a été répétée jusqu'à atteindre une transmittance située entre 50 % et 70 % à une longueur d'onde de 750 nm. Ces mesures ont été réalisées avec un spectromètre équipé d'une cuvette à chemin optique de 1 cm.

Les suspensions ont été homogénéisées au vortex à haute intensité pendant 30 secondes, et la concentration des inocula a été estimée en réalisant six mesures de transmittance, chacune à des intervalles de 10 secondes. Par la suite, une corrélation entre le pourcentage de transmittance et le poids de matière sèche a été établie en lyophilisant cinq aliquotes de 1 mL de chaque souche.

3.2.1.3 Préparation des cocktails enzymatiques bruts

Les cultures liquides ont été d'abord filtrées sous vide en utilisant des filtres en viscose Whatman™ (#10340810). Après filtration, les filtres ont été rincés avec 10 mL d'eau distillée. Les filtrats recueillis ont ensuite été centrifugés à 1790 g à une température de 4 °C pendant 40 minutes. Par la suite, les filtres contenant le mycélium ont été abondamment rincés avec de l'éthanol à 95% pour dissoudre les pigments azo et éliminer les fibres de carboxyméthylcellulose restantes. Après ce traitement, les filtres et le mycélium ont été replacés dans leurs tubes d'origine, puis lyophilisés et pesés pour déterminer la masse sèche. Enfin, les surnageants de chaque réplicat ont été collectés et répartis en aliquotes de 1,5 mL dans cinq tubes Eppendorf™ de 2 mL chacun.

3.2.1.4 Évaluation des cinétiques de production et activité enzymatiques

Pour déterminer l'activité enzymatique des endo-cellulases (endo-1,4- β -D-glucanase), des hémicellulases (endo-1,4- β -xylanase) et des ligninases, des substrats spécifiques colorimétriques ont été utilisés. Des analyses fluorométriques ont également été effectuées pour plus de précision et pour pallier l'éventualité où il serait difficile de dissocier les résultats des substrats azo de ceux du guaiacol en raison de la proximité des longueurs d'onde de lecture. Tous ces tests ont été réalisés en microplaques de 96 puits.

Les substrats colorimétriques utilisés étaient inclus dans le milieu de culture : pour les endo-cellulases et hémicellulases, l'azo-CM-cellulase (Megazyme™) et l'azo-xylan de bouleau (Megazyme™), et pour les ligninases, le guaiacol. Les lectures ont été effectuées avec un spectrophotomètre BioTek Cytation 5 de Agilent®. La détection des hydrolases (cellulases et xylanases) a été réalisée à 590 nm et pour les ligninases à 490 nm.

Pour l'analyse des activités enzymatiques par fluorescence, les substrats EnzChek® ont été utilisés selon les instructions du fabricant pour la quantification des cellulases (EC 3.2.1.4) et des xylanases (EC 3.2.1.8). Pour l'analyse des peroxydases, un kit d'analyses d'Invitrogen™ (#A22188) qui utilise aussi l'AmplexRed™ mais avec du H₂O₂ en excès a été utilisé. Enfin, la quantification des laccases a été réalisée en utilisant AmplexRed™ d'Invitrogen™ comme substrat, tel que décrit par Wang et al., 2017. Les méthodes de fluorimétrie ont été privilégiées pour leur capacité à détecter de plus faibles concentrations comparativement aux tests colorimétriques et pour leur moindre sensibilité à la présence de coloration dans les solutions analysées.

Il est à noter que le même lot de standard a été utilisé pour toutes les expériences présentées dans ce chapitre, soit la laccase (EC 1.10.3.2) de *Trametes versicolor* de Sigma-Aldrich® à 0,84 U/mg.

3.2.1.5 Quantification des protéines en solution

La méthode de Bradford (Bradford 1976) a été utilisée pour doser la concentration en protéines des cocktails enzymatiques bruts. Cette méthode colorimétrique est basée sur la liaison du colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 aux protéines. Le standard d'albumine sérique bovine (BSA) a été employé car il est très couramment utilisé pour ce type de dosage en raison de sa stabilité, de sa disponibilité et de son comportement bien caractérisé dans le test de Bradford. La courbe d'étalonnage a été réalisée avec huit concentrations et un $n = 4$ ($r^2=0,9853$). Les essais ont été réalisés en microplaques de 96 puits.

3.2.2 Production et purification des cocktails enzymatiques pour la caractérisation des enzymes de modification des lignines

3.2.2.1 Production des cultures enzymatiques

Pour ce dispositif, des cultures en triplicats ont été établies dans des flacons Erlenmeyer de 500 mL et inoculées avec 5 mL des solutions d'inocula décrites précédemment. Chaque flacon, muni d'un bouchon de mousse perméable à l'air (Thomas Scientific®), contenait 300 mL de solution nutritive. L'incubation s'est déroulée durant 21 jours à une température constante de 21°C, avec une agitation mécanique circulaire réglée à 160 tours par minute.

Pour ces dispositifs, les réactifs azo-cellulase et azo-xylan n'ont pas été utilisés. Par conséquent, les masses de carboxyméthylcellulose de sodium (Sigma-Aldrich) et de xylan de bouleau (Megazyme™) ont été ajustées pour s'adapter à cette modification du protocole.

3.2.2.2 Purification partielle des cocktails enzymatiques

Après avoir été filtrés, tel que décrit dans la section précédente pour le dispositif cinétique (voir section 3.1.1.1), une étape de précipitation au sulfate d'ammonium a été

appliquée pour obtenir des cocktails enzymatiques plus purs et concentrés pour la caractérisation des EML. Cette opération a été réalisée sur glace pour maintenir l'intégrité des enzymes. Pour chacune des souches, les triplicats ont été combinés, et les volumes en surplus ont été conservés à -80°C.

Ensuite, 29,5 g de sulfate d'ammonium ont été ajoutés à chacun des échantillons d'un volume de 100 mL afin d'atteindre une saturation de 50 %. Les solutions ont été conservées à une température de 4°C pendant 24 heures, avec des agitations toutes les 6 heures, permettant la formation de précipités. Après cette période, une centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes à 4°C a été effectuée, puis les surnageants ont été récupérés en évitant les précipités à exclure.

Par la suite, 27,2 g de sulfate d'ammonium ont été ajoutés aux surnageants pour atteindre une saturation de 90 %. Ces solutions ont été agitées occasionnellement et conservées à 4°C pendant 48 heures. Une seconde centrifugation a été réalisée sous les mêmes conditions pour récupérer cette fois les précipités, qui ont ensuite été dissous dans 5 mL de tampon d'acétate de sodium à pH 4,5.

Ces échantillons ont été transférés dans des membranes de dialyse Spectra/Por® d'une porosité de 6 à 8 kD, puis déposés, avec une légère agitation, dans 500 mL d'eau distillée à 4°C, avec un changement d'eau toutes les 12 heures. Le moment du retrait a été déterminé lorsque la conductivité de l'eau de trempage a cessé d'augmenter entre les changements. Cette opération a duré 96 heures.

3.2.2.3 Dosage des protéines des solution d'enzymes concentrées

La méthode de Bradford a été utilisée pour doser les protéines dans les solutions concentrées, incluant indirectement les laccases ainsi que d'autres protéines précipitant dans la même plage de pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium. Le standard d'albumine sérique bovine (BSA) a aussi été employé. Cependant, pour tenir compte des spécificités des

laccases fongiques, le standard de laccase de *Trametes versicolor* a été inclus dans les essais. Ces mesures ont été réalisées en microplaque de 96 puits. La courbe d'étalonnage de la BSA a été réalisée suivant le même protocole que les essais cinétiques. Pour le standard de laccase de *Trametes versicolor*, quatre concentrations (0,5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL, 10mg/mL) ont été utilisées en triplicats pour l'étalonnage.

3.2.2.4 Détermination des valeurs de températures et pH cardinales

Pour déterminer les valeurs cardinales de température pour les laccases des souches, la méthode fluorométrique utilisant l'AmplexRed™ et la réaction avec la resorufine (Wang et al. 2017) a été utilisée. Conformément à cette méthode, les tests ont été effectués dans un tampon phosphate à un pH de 6,4, soit le pH auquel les laccases réagissent le plus avec la resorufine. À des fins de comparaison, le standard de laccase de *Trametes versicolor* a également été inclus dans ces essais. En plus du tampon à pH 6,4, des tampons citrate-phosphate de pH 3, 4, 5, 6, 7 et 8 ont été utilisés. Ce dispositif a été réalisé en microplaque de 96 puits avec deux réplicats par souche et pH à une température de 25°C.

Les essais pour déterminer les températures optimales pour l'activité laccase ont été réalisés avec la méthode en microplaque et le tampon phosphate pH 6,4. Pour chacune des températures suivantes : 15°C, 25°C, 35°C, 45°C et 55°C, cinq réplicats par souche ont été utilisés. Une courbe d'étalonnage, avec le standard de laccase de *Trametes versicolor*, pour chaque température a également été réalisée. Pour s'assurer d'atteindre la température cible, les microplaques ont été placées pendant 20 minutes à la température désirée avant d'introduire le substrat réactionnel et effectuer la lecture.

3.3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.3.1 Masse inoculum

Les aliquotes prélevés et lyophilisés lors de la préparation des inoculums liquides ont permis d'établir une équivalence entre les données de transmittance et les masses fongiques sèches (tableau 19). Dans le cas de *Filosporella exilis*, la cible de transmittance de 50 % à 75 % n'a pas pu être atteinte en raison de la faible épaisseur du mycélium de la souche sur la gélose. Pour la *Graphium rubrum*, la cible a été légèrement dépassée en raison de la présence de spores fortement mélanisées. Cela suggère que les cibles de transmittance pour la préparation d'inoculums devraient plutôt être établies par espèce, en fonction de la masse sèche désirée, plutôt que d'être uniformisées pour l'ensemble des espèces d'un dispositif.

Tableau 19 : Masse d'inoculum par millilitre (mL) de solution d'inoculation

Souche	Transmittance moyenne (%) à 750 nm	Absorbance (Abs=2-log ₁₀ %T)	Masse sèche moyenne (mg)
<i>P.ostreatus</i> (Biop-007)	65.17 ±2.24	0.186 ±0.038	0.36 ±0.17
<i>Graphium rubrum</i>	44.50 ±0.22	0.352 ±0.004	0.08 ±0.03
<i>Filosporella exilis</i>	80.50 ±3.09	0.094 ±0.033	0.46 ±0.12
<i>Pestalotiopsis linearis</i>	57.17 ±2.59	0.243 ±0.039	0.80 ±0.29

Ces données ont notamment permis d'estimer la biomasse présente dans les montages au temps zéro en fonction du volume d'inoculation. Ces prises de données ont également révélé que cette méthode de préparation des inoculums, qui permet l'inoculation de petits volumes et qui est plus précise, comporte également certaines difficultés comparativement à la méthode plus courante qui consiste à inoculer à partir d'un disque sur gélose sans égard à

l'épaisseur de celui-ci. En effet, dans le cas des ascomycètes, l'homogénéisation des solutions est habituellement relativement facile en raison des spores présentes en culture in vitro ainsi que du mycélium qui se fragmente facilement. Cependant, avec les basidiomycètes, il est souvent plus difficile d'obtenir des solutions homogènes puisque la plupart des espèces ne sporulent pas sans sporophores et leur mycélium, plus résistant, est plus difficile à fragmenter.

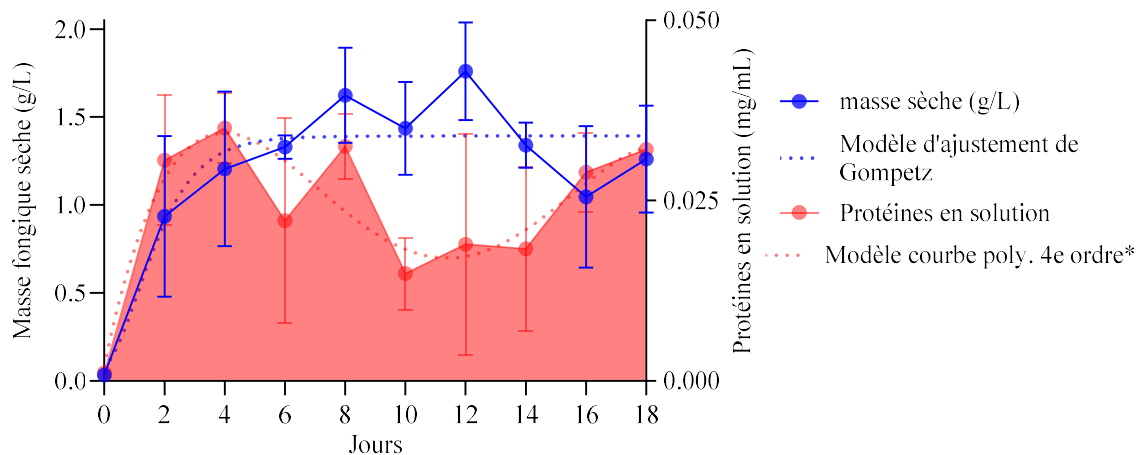
3.3.2 Cinétique de croissance et de la production de protéines en 18 jours

L'observation de la relation entre la croissance microbienne et la production de protéines extracellulaires permet d'identifier les phases de croissance où la production de métabolites secondaires est maximale. Différentes souches de microorganismes présentent des profils variés en termes de croissance et de production de protéines. La comparaison de ces courbes cinétiques est donc essentielle pour sélectionner les souches les plus efficaces pour la production d'enzymes. Les figures 34 à 37 illustrent les courbes cinétiques de la concentration en protéines et de la biomasse sèche pour les trois souches isolées ainsi que pour *Pleurotus ostreatus*.

Pour déterminer les modèles de croissance, il est crucial de noter que les bouillons nutritifs utilisés pour la culture sont complexes, composés de diverses sources de sucres simples et complexes. Cette complexité rend difficile l'évaluation précise de la concentration de nutriments disponibles et assimilables pour chaque espèce. Étant donné que le modèle de croissance de Monod repose sur la concentration de substrat disponible, il a été jugé plus pertinent de comparer les modèles logistiques et de Gompertz, qui expriment la croissance en fonction du temps, pour représenter les dynamiques observées.

Afin de déterminer le modèle de croissance le plus approprié pour chaque espèce, la différence d'AICc (Akaike Information Criterion corrigé) a été utilisée, en comparant le modèle logistique comme référence au modèle alternatif de Gompertz. Les résultats montrent

que la croissance de trois des quatre espèces est mieux représentée par le modèle logistique, tandis que *Pleurotus ostreatus* correspond davantage au modèle de Gompertz.



*Équation : $Y=0,002083+0,01969X-0,003869X^2+0,0002647X^3-5,851\times10^{-6} X^4$

Figure 34 : Cinétique de la masse fongique sèche et protéines en solution pour *Pleurotus ostreatus*

La croissance de la masse fongique sèche de *Pleurotus ostreatus* suit un schéma classique, caractérisé par une phase exponentielle rapide suivie d'un plateau. Ce plateau, atteint entre le huitième et le douzième jour, marque le début de la phase stationnaire, où la croissance de la biomasse se stabilise. Ce comportement est typique des cultures fongiques, où une fois les ressources limitées, la croissance ralentit jusqu'à se stabiliser complètement.

Parallèlement, la production de protéines en solution augmente rapidement au cours des premiers jours, culminant autour de 0,04 mg/mL vers le huitième jour. Cette augmentation rapide peut être attribuée à une intensification de la sécrétion d'enzymes et d'autres protéines par le mycélium en réponse aux conditions favorables de croissance. Cependant, après ce pic, la concentration de protéines en solution plafonne et fluctue de manière significative. Ces fluctuations pourraient être le reflet de variations dans l'activité

métabolique ou dans la sécrétion enzymatique. Toutefois, les écarts-types larges observés dans les données indiquent une forte variabilité entre les échantillons, rendant difficile une interprétation précise des tendances. Cette variabilité suggère que les variations réelles de concentration en protéines pourraient être moins marquées que ce que les données brutes semblent indiquer. Pour réduire cette incertitude et confirmer les observations, il serait pertinent de réaliser des réplicats supplémentaires.

L'ajustement des données de croissance de la biomasse à l'aide d'un modèle logistique a donné un coefficient de détermination (R^2) de 0,83, indiquant que ce modèle représente assez bien la croissance observée. Cela signifie que le modèle logistique est approprié pour décrire la dynamique de croissance de la biomasse dans les conditions expérimentales étudiées. En revanche, le coefficient de corrélation entre la masse sèche et la concentration de protéines est faible ($r=0,25$), suggérant que la production de protéines est peu liée à l'accumulation de biomasse pour cette espèce. Cette faible corrélation pourrait être due à des facteurs indépendants de la croissance de la biomasse qui influencent la production de protéines.

Pour modéliser les données de production de protéines, un modèle polynomial de 4e ordre a été utilisé, car aucun autre modèle ne s'est révélé adéquat. Cette difficulté d'ajustement est probablement liée aux fortes variations des données, qui sont associées à un intervalle de confiance large. Le coefficient R^2 obtenu avec ce modèle polynomial pour la production de protéines est relativement élevé (0,96), indiquant un bon ajustement malgré les fluctuations importantes observées.

En outre, des droites linéaires passant par l'origine ont également été testées pour modéliser ces données. Cependant, ces ajustements se sont révélés moins performants que le modèle polynomial. Pour la masse sèche, l'ajustement linéaire a donné un R^2 de 0,79, tandis que pour les protéines en solution, le R^2 était encore plus faible (0,41). Ces résultats montrent que bien que les droites linéaires puissent modéliser grossièrement certaines tendances générales (comme illustré dans l'image ci-dessous), elles ne capturent pas efficacement les variations complexes observées dans les données expérimentales. Des droite constantes

horizontales étaient également à exclure puisque cela reviendrait à supposer que la masse fongique ou la concentration en protéines ne change pas au fil du temps, ce qui serait incorrect dans ce contexte, car ces variables évoluent avec le temps.

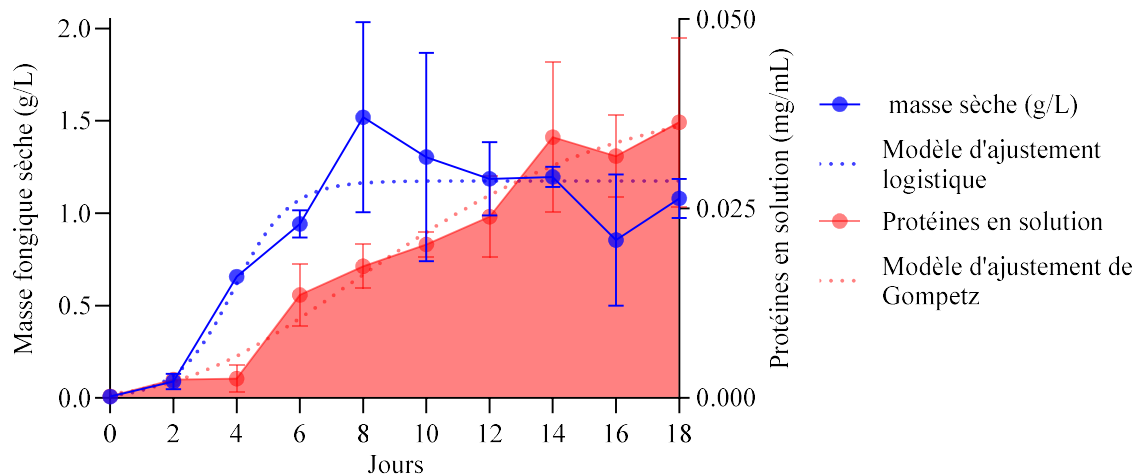


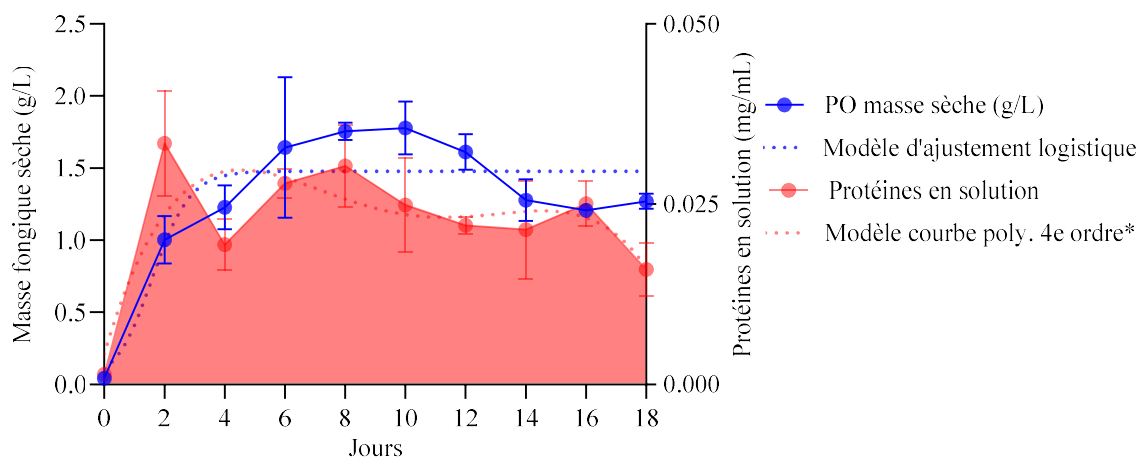
Figure 35 : Cinétique de la masse fongique sèche et protéines en solution pour *Graphium rubrum*

La masse fongique sèche de *Graphium rubrum* suit une courbe de croissance caractérisée par une phase initiale relativement lente, suivie d'une croissance exponentielle rapide qui atteint un plateau entre le huitième et le dixième jour. Ce plateau marque l'entrée dans une phase stationnaire, où la croissance en biomasse se stabilise. La production de protéines en solution progresse en parallèle à la croissance du mycélium, bien que de manière plus graduelle. Les concentrations de protéines continuent d'augmenter jusqu'au quatorzième jour, atteignant un plateau ou poursuivant une croissance à un rythme plus lent.

Vers la fin de la période d'observation, la concentration de protéines en solution atteint environ 0,04 mg/mL, tandis que la masse sèche du mycélium fluctue après avoir atteint son maximum. Ces observations suggèrent que, bien que *Graphium rubrum* atteigne rapidement

une masse maximale, la production de protéines se poursuit et se développe plus tardivement dans la période de culture.

L'ajustement des données de croissance de la biomasse avec un modèle logistique a donné un coefficient de détermination (R^2) de 0,88, ce qui montre un ajustement solide du modèle à la croissance observée. Cela indique que le modèle logistique est bien adapté pour représenter la dynamique de croissance en biomasse de cette espèce. Cependant, le coefficient de corrélation entre la biomasse et la production de protéines est modéré ($r=0,47$), ce qui suggère que la relation entre la croissance de la biomasse et la production de protéines n'est pas fortement linéaire. Le modèle de Gompertz, utilisé pour ajuster les données de production de protéines, a donné un R^2 très élevé de 0,97, ce qui suggère que ce modèle capture très bien la dynamique de production de protéines pour *Graphium rubrum*.



$$*Y=0,004161+0,01436X-0,002707X^2+0,0001943X^3-4,790\times 10^{-6} X^4$$

Figure 36 : Cinétique de la masse fongique sèche et protéines en solution pour *Filosporella exilis*

La croissance et la production de protéines de *Filospora exilis* se caractérisent par une phase initiale rapide, suivie de fluctuations et d'un plateau. La masse fongique sèche montre une augmentation rapide au début, atteignant un plateau autour du huitième jour. Cette phase de croissance rapide est suivie d'une phase stationnaire où la masse fongique reste relativement stable.

Parallèlement, la concentration de protéines en solution atteint un pic précoce dès le deuxième jour, indiquant une sécrétion initiale intense de protéines par le mycélium. Après ce pic initial, la concentration de protéines en solution diminue avant de suivre l'évolution de la croissance fongique, atteignant un plateau qui correspond à la phase stationnaire de la croissance du mycélium. Cette tendance suggère que la production de protéines chez *Filospora exilis* est étroitement liée à la phase de croissance exponentielle, avec une sécrétion intense de protéines en début de culture suivie d'une stabilisation en phase stationnaire, atteignant environ 0,03 mg/mL vers la fin de la période d'observation.

L'ajustement des données de masse sèche avec un modèle logistique a donné un coefficient de détermination (R^2) de 0,82, indiquant un ajustement raisonnable du modèle à la croissance observée. Le coefficient de corrélation entre la masse sèche et les protéines est de $r=0,53$, suggérant une relation modérée entre ces deux variables.

Pour modéliser les données de production de protéines, un modèle polynomial de 4^e ordre a été utilisé, car aucun autre modèle ne s'est révélé adéquat. Le coefficient R^2 obtenu avec ce modèle polynomial pour les protéines en solution est relativement élevé (0,96), ce qui montre que ce modèle capture bien les variations observées malgré les fluctuations importantes après le pic initial.

En parallèle, des droites linéaires passant par l'origine ont également été testées pour modéliser ces données (voir schéma ci-dessous). Cependant, ces ajustements linéaires se sont révélés moins performants que les modèles non linéaires. Pour la masse sèche, l'ajustement linéaire a donné un R^2 de 0,79, tandis que pour les protéines en solution, le R^2 était encore plus faible (0,41). Ces résultats montrent que bien que les droites linéaires puissent modéliser

grossièrement certaines tendances générales, elles ne capturent pas efficacement les variations complexes observées dans les données expérimentales.

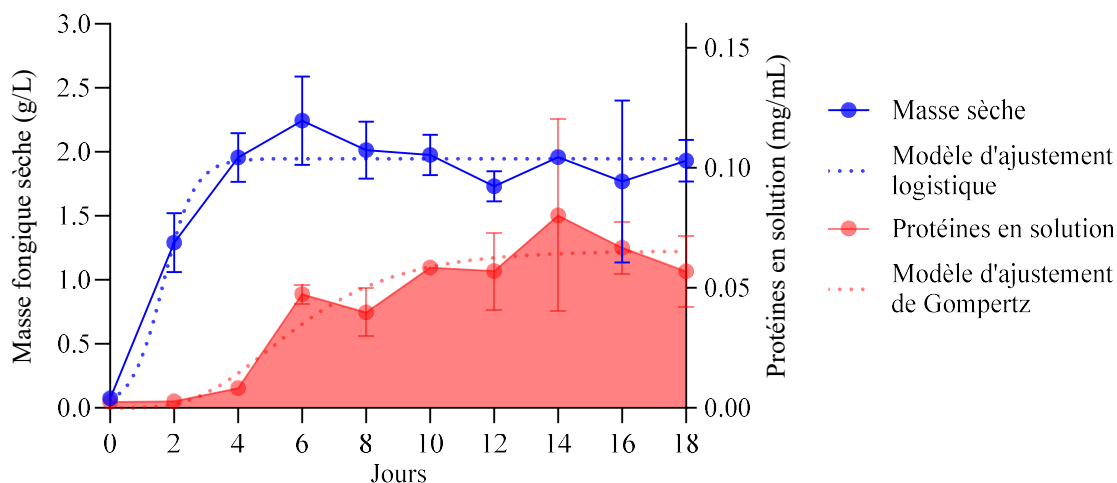


Figure 37: Cinétique de la masse fongique sèche et protéines en solution pour *Pestalotiopsis linearis*

La croissance de la masse fongique de *Pestalotiopsis linearis* est rapide, atteignant un maximum de 0,1 mg/mL dès le sixième jour. Cette phase de croissance rapide est suivie d'une phase stationnaire où la masse fongique sèche reste relativement constante. Concernant la concentration de protéines en solution, celle-ci est limitée durant la phase de croissance exponentielle. Cependant, une augmentation rapide de la concentration en protéines est observée lorsque la croissance fongique ralentit, ce qui suggère une sécrétion accrue de protéines au moment où la croissance en biomasse commence à stagner.

À partir du sixième jour, la concentration de protéines en solution continue d'augmenter de manière relativement linéaire, atteignant un pic entre le douzième et le seizième jour à environ 0,07 mg/mL. Cette tendance suggère que *Pestalotiopsis linearis* possède une

capacité élevée de production de protéines en solution, particulièrement notable lorsque la croissance en biomasse ralentit.

L'ajustement des données de masse sèche avec un modèle logistique a donné un coefficient de détermination (R^2) de 0,95, indiquant un excellent ajustement. Le coefficient de corrélation entre la biomasse et les protéines est de $r=0,36$, reflétant une corrélation modérée. Le modèle de Gompertz utilisé pour ajuster les données de protéines a donné un R^2 de 0,90, suggérant que ce modèle est bien adapté pour capturer la dynamique de production de protéines chez cette espèce, en particulier lors des phases où la croissance en biomasse ralentit.

Équation représentant le modèle logistique de croissance :

$$Y = \frac{Y_M * Y_0}{(Y_M - Y_0) * \exp(-K * x) + Y_0}$$

Y_0 = Masse fongique de départ;

Y_M = Masse fongique maximum;

K = Constante de vitesse;

$1/K$: X = coordonné du premier point d'inflexion

Équation représentant le modèle de Gompertz :

$$Y = Y * \left(\frac{Y_0}{Y_M} \right)^{\exp(-K * X)}$$

Y_0 = Masse fongique de départ;

Y_M = Masse fongique maximum;

K = Détermine le temps de latence;

$1/K$: X = coordonné du point d'inflexion

Les équations représentant le mieux la cinétique de croissance fongique, avec les paramètres ajustés pour chaque espèce dont les suivantes :

Pleurotus ostreatus (Modèle de Gompertz)

Données ajustées :

- $Y_M=1.606$
- $Y_0=0.02397$
- $K=1.315$
- $X=0.7602$

L'équation du modèle de Gompertz devient: $N(t) = Y_M \exp \left[- \exp \left(\frac{K_e}{Y_M} (X - t) + 1 \right) \right]$

En incluant les valeurs ajustées : $N(t) = 1.606 \exp \left[-\exp \left(\frac{1.315e}{1.606} (0.7602 - t) + 1 \right) \right]$

Graphium rubrum (Modèle Logistique)

Données ajustées :

- $Y_M=1.553$
- $Y_0=0.08391$
- $K=0.9250$
- $X=1.081$

L'équation du modèle logistique devient: $N(t) = \frac{Y_M}{1 + \left(\frac{Y_M}{Y_0} - 1 \right) e^{-Kt}}$

En incluant les valeurs ajustées: $N(t) = \frac{1.553}{1 + \left(\frac{1.553}{0.08391} - 1 \right) e^{-0.9250t}}$

Filosporrella exilis (Modèle Logistique)

Données ajustées :

- $Y_M=1.498$
- $Y_0=0.01930$
- $K=1.321$
- $X=0.7569$

L'équation du modèle logistique devient: $N(t) = \frac{Y_M}{1 + \left(\frac{Y_M}{Y_0} - 1 \right) e^{-Kt}}$

En incluant les valeurs ajustées: $N(t) = \frac{1.498}{1 + \left(\frac{1.498}{0.01930} - 1 \right) e^{-1.321t}}$

Pestalotiopsis linearis (Modèle Logistique)

Données ajustées :

- $Y_M=2.074$
- $Y_0=0.08777$
- $K=0.9316$
- $X=1.073$

L'équation du modèle logistique devient : $N(t) = \frac{Y_M}{1 + \left(\frac{Y_M}{Y_0} - 1 \right) e^{-Kt}}$

En incluant les valeurs ajustées:
$$N(t) = \frac{2.074}{1 + \left(\frac{2.074}{0.08777} - 1\right)e^{-0.9316t}}$$

Les différences d'AICc et les valeurs ajustées pour chaque espèce ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 10.0.0 pour Windows.

Ces modèles sont importants car ils peuvent permettre de mieux prévoir comment les souches pourraient se comporter lors de changements de volume de production, ou de comparer et améliorer les conditions de culture en observant l'évolution de la constante K .

Tableau 20 : Résumé des effets d'une modification de la constance K

Modèle	Augmentation de K	Diminution de K
Logistique	Croissance plus rapide, plateau atteint plus tôt.	Croissance plus lente, plateau atteint plus tard.
Gompertz	Temps de latence plus court, croissance rapide après la latence, inflexion plus tôt.	Temps de latence plus long, croissance lente après la latence, inflexion plus tard.

Des expériences complémentaires utilisant des milieux de culture simples et composés d'une concentration connue d'une source de carbone permettraient d'améliorer davantage la compréhension du comportement des souches. Cela faciliterait l'intégration du paramètre de limitation en nutriments dans la sélection de modèles pour décrire le plus fidèlement possible la croissance des souches dans des conditions définies.

3.3.3 Cinétiques de production de quatre enzymes associées à la dégradation des matières lignocellulosiques

Observer la cinétique de production générale de protéines avant de doser les enzymes spécifiques, comme les laccases, offre certains avantages. Cela permet d'évaluer la capacité de production protéique de l'organisme et de servir d'indicateur préliminaire de la production enzymatique. Cette information permet également, lors du dosage des enzymes d'intérêt, de vérifier si leur production semble corrélée avec la production générale de protéines.

Par exemple, les laccases sont souvent impliquées dans la dégradation de composés phénoliques et peuvent être produites en réponse à des stress oxydatifs ou à la présence de substrats spécifiques (Buddhika et al. 2021) . Si la production de laccases augmente lorsque la production générale de protéines diminue, cela peut indiquer que les laccases sont produites en réponse à des conditions stressantes, comme un manque de nutriments facilement accessibles ou la présence de molécules néfastes. En revanche, si elles sont produites en plus grande quantité lorsque la production générale de protéines augmente, cela peut indiquer qu'elles sont coréglées avec d'autres protéines de croissance (Bertrand et al. 2013).

Lors de l'analyse des données cinétiques d'activité enzymatique, il est important de considérer que les enzymes ont une durée de vie limitée à température ambiante, qui peut varier de quelques heures à plusieurs jours. Par conséquent, les enzymes produites le jour 1 peuvent encore être actives les jours suivants, ce qui signifie que l'activité enzymatique observée ne reflète pas nécessairement une production récente. De même, une diminution de l'activité peut ne pas uniquement être due à une réduction de la production, mais peut également résulter de la dégradation de l'enzyme. La stabilité thermique et temporelle des enzymes varie considérablement non seulement entre différents types d'enzymes (telles que les cellulases, xylanases, peroxydases et laccases), mais également entre les enzymes produites par différentes espèces de champignons (Baldrian 2006).

Les substances présentes en solution dans les cocktails enzymatiques bruts sont également susceptibles d'affecter la durée de persistance de l'activité enzymatique. Par exemple, la présence de protéases peut dégrader d'autres enzymes, réduisant ainsi leur activité effective (Plaxton 2019). De plus, la présence de certains ions peut influencer la stabilité enzymatique. Stoilova (2010) mentionne la désactivation complète de laccase de *Trametes versicolor* dans des solutions ioniques de NaN_3 , CuCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 à une concentration de 1.0 mM en moins de 24 heures. En revanche, une stabilité accrue est observée en présence de KCl , NaCl , CaCl_2 , MnSO_4 et MgSO_4 .

Comme ce dispositif vise à observer de façon générale l'évolution de l'activité enzymatique des cocktails bruts dans le temps et compte tenu de la nature complexe de la solution de culture utilisée, il n'est pas possible de présumer de la stabilité de ces enzymes.

Les figures 38 à 41 suivantes présentent les cinétiques d'activités de quatre familles d'enzymes impliquées dans la dégradation des matières lignocellulosiques, à savoir les cellulases et xylanases, des enzymes hydrolytiques, ainsi que les peroxydases et laccases, des enzymes oxydatives, sur une période de 18 jours. Certaines données ne sont pas disponibles pour les jours 12, 14 et 16 en raison de diverses contraintes logistiques.

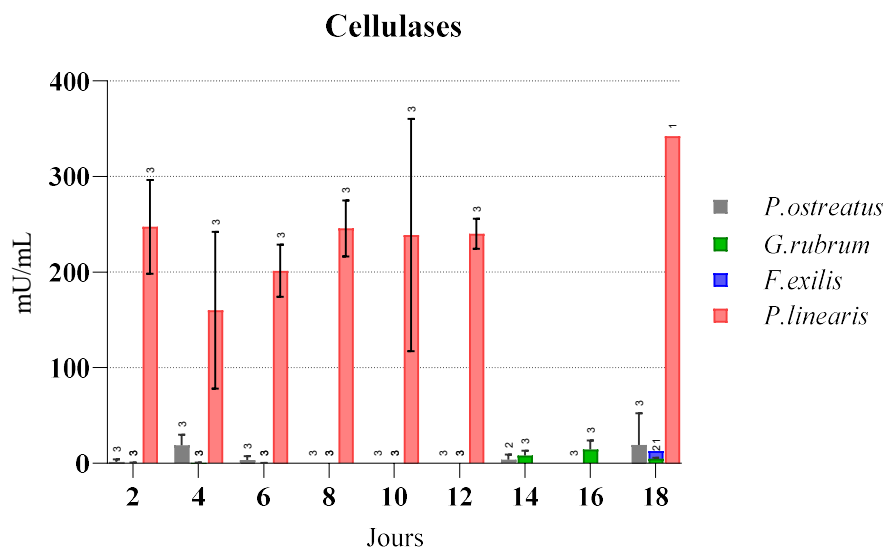


Figure 38: Cinétique de l'activité des cellulases sur 18 jours.

Pestalotiopsis linearis se distingue nettement par une activité enzymatique des cellulases significative et soutenue durant les phases de croissance exponentielle et stationnaire. Cette observation pourrait être attribuée à une régulation génétique favorable ou à des conditions spécifiques de culture qui stimulent la production de cellulases. Il est également possible que les cellulases aient été principalement produites au début de la phase de production et aient maintenu leur stabilité au cours de la période étudiée. En revanche, les autres espèces montrent une production de cellulases beaucoup plus faible, ce qui suggère une capacité générale de production inférieure dans les conditions de l'étude ou un ciblage spécifique d'autres sources de carbone.

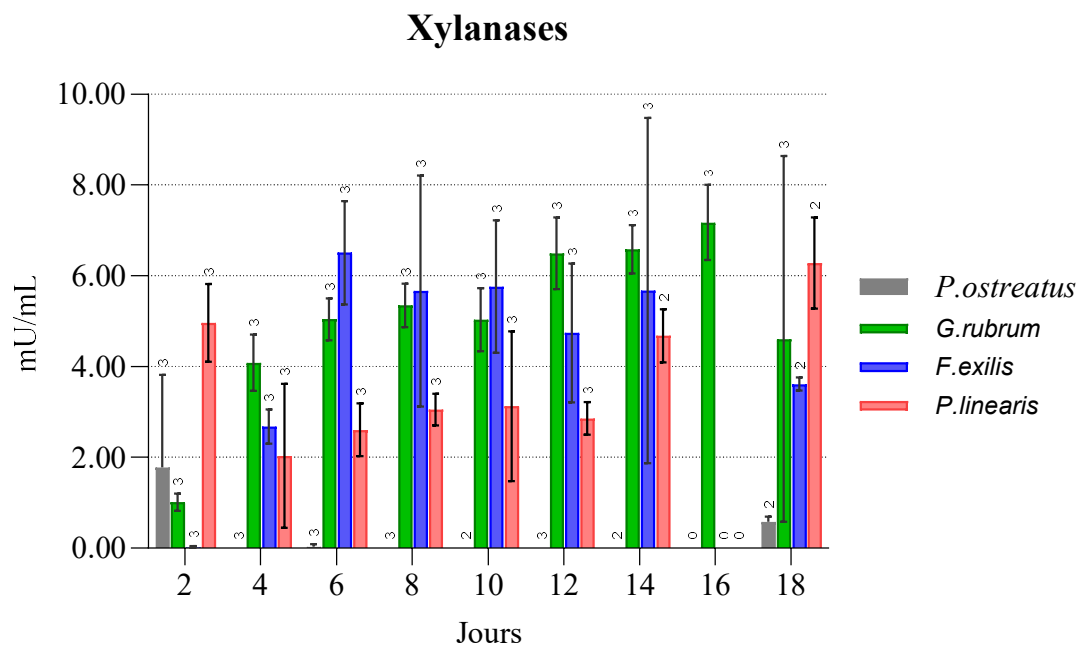


Figure 39: Cinétique de l'activité des xylanases sur 18 jours.

Graphium rubrum et *Filosporrella exilis* montrent les plus grandes activités des xylanases. La production semble, chez ces espèces, suivre les courbes de croissance. Pour *Pestalotiopsis linearis*, la production est importante durant la phase exponentielle puis diminue autour de la phase stationnaire avant de recommencer à croître lentement. *Pleurotus ostreatus* montre peu de production de xylanases dans les conditions de cette expérience.

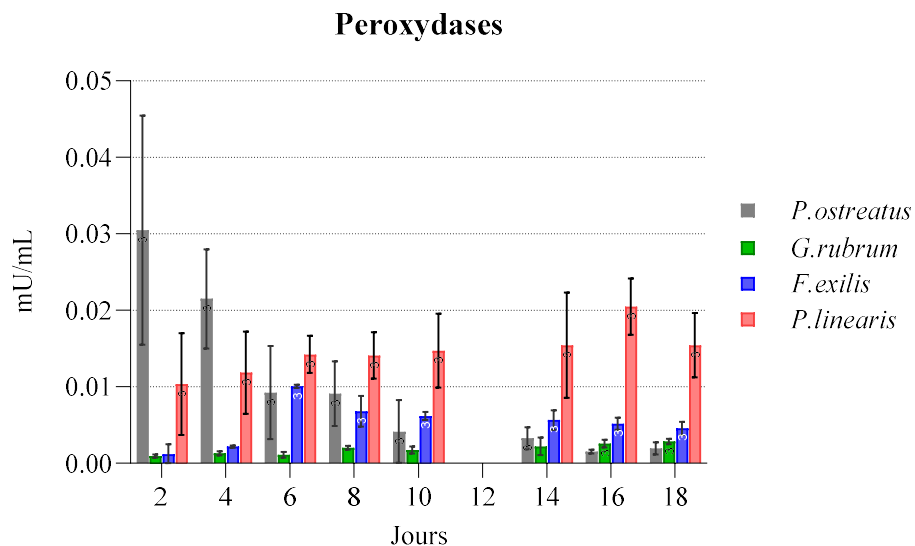


Figure 40: Cinétique de l'activité des peroxydases sur 18 jours.

Bien que plusieurs espèces de champignons de pourriture blanche, comme *Pleurotus ostreatus*, soient connues pour produire des peroxydases, très peu d'activité enzymatique a été observée pour toutes les espèces dans les conditions d'expérimentation. Il est possible que certains éléments présents dans le milieu de culture aient pu nuire à l'activité ou désactiver rapidement les peroxydases produites, le cuivre en étant un exemple potentiel.

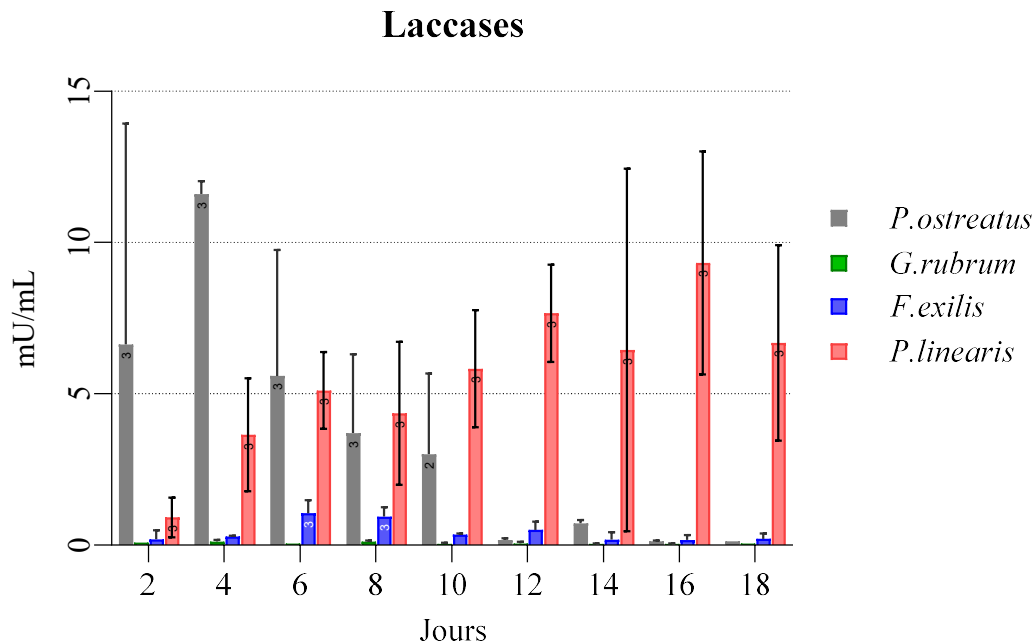


Figure 41: Cinétique de l'activité laccase sur 18 jours.

Pleurotus ostreatus montre une activité enzymatique laccase importante dans les premiers jours, suivie d'un déclin marqué de la production et d'une désactivation des laccases. Les conditions de culture expérimentales ne semblent donc pas favorables à la production ou à la stabilité des laccases pour cette espèce. En revanche, *Pestalotiopsis linearis* présente une activité enzymatique croissante au moins jusqu'au douzième jour, ce qui démontre que dans les conditions de l'étude, cette espèce est la plus performante parmi celles étudiées pour la production de cette enzyme.

3.3.4 Résultats quantification des protéines (enzymes concentré) et estimation de l'activité enzymatique des laccases de *Pestalotiopsis linearis*

Pestalotiopsis linearis se distingue nettement par sa capacité à produire des laccases en quantités significatives et de manière soutenue. La production est rapide durant la phase

exponentielle, ralentit au début de la phase stationnaire, puis reprend par la suite. *Pleurotus ostreatus* a démontré une forte production initiale de laccases avant de décliner rapidement et de pratiquement cesser durant la phase stationnaire.

En résumé, la production de peroxydases dans les conditions étudiées ne semble pas présenter d'intérêt en raison des faibles niveaux de production observés. Par contre, *Pestalotiopsis linearis* pourrait être une espèce intéressante pour la production de laccases et l'utilisation de matières lignocellulosiques riches en cellulose comme source de carbone. Les autres espèces montrent une production de cellulases beaucoup plus faible, suggérant une faible capacité générale de production dans les conditions de l'étude ou le ciblage spécifique d'autres sources de carbone.

À la suite des résultats des cinétiques enzymatiques sur les cocktails bruts, les laccases ont spécifiquement été ciblées comme unique EML, puisque les résultats d'activité enzymatique se sont avérés beaucoup plus prometteurs que pour les peroxydases.

L'étude des activités laccases chez les différentes souches fongiques après concentration par précipitation au sulfate d'ammonium a permis de confirmer les observations précédentes. Lors de l'analyse des concentrés enzymatiques, les résultats ont indiqué des activités de laccase de 7,66 U/L pour *Pleurotus ostreatus*, de 3,87 U/L pour *Graphium rubrum*, et de 7,10 U/L pour *Filospora exilis*. Cependant, *Pestalotiopsis linearis* s'est distinguée avec une activité beaucoup plus élevée.

Après précipitation au sulfate d'ammonium, deux types de précipités ont été observés spécifiquement pour *Pestalotiopsis linearis*. Le premier type, situé au fond du conteneur et de couleur plus pâle, a démontré une activité laccase de 116,98 U/L. Le second type, situé directement au-dessus du premier et conservant la couleur de la réaction avec le guaiacol, a enregistré une activité de 70,02 U/L. Cette distinction pourrait refléter des différences dans l'état de glycosylation ou la liaison des enzymes avec d'autres composés dans la solution, influençant ainsi leur activité catalytique. En particulier, la rétention de couleur dans le second type de précipité suggère une interaction spécifique avec le guaiacol, un substrat

connu médiateur potentiel pour des laccases, indiquant une forme potentiellement plus agressive (potentiel redox plus élevé) ou protégée de l'enzyme (Yin et al. 2019). Afin de distinguer les deux formes de précipités récoltés, le précipité du fond (pâle) sera nommé **Type 1** et le précipité coloré, **Type 2**.

La précipitation au sulfate d'ammonium s'est avérée être une étape efficace pour la purification partielle du cocktail enzymatique brut, ayant permis de réduire la concentration globale des protéines de 4,36 fois. Cette opération a également permis d'améliorer l'activité des laccases par millilitre d'environ 10 fois, tandis que l'activité par milligramme de protéine a vu une amélioration d'environ 47 fois. Les données détaillant la concentration des enzymes et leur activité avant et après les étapes de précipitation et de dialyse sont compilées dans le tableau 21, ci-dessous. Les données concernant l'activité enzymatique et la concentration en protéine selon la méthode Bradford pour l'enzyme de référence sont présentées pour fins de comparaison et d'analyse.

À la lumière de ces résultats, seuls les résultats des laccases de *Pestalotiopsis linearis* seront présentés lors des étapes subséquentes.

Tableau 21 : Activité enzymatique des laccases par litre (L) et par milligramme (mg) de protéines des extraits concentrés et de la solution brute.

	Laccase de <i>T.versicolor</i> référence*	Laccase Type 1 de <i>P.linearis</i>	Laccase Type 2 de <i>P.linearis</i>	Solution enzymatique brute (non concentrée)
Concentration en protéines (mg/mL), méthode Bradford BSA	0.21	2.5	2.24	10.34
Activité enzymatique laccases (U/L), méthode AmplexRed™	1000	116.98	70.02	8.53
Activité enzymatique laccases par mg de protéines (mU/mg)	3981	46.79	31.26	0.83

* Laccase de *T.versicolor* (1.10.3.2) Sigma-Aldrich® à 0.84 U/mg

L'utilisation du standard de BSA (Albumine de sérum bovin) comme protéine de référence est une pratique courante dans les études biochimiques pour la quantification des protéines, y compris lors d'études sur des laccases (G-Biosciences 2024). Cependant, cette méthode présente certaines limitations, particulièrement lorsqu'il s'agit de mesurer la concentration de laccases fongiques avec le test de Bradford. Selon les données du fabricant Sigma Aldrich, la laccase de *Trametes versicolor* est pure à près de 100%. Cependant, l'utilisation du BSA pour établir la droite d'étalonnage montre des écarts notables par rapport à la masse réelle de laccase mesurée. Par exemple, pour une masse du standard d'enzyme de 1.19 mg dissoute dans 1 mL, la concentration déterminée par le test de Bradford était de 0.18 mg/mL, ce qui s'écarte considérablement de la valeur attendue.

Cette discordance pourrait s'expliquer par les différences significatives de glycosylation entre les laccases fongiques et le BSA. Les laccases contiennent entre 15 à 30% de leur masse sous forme de glycanes (Baldrian 2006), tandis que la glycosylation du BSA

est inférieure à 0.05% (Harris & Bashford 1987). La présence importante de glycanes dans les laccases peut restreindre l'accès des sites de liaison du colorant bleu de Coomassie aux acides aminés, ce qui diminue l'intensité de la coloration et, par conséquent, les résultats du test de Bradford (Fountoulakis et al. 1992).

Cette hypothèse est supportée par les droites de calibration réalisées avec le BSA et avec le standard de laccase de *Trametes versicolor*. Les coefficients de détermination (R^2) sont élevés pour les deux droites, soit 0.99 avec le BSA et 0.98 pour la laccase de référence, ce qui indique une réponse systématique des deux types de protéines au colorant. De plus, en calculant le coefficient de corrélation de Pearson (0.99), on observe une corrélation linéaire positive et statistiquement significative avec une P-value de 0.000157.

La méthode de Bradford avec le standard de BSA peut donc être utilisée pour des analyses qualitatives et comparatives dans le cadre de travaux avec les laccases fongiques. Cependant, pour une analyse quantitative nécessitant un dosage précis d'enzymes, une étape préalable de déglycosylation, l'emploi d'un standard protéique qui ressemble davantage à la structure des laccases (Bielik & Magnelli 2018), ou l'utilisation d'une autre méthode de dosage permettrait plus de précision.

3.3.5 Caractérisation des laccases concentrées

La sélection d'enzymes adaptées aux conditions environnementales d'utilisation, notamment en termes de pH et de température, est cruciale pour assurer leur efficacité et stabilité. L'un des objectifs de ce projet est de rechercher des enzymes (EML) efficaces à des températures plus basses et à des pH plus alcalins que d'autres enzymes plus étudiées, telles que celles de *Trametes versicolor*. Cela permettrait d'étendre l'utilisation des laccases à des environnements et des processus où les conditions diffèrent des optima classiques.

Tel que présenté dans les figures 42 et 43 suivantes, on observe des températures cardinales pour les laccases de *Pestalotiopsis linearis* plutôt basses, à 35°C et 45°C

respectivement, comparées à la laccase de référence de *Trametes versicolor* qui montre une température optimale à plus de 55°C. Dans ces figures, l'augmentation de l'activité laccase s'illustre par une augmentation relative de l'intensité de la fluorescence.

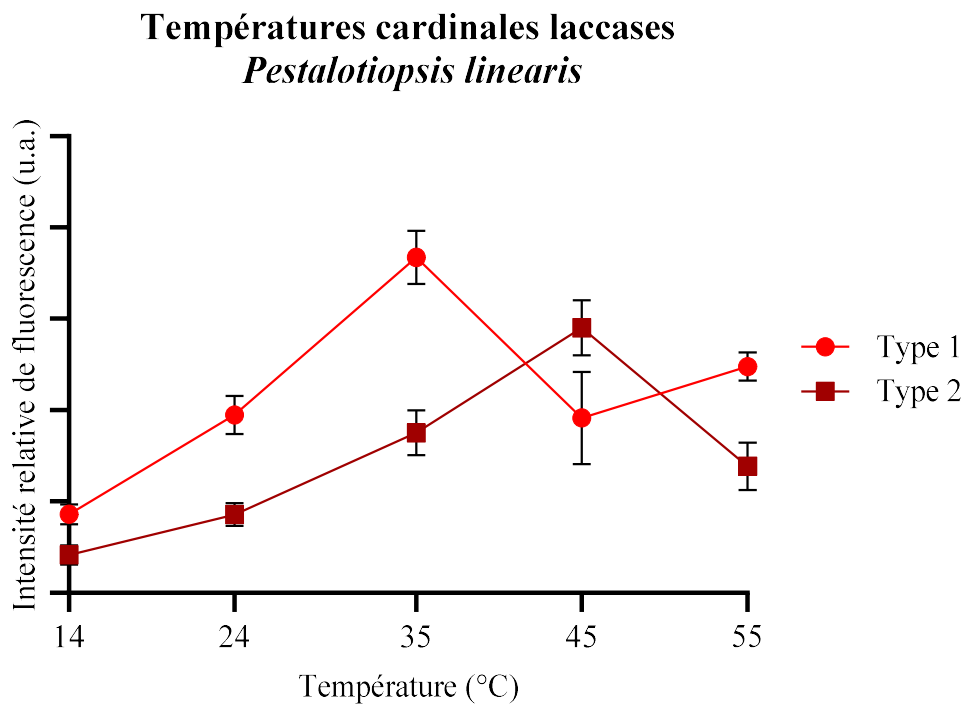


Figure 42: Température cardinale des laccases de *Pestalotiopsis linearis*

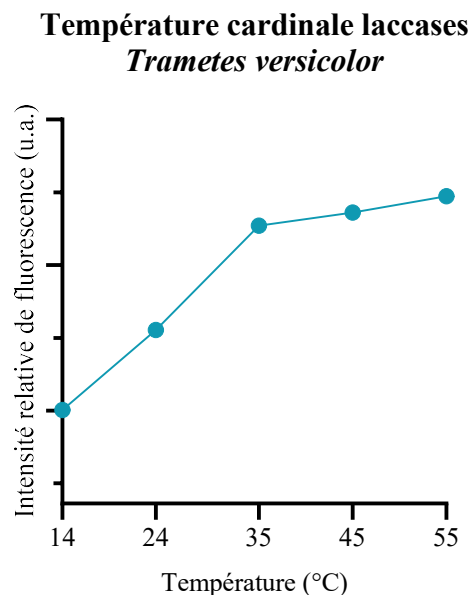


Figure 43: Température cardinale des laccases de *Trametes versicolor*

Les laccases de *Pestalotiopsis linearis* montrent des profils distincts entre les types 1 et 2, suggérant une diversité fonctionnelle potentiellement due à des variations structurelles ou des interactions avec d'autres molécules.

Pour ce qui est des pH cardinaux, les laccases de *Pestalotiopsis linearis* et *Trametes versicolor* diffèrent également. Conformément à l'étude de Wang (Wang et al. 2017), l'activité maximale de la laccase de *Trametes versicolor* avec l'AmplexRed™ se situe à pH 6.4, puis montre une rapide diminution autour de pH 7. Pour celles de *Pestalotiopsis linearis*, le type 1 montre un optimum autour de pH 7, soit assez proche de *Trametes versicolor*, mais contrairement à cette dernière, elle conserve une certaine activité à pH 8. Le type 2, par contre, se distingue clairement avec un pH optimal à plus de pH 8.

Cela pourrait indiquer qu'il s'agit d'une isoforme de laccases différentes ou, comme le suggère Yin (2019), que la présence de guaïacol peut influencer le profil de pH de l'activité des laccases. Les recherches indiquent que la plage de pH optimale pour l'activité des laccases

peut se déplacer en fonction de la présence de médiateurs phénoliques. Cela peut entraîner une augmentation de la plage de pH sur laquelle l'enzyme reste active, permettant potentiellement aux laccases de fonctionner efficacement dans des environnements plus alcalins qu'elles ne le feraient en l'absence de tels médiateurs.

Les figures 44 et 45, ci-dessous, présente l'activité enzymatique des laccases de *Pestalotiopsis linearis* et de la laccase de référence en fonction du pH. L'augmentation de l'activité laccase est exprimée par l'augmentation relative de l'intensité de la fluorescence.

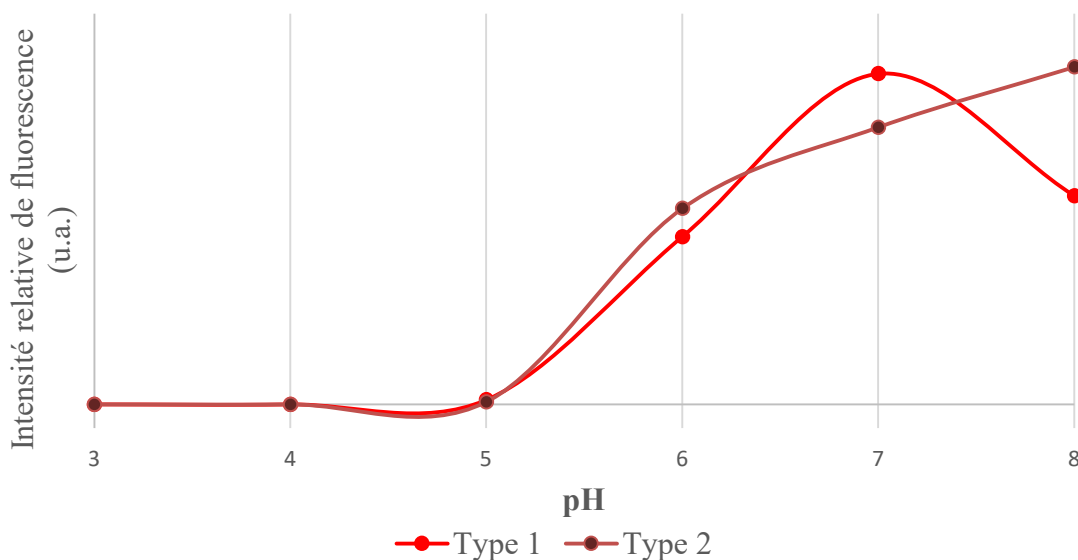


Figure 44: pH cardinaux des laccases de *Pestalotiopsis linearis*

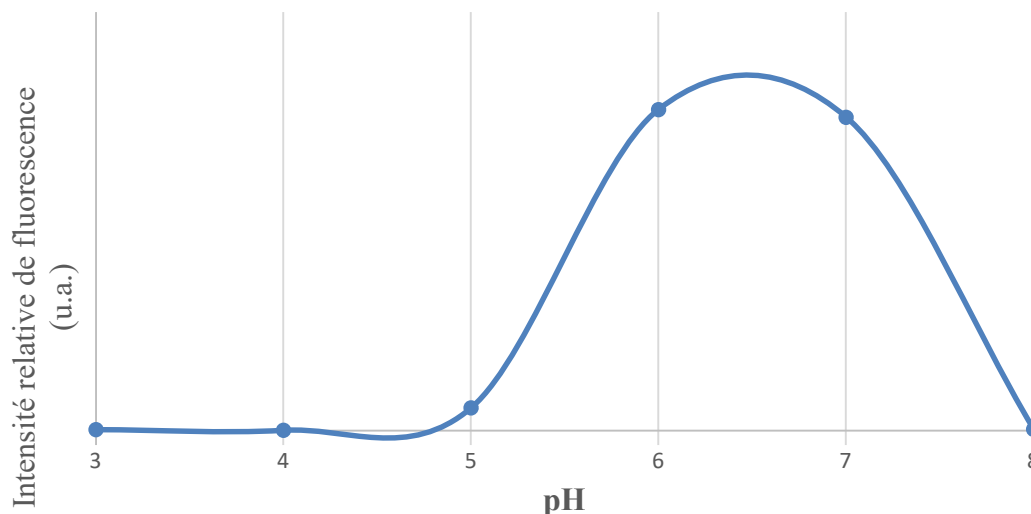


Figure 45: pH cardinal de la laccase de *Trametes versicolor*

En résumé, les laccases de *Pestalotiopsis linearis* et *Trametes versicolor* présentent des caractéristiques distinctes en termes de température et de pH optimaux. Les laccases de *Pestalotiopsis linearis* ont des températures optimales significativement plus basses. En termes de pH, le type 1 de *Pestalotiopsis linearis* et celle de *Trametes versicolor* montrent des activités maximales à pH 7, mais le type 1 de *P. linearis* semble avoir une tolérance supérieure dans des conditions alcalines. Le type 2 de *P. linearis* est remarquable pour son activité optimale à des pH supérieurs à 8, ce qui correspond aux conditions rencontrées dans les eaux de l'estuaire du fleuve Saint-Laurent.

Des étapes de purification supplémentaires, telles qu'une colonne de chromatographie suivie d'une analyse par SDS-PAGE, auraient permis d'obtenir une meilleure définition et vérification des isoenzymes de laccase. Ces méthodes permettent non seulement de séparer et de purifier les différentes formes enzymatiques, mais aussi d'en estimer les masses ou les interactions avec d'autres molécules qui peuvent influencer l'activité et la configuration des enzymes. Une caractérisation du potentiel redox permettrait également d'obtenir des informations pertinentes sur les possibilités des enzymes (Glazunova et al. 2018).

3.4 CONCLUSION

Les travaux présentés dans ce chapitre mettent en évidence les différentes caractéristiques de croissance, de production de protéines en solution ainsi que des enzymes cellulases, xylanases, peroxydases et laccases pour les espèces *Pleurotus ostreatus*, *Graphium rubrum*, *Filosporrella exilis*, et *Pestalotiopsis linearis*.

Pour le dispositif de cinétique sur 18 jours, l'utilisation de tests spectrométriques et fluorométriques en microplaques de 96 puits s'est avérée efficace pour réaliser rapidement un grand nombre de lectures avec de faibles volumes d'échantillon. AmplexRed™ s'est révélé être un substrat fluorogénique efficace même lorsque les solutions à analyser présentaient une légère coloration. En revanche, lorsque des masses sèches de mycélium doivent être pesées, l'utilisation de réactifs partiellement solubles comme les azo-cellulases ou xylanases peut nuire à la précision des résultats, car ils sont difficiles à séparer du mycélium lors de la filtration ou centrifugation. Ce dispositif a également permis de constater que, bien que le test de Bradford utilisant le BSA comme protéine de référence et le standard de laccase de *Trametes versicolor* réagissaient de façon constante l'un par rapport à l'autre, l'intensité des réactions diffère. Par conséquent, il est possible d'utiliser le standard de BSA pour des analyses qualitatives et comparatives, mais il sous-évalue la concentration des laccases lors des dosages. Un prétraitement de déglycosylation des laccases ou l'utilisation d'un autre standard ou type d'analyse serait à privilégier pour un dosage plus précis avec le BSA.

Le deuxième dispositif visant à purifier partiellement les cocktails enzymatiques en utilisant des précipitations successives des protéines avec différents degrés de saturation des solutions avec du sulfate d'ammonium, suivies d'une dialyse, s'est révélée être une méthode efficace pour concentrer les enzymes et améliorer leur activité spécifique. Cette technique a permis de distinguer deux types de précipités avec des activités enzymatiques différentes, suggérant des états de glycosylation ou des interactions moléculaires spécifiques avec le

guaïacol, qui agirait comme stabilisateur ou médiateur. Des étapes de purification supplémentaires et de SDS-PAGE seraient cependant nécessaires pour déterminer s'il s'agit bien ou non d'isoenzymes. Une analyse du potentiel redox des deux précipités pourrait nous renseigner sur l'effet de la molécule médiatrice et son potentiel.

Les deux types de précipités ont été caractérisés en fonction des températures et pH optimaux d'activité et comparés avec une enzyme commerciale de *Trametes versicolor*. *Pestalotiopsis linearis* s'est démarqué des autres espèces en termes de vitesse de croissance et de potentiel de production de laccases, présentant une activité enzymatique supérieure à une température plus basse et à un pH plus élevé que la laccase de *Trametes versicolor*.

De plus, des expériences antérieures menées chez Biopterre (données non publiées) ont montré que les laccases de *Trametes versicolor* sont fortement affectées par la salinité du milieu. À une concentration de 10 parties par millier, l'activité enzymatique des laccases de *Trametes versicolor* est significativement réduite, ce qui contraste avec les résultats obtenus pour *Pestalotiopsis linearis*, qui semble mieux tolérer ces conditions. Cependant, bien que *Pestalotiopsis linearis* montre une meilleure tolérance à la salinité, cet aspect mériterait d'être exploré plus en détail en raison de l'importance potentielle qu'il pourrait présenter pour des applications industrielles ou environnementales.

Les informations recueillies au moyen des différentes méthodes utilisées pour la bioprospection, les caractérisations des souches ainsi que des enzymes seront utiles dans le cadre d'expérimentations ultérieures en substrat solide composé de matières résiduelles lignocellulosiques.

CHAPITRE 4

PRODUCTION DE LACCASES SUR MATIERES RESIDUELLES PAR *PESTALOTIOPSIS LINEARIS* EN BIOFERMENTATION SOLIDE

4.1 INTRODUCTION

Ce chapitre traite de la production de laccases par *Pestalotiopsis linearis* en utilisant des substrats solides composés de matières résiduelles. L'objectif est d'examiner comment différents types de substrats et de conditions d'entreposage influencent la croissance et la production de laccases en milieu solide.

La méthodologie proposée vise également à mettre en application des méthodes efficaces de suivi qualitatif et quantitatif de la biomasse fongique en milieu solide et, par le fait même, à améliorer le processus d'optimisation et de mise à l'échelle des fermentations pour la production de métabolites secondaires.

Les matières résiduelles lignocellulosiques ont été sélectionnées en fonction de leurs caractéristiques et des besoins exprimés par des organismes régionaux impliqués dans la valorisation de ces matières. Les boues mixtes de papeteries sont une ressource résiduelle peu valorisée et disponible en grand volume. Cependant, selon la méthode de production, ce résidu présente souvent un pH alcalin (Haile et al. 2021) et une salinité élevée (Cabrera 2017), pouvant nuire à la croissance de certains microorganismes.

La texture des boues étant très dense lorsqu'elles sont humides, il est difficile d'obtenir un substrat suffisamment aéré lors de fermentation à plus grande échelle qu'au laboratoire. Afin d'améliorer cette caractéristique, une deuxième matière résiduelle pour laquelle il n'existe actuellement pas de voie de valorisation à grande échelle dans la région concernée a été proposée : les bouchons de liège issus de producteurs et de restaurateurs locaux. Ces deux ingrédients ont donc été utilisés pour réaliser le premier dispositif de fermentation en milieu solide avec *Pestalotiopsis linearis*.

4.2 MATERIEL ET METHODE

Pour évaluer l'influence des différents substrats sur la production de laccases par *Pestalotiopsis linearis*, deux dispositifs expérimentaux distincts ont été mis en place.

Le premier dispositif se concentre sur l'utilisation de substrats solides combinant des proportions variées de liège et de boues mixtes de papeterie, ainsi que des grains de millet. Quatre proportions de liège (0%, 5%, 25% et 45%) ont été mélangées avec des boues fraîches et entreposées, créant ainsi huit traitements principaux. En complément, quatre traitements comparatifs ont été inclus, comprenant des grains de millet seuls, des mélanges de millet et de liège, et une solution de mouillage seule. Ce dispositif permet également d'évaluer l'efficacité et la pertinence des méthodes d'évaluation qualitative et quantitative des biomasses fongiques utilisées.

Le second dispositif expérimental a été conçu pour explorer les différences dans la concentration en ergostérol selon le type de substrat et le stade de croissance. Ce dispositif comprend des cultures en milieux liquide YMB (Yeast, Malt, Broth), gélosé (Potato, Dextrose, Agar) et sur millet. L'objectif est de déterminer si ces variables influencent significativement la production d'ergostérol et, par extension, la biomasse fongique.

4.2.1 Préparation des matières résiduelles lignocellulosiques et montage du dispositif expérimental

4.2.1.1 Les matières résiduelles

Les boues mixtes de papetière

Les boues mixtes de papeteries proviennent d'une entreprise située dans la région administrative du Bas-Saint-Laurent, au Québec, dont l'identité et le procédé sont confidentiels. Le premier lot (boues entreposées) a été conservé pendant une période de 8

mois, réfrigéré en seaux de 20 litres, tandis que le second lot (boues fraîches) a été réfrigéré dans le même type de contenant pendant trois semaines puis congelé jusqu'à utilisation. Le pH et la conductivité des boues ont été mesurés à l'aide d'un pH-mètre (Thermo Fisher Scientific). Le pourcentage d'humidité initial et la teneur en eau maximale ont également été mesurés. Le pourcentage d'humidité a été déterminé par la différence de masse avant et après 48 heures à 50°C dans une étuve ventilée. La teneur en eau maximale a été déterminée après avoir laissé la biomasse saturée en eau ressuyer dans un coton fromage pendant 12 heures à température ambiante.

Le liège

Les bouchons de liège ayant servi pour l'embouteillage de vins et de liqueurs de petits fruits ont été utilisés immédiatement durant la semaine suivant leur réception. Ils ont été broyés à l'aide d'un broyeur à marteaux (modèle BM75 distribué par Oliotechnology Solutions) muni d'une grille de 8 mm pour la taille des granulats, puis tamisés pour éliminer les fractions trop fines. La fraction de granules comprise entre 2 et 7 mm a été utilisée pour le dispositif expérimental. Le pourcentage d'humidité initial et la capacité de rétention d'eau maximale ont également été mesurés, suivant la même méthode que celle utilisée pour les boues mixtes.

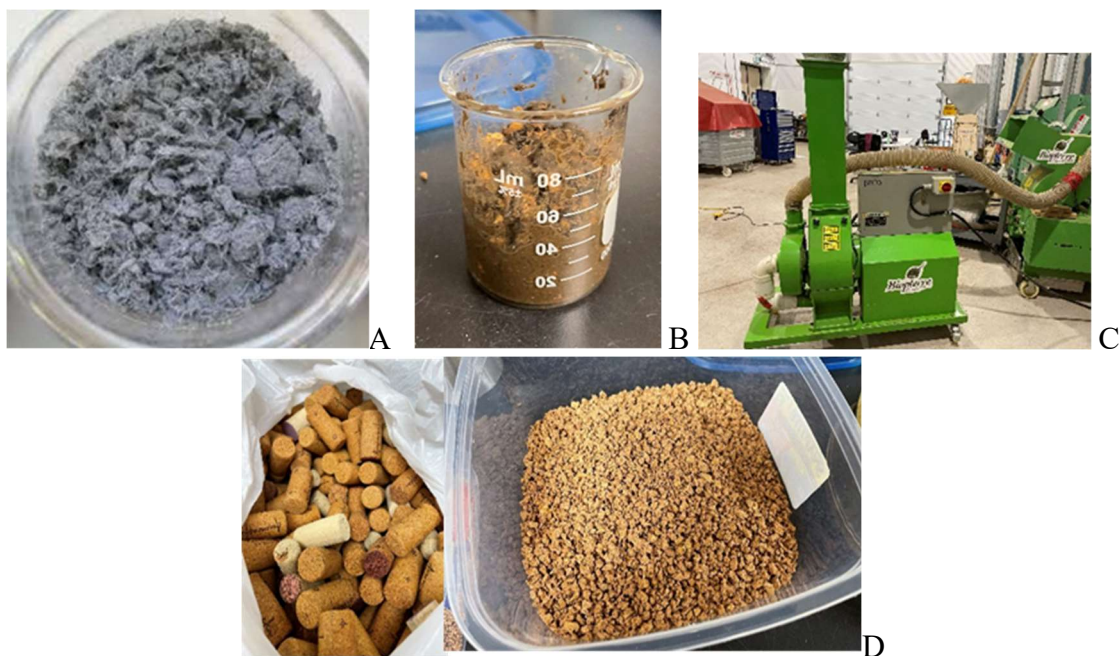


Figure 46: Les matières résiduelles utilisées.

*A) Boues mixtes sèches; B) Boues mixtes humidifiées et mélangées avec du liège; C) Broyeur
D) Bouchons de lièges avant et après broyage*

4.2.1.2 Préparation des substrats

Les masses requises pour chaque matière ont été rapportées en volume pour faciliter la mise en place du dispositif et des suivis. La capacité de rétention en eau des ingrédients après une période de ressuyage de 12 heures pour les boues mixtes et le liège a été calculée ($n=3$) et établie à $68.37 \pm 4.5\%$ pour les boues et à $57.32 \pm 1.9\%$ pour le liège. Les ingrédients ont été séchés dans une étuve ventilée à 50°C durant 48 heures avant d'être hydratés jusqu'à saturation avec une solution d'hydratation (pour 1 L : 967 mL d'eau distillée, 33 mL d'eau de l'estuaire (26,2%), 59,8 mg de sulfate de cuivre, 5 g peptone, 3 g d'extrait de levure, 3 g d'extrait de malt) durant 12 heures puis ressuyés avant d'être utilisés pour le montage du dispositif expérimental. Pour les grains de millet utilisés dans certaines des unités expérimentales, de l'eau du robinet a été utilisée pour l'hydratation.

La composition de la solution d'hydratation a été déterminée en tenant compte des résultats obtenus à partir des microplaques de phénotypage (Biolog™) ainsi que des observations de croissance effectuées. De plus, elle a été ajustée pour atteindre une concentration en cuivre favorisant la production de laccases, comme le suggère l'étude de Gassara (2012).

4.2.1.3 Composition des unités expérimentales

Quatre proportions de liège (0%, 5%, 25% et 45%) ont été mélangées aux boues fraîches ainsi qu'à celles ayant été entreposées pendant 8 mois à 4°C dans des seaux fermés de 20 litres. À ces traitements s'ajoutent des unités expérimentales constituées de 100% de grains de millet, d'un mélange de 20 mL (80% v/v) de millet et de boues fraîches avec 5 mL (20% v/v) de liège, d'un mélange de 20 mL (80% v/v) de millet avec 5 mL (20% v/v) de liège, de 100% de liège, et de la solution d'hydratation seule. Les mesures en millilitres correspondent aux graduations des tubes Falcon™ utilisés comme récipients pour les unités expérimentales afin que le lecteur puisse plus facilement visualiser le dispositif.

Tableau 22
Ingrédients des substrats pour les essais en milieux solides

Ingrédients 1 & proportions	Ingrédients 2 & proportions	Codes échantillons
Liège : 0%	Boues entreposées : 100%	BM-E0L
Liège : 5%	Boues entreposées : 95%	BM-E5L
Liège : 25%	Boues entreposées : 75%	BM-E25L
Liège : 45%	Boues entreposées : 55%	BM-E45L
Liège : 0%	Boues fraîches : 100%	BM-F0L
Liège : 5%	Boues fraîches : 95%	BM-F5L
Liège : 25%	Boues fraîches : 75%	BM-F25L
Liège : 45%	Boues fraîches : 55%	BM-F45L
Grains de millet : 100%	n.a	m100
Grains de millet : 80%	Mélange liège 5% & boues : 20%	m20BM-F5L
Grains de millet : 80%	Liège : 20%	m20-5L
Liège : 100%	n.a	100L
Solution de mouillage : 100%	n.a	Liq

4.2.1.4 Mise en place du dispositif

Le dispositif a été réalisé dans des tubes Falcon™ de 50 mL dont les bouchons ont été percés d'un trou de 64 mm de diamètre, munis de filtres 0.2 µm. La quantité de substrats a été ajusté à la ligne de 25 mL après tassement. Pour cette opération, le substrat a été tassé en laissant tomber le tube à trois reprises d'une hauteur de 10 cm.

Les tubes ont été inoculés en injectant un 1 mL d'inoculum liquide en quatre points équidistant, à mi-hauteur du substrat, pour un total de 4 mL d'inoculum. Tel que présenté dans le chapitre 2 (section 2.1.5), la concentration de l'inoculum liquide en fonction du pourcentage de transmittance à 750 nm, est de 0.80 ± 0.29 mg de mycélium sec par mL.

Les tubes ont été incubés durant 21 jours à une température de 23°C. Après 1 semaine à la suite de l'atteinte d'un niveau de colonisation de 100%, les tubes ont été conservés à -80°C jusqu'au moment des analyses. Cette manipulation visait à ce que le stade de croissance pour l'analyse (phase plateau ou stationnaire) soit le même pour tous les traitements sans égard à la vitesse de colonisation.

Pour le second dispositif, des triplicats de chaque traitement ont été récupérés durant la phase de croissance exponentielle ainsi qu'au début de la phase stationnaire, indiquée par une colonisation complète du substrat sans augmentation visible de la densité.

4.2.1.5 Suivi qualitatif des biomasses fongiques

La croissance a été estimée régulièrement durant cette période à l'aide d'une grille d'analyse conçue spécifiquement pour cette expérience (figure 47). Cette grille représente la surface d'observation et quatre points de repère d'un tube Falcon™ (rotation de ¼ de tour). La méthode consiste à marquer les sections de la grille où le mycélium est visible, puis à calculer le pourcentage de la grille occupé par le mycélium par rapport à la surface totale du substrat. Cette méthode, développée dans le cadre de ce travail de maîtrise, offre une approche simple, directe et reproductible pour évaluer la croissance fongique en milieu solide.

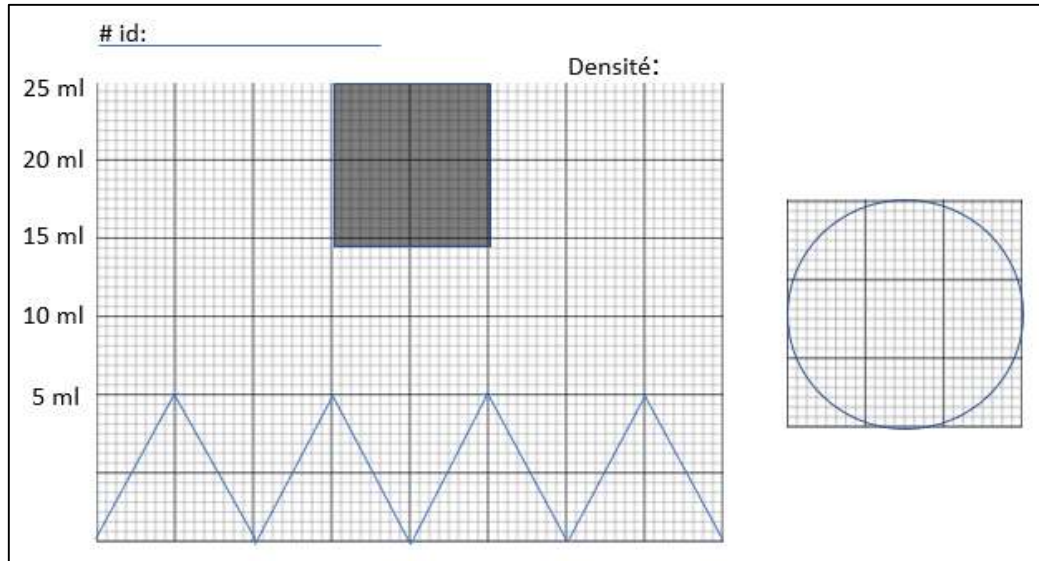


Figure 47: Grille d'analyse qualitative de la croissance mycélienne

De plus, comme la densité du mycélium est directement associée à la division des hyphes fongiques, cet aspect est important pour évaluer la croissance. Pour cette raison, le résultat obtenu avec la grille d'analyse est multiplié par un facteur de densité pour estimer la croissance. Ce facteur a été attribué en fonction du développement du mycélium sur les différents substrats (tableau 23, ci-dessous). Pour le millet et les boues, les pourcentages de densité correspondent approximativement à 50% (0.5) en début de croissance ou à la fin de la période de latence, 75% (0.75) lors de la phase exponentielle de croissance où la colonisation du substrat est rapide, et 100% (1) près de la phase stationnaire ou de plateau. Pour le substrat composé exclusivement de liège, la densité estimée visuellement est demeurée faible et constante (25% ou 0.25).

Tableau 23
Classes de pourcentage de densité utilisées selon les traitements

Matières	Pourcentage de densité
Liège 100%	25%
Mélanges boues et liège	50%, 75% et 100%
Millet 100%	50%, 75% et 100%

Les figures 48, ci-dessous présente un exemple de densité de mycélium estimées visuellement.

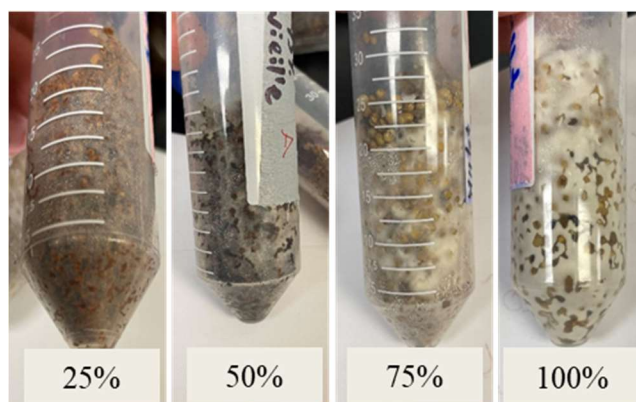


Figure 48: Exemple de classes de densité de mycélium estimé visuellement

4.2.1.6 Analyse quantitative des biomasses fongiques

Pour quantifier la biomasse fongique, une méthode de dosage de l'ergostérol par HPLC-UV dont la méthodologie est adaptée de Montgomery (2000) a été utilisée. L'extraction de l'ergostérol a été effectuée en traitant 50 mg de substrat ou de mycélium purs broyés (homogénéiseur, Precellys® 24) avec 2 mL de méthanol et 0,5 mL de NaOH 2M dans un tube à essais en verre de 24 mL muni d'un bouchon hermétique. Après mélange, les

éprouvettes ont été scellées et placées dans une bouteille de laboratoire en polypropylène de 500 mL (Nalgene™), puis chauffées au micro-ondes (1000W) à 50% d'intensité pendant 18 secondes. Après refroidissement à température ambiante pendant 10 minutes, les éprouvettes ont été traitées par micro-ondes une seconde fois durant 17 secondes à la même intensité. Le contenu des éprouvettes a été neutralisé avec une solution de HCl 1M, suivi de l'ajout de 2 mL de méthanol et de 2 mL d'hexane. L'hexane a été récupéré en surface après séparation des phases, cette opération a été répétée trois fois. Les extraits combinés ont été évaporés sous azote et resolubilisés dans 1000 µL de méthanol : acétonitrile (80 : 20) pour le dosage.

Le dosage de l'ergostérol a été effectué à l'aide d'un HPLC modèle UltiMate 3000 LC Systems avec un détecteur UV à 282 nm et une colonne Aclaim™120 C18 (4.6 x 100 mm, 5 µm). Un standard d'ergostérol (200 mg/L) a été utilisé pour établir la courbe d'étalonnage. Des injections de 10 µL des standards et des échantillons ont été réalisées dans le HPLC. L'éluant était composé de 80% de méthanol et de 20% d'acétonitrile, avec un débit de 1 mL/min et une durée d'analyse de 15 minutes.

4.2.1.7 Dosage de l'activité enzymatique des laccases

Pour extraire les enzymes produites au cours de la fermentation fongique, une solution tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) a été utilisée, le pH a été ajusté à l'aide de solutions de HCl 6M et 1M.

La solution tampon a été ajoutée aux substrats dans une proportion de 1 partie solide pour 4 parties de solution. À l'aide d'un homogénéisateur de paillasse, le mélange a été broyé pendant 50 secondes, refroidi rapidement sur glace puis filtrés avec un filtre Whatman 40 µm avant d'être centrifugé (Sorvall Legend XTR ThermoFisher) à 4°C et 20 470 g pendant 10 minutes. Le filtrat a été conservé à 4°C pour le dosage.

4.2.1.8 Méthode AmplexRed™

La méthode utilisée pour l'estimation de l'activité laccases à l'AmplexRed™ est la même que celle présenté au chapitre 3 (voir section : 3.2.1.4).

4.2.1.9 Méthode ABTS

Le dosage de l'activité laccase a été réalisé en utilisant l'ABTS (22'-Azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) comme réactif. Une solution tampon d'acétate de sodium à pH 5,5 a été préparée pour dissoudre l'ABTS à une concentration de 0,2 mM. Le dosage a été effectué en microplaque en ajoutant 50 µL de la solution à analyser et 200 µL de la solution réactive d'ABTS. L'absorbance a été mesurée à 420 nm à l'aide d'un spectrophotomètre VIS/UV, modèle Cytation 5 de BioTek, préalablement chauffé à 37°C, avant de placer les échantillons.

Afin de permettre une comparaison cohérente des résultats obtenus avec l'ABTS et l'Amplex Red™, ainsi qu'avec des cocktails enzymatiques produits par fermentation liquide décrits dans le chapitre précédent, un standard de *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich) a été utilisé dans les deux cas.

4.3 RESULTATS ET DISCUSSION

4.3.1 Analyse des matières résiduelles

L'analyse des boues mixtes a été réalisé par la compagnie qui a fourni la matière. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le tableau 24, ci-dessous.

Tableau 24
Analyse des boues mixtes de papetière

Composants	% de masse sèche	EC (n=3)
Cellulose	44.82	0.75
Hémicellulose	5.73	0.21
Lignine	5.05	0.06
Glucides non-fibreux totaux	4.06	1.54
Amidon	0.80	0.10
Sucres solubles (EtHO)	0.53	0.15
Autres (ex: pectine, frutane, etc.)	2.73	n.d
Protéines brutes	11.60	1.47
Équivalent en azote (6.25)	1.86	n.d
Lipides brutes	2.07	0.47
Calcium	10.56	0.19
Phosphore	0.38	0.03
Magnésium	0.16	0.02
Potassium	0.16	0.02
Soufre	0.23	0.02
Sodium	0.08	0.01
	PPM	
Fer	4007.00	222.67
Manganèse	95.00	3.61
Zinc	146.67	7.51
Cuivre	21.00	1.00
Cendre	26.67	1.91

La composition des boues mixtes semble favorable à la culture de mycètes filamenteux et à la production de laccases. La cellulose et l'hémicellulose représentent au total près de 50 % de la composition des boues. Ces polysaccharides peuvent fournir une source de carbone importante pour les champignons filamenteux. De plus, le ratio carbone/azote (C/N) estimé en utilisant des facteurs de conversion typiques (tableau 25) est d'approximativement 19,6 :1 (Alexander 1991, Gadd 2004, F. Bleam 2017) , ce qui est dans l'intervalle de 10:1 à 30:1 souvent recommandé pour favoriser la production de laccases chez les champignons de pourriture blanche (Colla et al. 2023, Das et al. 2024).

Tableau 25
Facteurs de conversion utilisés

Composants	Facteur de conversion
Cellulose	44% carbone
Hémicellulose	44% carbone
Lignine	60% carbone
Glucides non-fibreux	44% carbone
Amidon	44% carbone
Sucres solubles	44% carbone
Autres (ex : pectine, fructane)	44% carbone
Protéines brutes	52% carbone & 16% azote
Lipides bruts	77% carbone
Peptone	45% carbone & 16% azote
Extrait de levure	45% carbone & 16% azote
Extrait de malt	40% carbone & 10% azote

Cependant, la combinaison des divers minéraux et métaux présents dans les boues mixtes suggère qu'elles pourraient présenter un niveau de salinité notable en raison de la présence élevée de cendres (26,67%). Les cendres, résidus minéraux inorganiques après la combustion de matières organiques, sont souvent riches en minéraux et métaux qui peuvent contribuer à la salinité des boues (Gadd 2004). Nos mesures, présentées au tableau 25 ci-dessous, indiquent que les boues fraîches sont plus alcalines et présentent une faible conductivité, donc une salinité plus faible. Cela peut être attribué au fait que les boues récemment produites n'ont pas encore subi une décomposition extensive des matières organiques qui libérerait des ions et des sels dans la solution (Schimel et al. 2007).

Cependant, la combinaison des divers minéraux et métaux présents dans les boues mixtes suggère qu'elles pourraient présenter un niveau de salinité notable compte tenu de la présence élevée de cendres (26.67%). Cependant, nos mesures réalisées sur les boues, présentées au tableau 25 ci-dessous indiquent que plus les boues sont fraîches plus elles sont alcalines et présentent une faible conductivité donc une plus faible salinité.

Tableau 26
Analyses du pH et de la conductivité des boues selon la fraîcheur

	Boues à la réception	Boues neuves (fraîches)	Vieilles boues (entreposées)
pH	7.99 ±0.01	7.10 ±0.07	6.20 ±0.11
Conductivité (µS/cm)	103.2 ±0.2	697.5 ±170	1924.5 ±86.76

En revanche, les vieilles boues présentent un niveau de salinité élevé. La conductivité augmente avec le temps, suggérant que la salinité des boues mixtes peut devenir un facteur significatif avec l'entreposage. Cette salinité accrue pourrait être due à la décomposition des matières organiques et à la libération de minéraux et de sels dans la solution, ce qui est supporté par un pH plus acide, indiquant une dégradation accrue des matières organiques et la libération d'ions dans la solution.

L'augmentation de la salinité dans les boues entreposées peut avoir plusieurs effets sur la culture de mycètes filamenteux et la production de laccases. Une salinité élevée peut induire un stress osmotique chez les champignons, inhibant leur croissance et réduisant la production de laccases, car les champignons doivent gérer le stress plutôt que produire des enzymes (Schimel et al. 2007). Un pH plus acide, associé à une salinité accrue, peut affecter l'activité enzymatique, car les enzymes ont des plages de pH optimales pour leur activité, et un décalage peut réduire l'efficacité de la production de laccases (Riva 2006).

De plus, la dégradation accrue des matières organiques libère des ions et des sels, modifiant la disponibilité des nutriments essentiels pour les champignons. Cela peut soit inhiber, soit stimuler la croissance fongique, selon les concentrations spécifiques des nutriments disponibles (Gadd 2004).

La conductivité des boues fraîches correspond approximativement à une eau de mer ayant une salinité de 13,16 ‰, soit un niveau de salinité comparable à celui de l'estuaire moyen du Saint-Laurent, où la salinité varie généralement entre 10 et 20 ‰ dans les couches superficielles. En revanche, la salinité des boues entreposées se rapproche de 36,31 ‰, un

niveau plus proche de celui de l'eau de mer océanique, qui se situe autour de 35 ‰. Ces résultats indiquent que les boues mixtes subissent des modifications significatives et relativement rapides au fil du temps. L'aspect de l'entreposage pourrait donc constituer un facteur crucial à considérer pour la valorisation fongique de cette matière.

4.3.2 Suivi qualitatif des biomasses fongiques

Les estimations ont été réalisées tous les deux jours sur une période de 21 jours. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 49 ci-dessous. Les lignes pointillées représentent la courbe d'ajustement selon une équation exponentielle avec plateau, se rapprochant le plus de nos données d'estimations qualitatives. Ces courbes ont été générées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10.2.3.

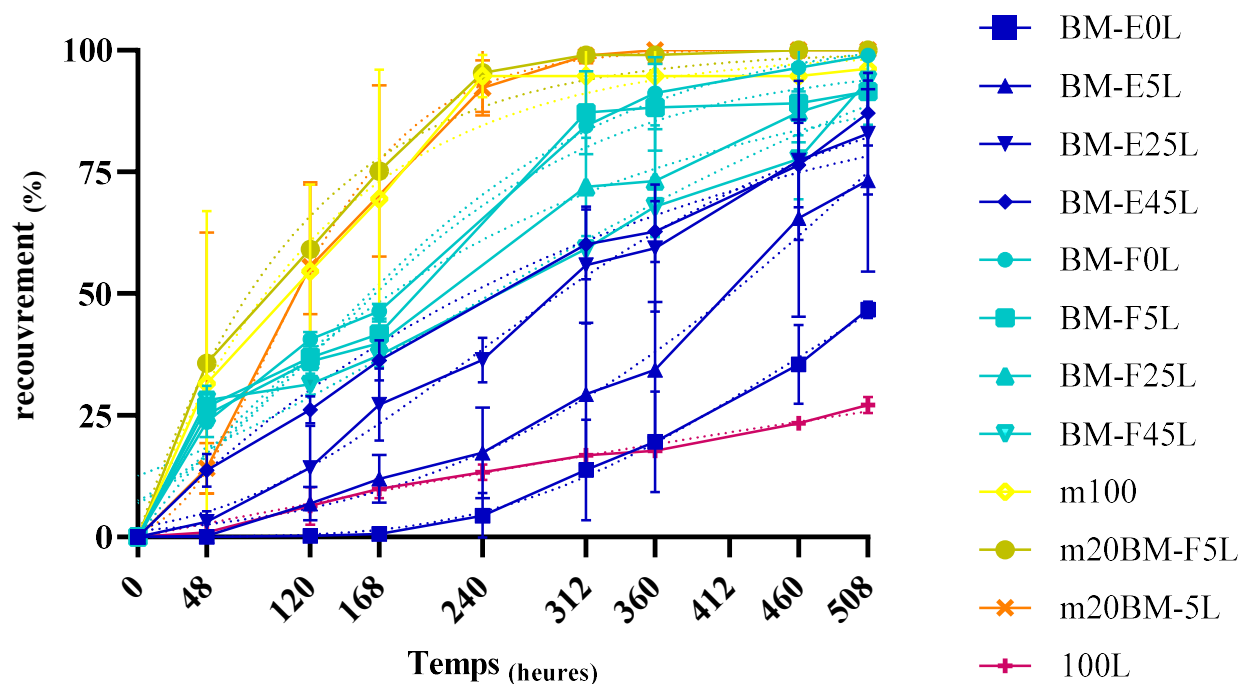


Figure 49: Cinétique de croissance par estimation qualitative

En raison de la fréquence des observations, le modèle de croissance est peu détaillé. Par conséquent, la sélection d'un modèle de croissance général et simple est appropriée. De plus, les observations qualitatives de la croissance en substrat solide s'arrêtent lors de l'atteinte d'un plateau (colonisation complète du substrat), car il n'est généralement pas possible d'y observer une phase de déclin. Les critères d'information d'Akaike corrigés (AICc) ont été utilisés pour déterminer le modèle le plus adapté pour chaque traitement. Parmi les trois modèles comparés (logistique, exponentiel avec plateau et Gompertz), les deux derniers ont fourni les meilleures correspondances entre les données et l'équation.

Les résultats montrent que :

Modèle de Gompertz :

Pour les traitements BM-E0L, BM-E5L, BM-E25L et m20-5L, la différence de AICc entre le modèle exponentiel avec plateau et le modèle de Gompertz est positive (23,69 ; 11,13 ; 10,04 ; et 20,62 respectivement), indiquant que le modèle de Gompertz est plus adapté pour ces données. Ces résultats suggèrent que ces traitements suivent une dynamique de croissance qui correspond mieux à la courbe logistique de Gompertz, souvent utilisée pour modéliser des croissances lentes initialement puis plus rapides avant d'atteindre un plateau.

Modèle exponentiel avec plateau :

En revanche, pour les traitements BM-E45L, BM-F0L, BM-F5L, BM-F25L, BM-F45L, 100m, 20mBM-F5L et 100L, la différence de AICc est négative (-3,082 ; 3,291 ; 0,3977 ; 0,3581 ; -5,452 ; -6,071 ; et -11,41 respectivement), indiquant que le modèle exponentiel avec plateau est plus approprié. Ces valeurs négatives signifient que ces traitements présentent une croissance rapide dès le départ et atteignent un plateau plus rapidement, ce qui est typiquement représenté par le modèle exponentiel avec plateau.

Pour le traitement 100L, bien que la croissance soit très lente comparativement aux autres, le modèle exponentiel avec plateau correspond mieux. Cela peut être expliqué par le fait que même si la croissance observée est lente, elle est demeurée relativement constante.

L'hypothèse est que le modèle logistique a montré moins de précision en raison de la fréquence des observations et de la précision des observations qualitatives. Les observations qualitatives moins fréquentes peuvent ne pas capturer les subtilités des phases de croissance, ce qui rend les modèles plus simples, comme l'exponentiel avec plateau, mieux adaptés aux observations qualitatives. Pour cette raison, la majorité des traitements ayant connu une

croissance rapide correspondent davantage au modèle exponentiel avec plateau puisque les prises de données n'ont pas été suffisamment rapprochées pour observer la phase initiale de latence.

Finalement, l'analyse des données issues de la méthode qualitative montre un niveau de correspondance intéressant avec des modèles de croissance théoriques. Cette méthode s'avère donc pertinente pour des applications où le degré de précision ou les budgets ne justifient pas l'emploi de méthodes quantitatives plus précises mais plus onéreuses et nécessitant une expertise plus importante.

Courbe exponentiel avec plateau : $Y = Y_M - (Y_M - Y_0) \cdot \exp(-k \cdot x)$

Y= % de recouvrement
 Y_M= % de recouvrement maximum
 Y₀= % de recouvrement initial
 X= Temps (heures)
 K= constante de vitesse (croissance exponentiel)

Courbe de croissance de Gompertz : $Y = Y_M \cdot \exp\left(-\exp\left(\frac{K \cdot (x - x_0)}{Y_M}\right)\right)$

Y= % de recouvrement
 Y_M= % de recouvrement maximum
 Y₀= % de recouvrement initial
 X= Temps (heures)
 X₀= Temps au point d'inflexion de la courbe (heures)
 K= constante de vitesse (taux de croissance)

Puisque la constante k est corrélée à la vitesse de croissance maximum, la comparaison entre ces valeurs peut aider à comparer l'affinité du champignon pour différents substrats et à évaluer la performance relative des traitements.

Tableau 27 : Comparaison de la constante K entre les courbes exponentielles avec plateau ou de Gompertz

Traitement	Valeur de la constante K	IC 95%*
BM-EOL	0.1232 (Gompertz)	[0.0819, 0.1613]
BM-E5L	0.2550 (Gompertz)	[0.1887, 0.3322]
BM-E25L	0.4176 (Gompertz)	[0.3588, 0.4840]
BM-E45L	0.5048 (Exp.Plat.)	[0.4676, 0.5450]
BM-FOL	0.8683 (Exp.Plat.)	[0.7631, 0.9927]
BM-F5L	0.7957 (Exp.Plat.)	[0.7131, 0.9927]
BM-F25L	0.6600 (Exp.Plat.)	[0.6003, 0.7269]
BM-F45L	0.5640 (Exp.Plat.)	[0.5113, 0.6225]
100m	1.3090 (Exp.Plat.)	[1.0430, 1.6840]
20mBM-F5L	1.5070 (Exp.Plat.)	[1.2630, 1.8250]
m20-5L	1.2830 (Gompertz)	[1.0920, 1.5240]
100L	0.0987 (Exp.Plat.)	[0.0940, 0.1034]

* Méthode "Profile Likelihood " calculé par le logiciel GraphPad Prism 10.2.3.

Les traitements avec des boues fraîches ont, dans tous les cas, permis une colonisation plus rapide du substrat que les boues plus âgées. Pour les vieilles boues, une plus grande proportion de liège paraît plus favorable, alors que l'inverse est observable avec les boues fraîches. Cette différence tend à diminuer lorsque la proportion de liège augmente. Les conditions d'entreposage des vieilles boues (entreposées) pourraient être en cause. La formation de composés inhibiteurs, une diminution des qualités nutritionnelles ou une trop grande salinité pourrait avoir réduit l'affinité de *P. linearis* pour ce substrat (Rodríguez-Rodríguez et al. 2012).

L'effet de l'ajout de liège sur la structure du substrat est peu visible en raison de l'échelle de ce dispositif. En effet, le faible volume ne permet pas la formation de zones anaérobies, mais dans un plus grand volume, cet aspect deviendrait crucial. À cette échelle, l'ajout de faibles proportions de liège, de 5 % à 25 % (1.25 mL à 6.25 mL), ne semble pas ralentir ou améliorer significativement la croissance.

4.3.3 Dosage des concentrations en ergostérol

Le tableau 27 présente les résultats de la quantification de l'ergostérol pour divers échantillons de substrats solides et liquides utilisés pour la culture de *Pestalotiopsis linearis*. Les échantillons ont été analysés pour leur teneur en ergostérol, un marqueur de la biomasse fongique. Les valeurs sont exprimées en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de substrat.

En raison du temps et des défis rencontrés lors de la mise au point de la méthode de dosage de l'ergostérol, certains échantillons ont dû être sacrifiés pour s'assurer de la constance des résultats. Seuls les résultats des échantillons analysés une fois que la méthode a atteint un niveau de fiabilité élevé sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 28 : Concentration en ergostérol par mg de matière sèche

Échantillon	Ergostérol ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	IC 95%*
100L	0.2	[0.18,0.22]
BM-E0L	0.6	[0.46,0.74]
BM-E45L	0.5	[0.24,0.76]
BM-F0L	1.2	[1.02,1.38]
BM-F25L	0.7	[0.44,0.96]
BM-F45L	0.8	[0.48,1.12]
m100	3.5	[2.66,4.34]
Liq	2.9	[1.86,3.94]

* intervalle de confiance basé sur l'échantillonnage

Lors de la comparaison des intervalles de confiance à 95 %, on observe que les résultats de dosage de l'ergostérol pour l'ensemble des traitements des boues mixtes ne sont pas significativement différents entre eux, sauf pour le traitement contenant seulement des boues fraîches (BM-F0L) dont les concentrations sont supérieures. L'intervalle de confiance de BM-F45L chevauche très légèrement celui de BM-F0L. La solution de mouillage seule et les grains de millet sont significativement différents des autres traitements, mais pas entre eux. Le traitement composé à 100 % de liège est significativement différent de l'ensemble des autres traitements.

Comme la concentration en ergostérol est calculée en fonction de la masse de substrat sec, les caractéristiques de celui-ci influencent inévitablement la concentration. Pour observer cet aspect de manière générale, les concentrations en ergostérol pour différents types de substrats, à des stades de croissance similaires, ont été regroupées et sont présentées dans le tableau 29 ci-dessous. Ces données proviennent des unités expérimentales présentées précédemment dans le tableau 28 et de celles de cultures liquides portant sur les phases de croissance présentées dans le tableau 30.

Tableau 29 : Comparaison des concentrations en ergostérol en fonction du type de substrat.

Type de substrat	Phase de croissance	Moyenne (µg/mL)	IC 95%
Milieux liquide PDB et YMB	Stationnaire/plateau	3.98	[3.145, 4.815]
Milieux solide PDA et PDB	Stationnaire/plateau	3.57	[3.49, 3.65]
Millet(céréale)*	Stationnaire/plateau	3.45	[2.66,4.34]
Liège	Stationnaire/plateau	0.2	[0.18,0.22]
Boues mixtes entreposées*	Stationnaire/plateau	0.6	[0.46,0.74]
Boues mixtes fraîches*	Stationnaire/plateau	1.2	[1.02,1.38]

*Données issus du dispositif principal.

La matière sèche des échantillons liquides et sur gélose se compose presque entièrement de mycélium, il est donc normal que la concentration en ergostérol y soit supérieure en comparaison avec les substrats solides. La faible densité du substrat de liège en est un bon exemple, car la croissance mycélienne doit compenser la grande porosité et la distance entre les particules de matière. Cependant, dans le cas des boues mixtes entreposées et fraîches, cette différence serait plutôt due à la densité apparente du mycélium qui est plus faible. Cette densité plus faible et une vitesse de croissance plus lente pourraient indiquer une faible compatibilité du champignon avec ces substrats.

Bien qu'il ne soit pas possible de déterminer si les facteurs influençant nos résultats sont les mêmes que ceux observés pour les composts tels que présentés par Van der Heijden & Boonstra 1984), le constat reste similaire : les vieux substrats de compost semblent moins favorables pour la croissance que les substrats plus frais.

Entre les milieux liquides YMB et les milieux gélosés de même constitution, la différence de concentration en ergostérol n'est pas significative. Cela correspond aux observations de (Weiss 2015) réalisées avec *Laccaria bicolor*.

Entre le substrat de grains de millet (céréales) et celui de géloses, la différence est également non significative. Cette observation est intéressante puisque, malgré le fait que la masse sèche sur grains soit en partie composée de résidus de céréales, la concentration en ergostérol par mg est tout de même comparable à celle du mycélium pur sur gélose. Cela pourrait indiquer que la densité du mycélium sur grains est supérieure à celle sur un milieu gélosé YMA.

Le stade de croissance est également susceptible d'avoir un impact sur la concentration en ergostérol des champignons. C'est du moins ce que rapporte Gessner (1993) ainsi que certaines de nos observations résumées dans le tableau 30 ci-dessous.

Tableau 30 : Effet de la phase de croissance sur la concentration en ergostérol

Type de substrat	Phase de croissance	Concentration en ergostérol (µg/mL)	IC 95%
Milieu liquide YMB	Exponentielle	4.24	[3.359, 5.121]
Milieu liquide YMB	Stationnaire/déclin	3.98	[3.145, 4.815]
Millet (céréale)	Exponentielle	3.88	[3.207, 4.553]
Millet (céréale)	Stationnaire/déclin	2.76	[2.279, 3.241]

Les résultats présentés tendent à démontrer que le stade de croissance pourrait effectivement avoir un impact sur la concentration en ergostérol des champignons.

Cependant, davantage de répliques et des prises d'échantillons régulières durant la croissance seraient nécessaires afin de mieux différencier la fin de la phase de croissance exponentielle du début de la phase stationnaire.

Les champignons cultivés en milieux liquides YMB montrent la plus haute concentration en ergostérol. Cette phase est caractérisée par une division cellulaire rapide et une forte activité métabolique, ce qui favoriserait la synthèse des stérols comme l'ergostérol. Cependant, bien que légèrement inférieure à celle de la phase exponentielle, la concentration en ergostérol semble aussi élevée pendant la phase stationnaire ou de déclin.

La tendance est plus évidente avec le substrat de grains de millet, bien que l'indice de confiance à 95 % se recoupe légèrement. En effet, durant la phase de croissance exponentielle, la concentration est nettement plus élevée que celle des unités expérimentales considérées comme ayant atteint la phase stationnaire.

Un autre facteur important influençant la concentration en ergostérol est l'espèce de champignons, selon Gessner & Chauvet (1993). Leurs observations indiquent que la concentration varie entre 2.5 mg/g et 11.5 mg/g d'ergostérol par gramme de mycélium sec, avec une moyenne de 5.5 mg/g. En regroupant l'ensemble de nos résultats effectués avec du mycélium pur en phase de croissance exponentielle, le facteur de conversion pour *Pestalotiopsis linearis* serait de 4.02 ± 0.37 mg/g, et pour celles en phase stationnaire de 2.98 ± 0.0591 mg/g, voire moins durant la phase de déclin. À partir de ces données, étant donné que la concentration maximale observée pour les boues mixtes sans liège est de 1.2 mg/g, il serait possible, en utilisant les données de masse volumique des boues, d'évaluer le potentiel d'amélioration du substrat pour atteindre les concentrations ci-dessus.

4.3.4 Dosage de l'activité laccase

Le tableau 31 ci-dessous présente les résultats des dosages enzymatiques et des dosages de protéines pour différents échantillons de substrats solides utilisés pour la culture de *Pestalotiopsis linearis*. Les valeurs sont exprimées en unités d'activité enzymatique par gramme de matière sèche (U/g sec) pour les dosages enzymatiques et en milligrammes de protéines par gramme de matière sèche (mg/g sec) pour les dosages de protéines.

Tableau 31 : Résultats du dosage des laccases par ABTS et AmplexRed™ en fonction des masses sèches et des protéines (BSA)

Échantillons (n=3)	Activité ABTS par masse sèche (U/g)	Activité AR par masse sèche (U/g)	Protéines (BSA) par masse sèche (mg/g)	Activité ABTS par mg de protéine (U/mg)	Activité AR par mg de protéine (U/mg)
100L	0.04	1.30	0.03	1.18	42.39
BM-E0L	0.00	0.23	0.16	0.00	1.40
BM-E5L	0.00	0.22	0.16	0.00	1.38
BM-E25L	0.15	4.07	0.01	16.64	440.59
BM-F0L	0.07	2.05	0.02	3.93	112.30
BM-F5L	0.05	1.82	0.02	2.55	88.16
BM-F25L	0.08	2.02	0.02	4.45	118.10
BM-F45L	0.11	1.86	0.02	5.46	95.05
Laccase de <i>T.versicolors</i>	510	4700	0.21	2.4	22.24

Les résultats du dosage de l'activité enzymatique mesurée avec l'ABTS et l'AmplexRed™ variaient d'un facteur de 10 lors du dosage d'enzymes purifiées, en raison de la sensibilité supérieure de l'AmplexRed™. Cependant, cette différence serait beaucoup plus grande lors d'un dosage directement à partir d'un substrat complexe, comme cela est rapporté par (Wang et al. 2017). Nos résultats indiquent également cette tendance.

L'activité laccase, mesurée par les méthodes ABTS et AmplexRed™, montre une variabilité significative en fonction des échantillons. Les échantillons BM-F25L et BM-

E25L présentent les activités enzymatiques les plus élevées, tant en termes absolus (U/g) que par rapport à la quantité de protéines (U/mg). Cependant, de façon générale l'activité enzymatique est supérieure dans les substrats de boues fraîche comparativement à ceux de boues entreposées, à l'exception des échantillons BM-E25L. La production de laccases par masse sèche ou protéines est également faible pour le substrat de liège.

On observe également que l'activité enzymatique semble directement liée à la croissance, ce qui correspond aux résultats présentés au chapitre 3 pour les cinétiques de croissance et d'activité enzymatique sur 18 jours pour *Pestalotiopsis linearis*. Cependant, comme les substrats sont différents en termes de masse volumique et de nutriments, les données d'activités en fonction de la masse sèche de substrat ne permettent pas d'évaluer directement la performance en termes d'activité enzymatique par mg de mycélium. Le calcul de l'activité enzymatique par mg d'ergostérol apporte une solution en fournissant une mesure normalisée qui permet de comparer directement l'efficacité de production de l'enzyme relativement à la biomasse fongique. Le tableau 32 ci-dessous présente ces résultats pour les échantillons pour lesquels la concentration d'ergostérol et l'activité enzymatique par mg de substrat sec ont été réalisées.

Tableau 32 : Calcul des activités par mg d'ergostérol

Échantillon	Activité ABTS par mg d'ergostérol (U/mg)	Activité AR par mg d'ergostérol (U/mg)
100L	0.18	6.50
BM-E0L	0.00	0.38
BM-F0L	0.06	1.71
BM-F25L	0.22	5.82
BM-F45L	0.13	2.32

Les échantillons BM-F25L et 100L montrent des activités enzymatiques élevées par mg d'ergostérol, indiquant une production efficace de l'enzyme en fonction de la biomasse fongique. Le liège semble donc être un ajout intéressant pour stimuler la production de laccases, malgré une croissance très lente, puisque les tanins présents dans celui-ci sont

susceptibles, en tant que composés phénoliques, d'agir comme médiateurs pour améliorer le potentiel redox des laccases (Arregui et al. 2019). Les boues mixtes entreposées non congelées durant une longue période sont beaucoup moins favorables à la croissance fongique. En fonction des résultats obtenus, pour la production de laccases, il serait pertinent de privilégier l'utilisation de boues mixtes fraîches ou conservées congelées plutôt que réfrigérées, et complétées par une proportion de liège située près de 25 %. Cependant, selon la concentration d'ergostérol par mg de matière sèche, ce substrat pourrait encore être grandement amélioré. Des pistes, comme la recherche d'un ratio carbone/azote optimal qui présenterait le meilleur compromis entre la croissance et la production de laccases, seraient à explorer. L'ensemble des données présentées dans ce chapitre constitue une base solide pour amorcer un processus d'amélioration intensif.

4.4 CONCLUSION

La production de laccases par *Pestalotiopsis linearis* en utilisant des substrats solides composés de matières résiduelles a mis en lumière l'importance des méthodes et techniques employées pour évaluer et optimiser la croissance fongique et la production enzymatique. Le liège s'est révélé être un bon ingrédient pour stimuler la production de laccases. Les boues mixtes fraîches, particulièrement complétées par une proportion de 25 % de liège, ont démontré une croissance fongique optimale et une production de laccases élevée. En revanche, les boues entreposées ont montré une moindre efficacité, probablement en raison de la dégradation des nutriments, de la formation de composés inhibiteurs ou d'un niveau de salinité trop élevé. La salinité accrue des boues entreposées pourrait limiter la croissance fongique et la production de laccases en créant un environnement stressant pour les champignons. Il est donc recommandé de contrôler la salinité des substrats pour optimiser la production de laccases, surtout lorsque les boues sont entreposées longtemps. Des études supplémentaires pourraient déterminer les seuils de tolérance des champignons à différentes concentrations de sel.

La méthode qualitative pour le suivi de la colonisation des substrats solides s'est avérée efficace pour l'observation et la comparaison des dynamiques de croissance. Les méthodes quantitatives de la biomasse fongique, telles que le dosage de l'ergostérol par HPLC-UV, ont permis une estimation précise de la croissance fongique sur différents substrats. Cette méthode est importante car elle fournit une mesure fiable de la biomasse fongique, indépendamment des caractéristiques du substrat. L'analyse des concentrations en ergostérol a révélé que les concentrations en ergostérol étaient peu sensibles au type de milieu, mais pouvaient être influencées par la phase de croissance, la phase exponentielle présentant les plus hauts taux.

L'extraction enzymatique et les dosages enzymatiques utilisant les réactifs ABTS et AmplexRed™ ont été comparés pour quantifier l'activité laccase, ce dernier étant plus précis et moins influencé par les milieux. Ces résultats soulignent que pour maximiser la production

de laccases en fermentation solide, le choix du substrat est important, mais les conditions de conservation le sont tout autant pour en préserver les qualités. Les méthodes employées dans cette étude se sont révélées essentielles pour évaluer efficacement les performances de différents substrats. La continuité de l'étude pourrait se concentrer sur l'ajustement du ratio carbone-azote et l'identification des conditions optimales de croissance pour une production enzymatique accrue. Il serait également pertinent de caractériser l'enzyme au niveau de son potentiel redox afin d'observer l'impact du liège sur celui-ci et de cibler les applications technologiques les plus pertinentes pour ces laccases. Ces bases solides offrent un point de départ pour des améliorations intensives et la mise à l'échelle du processus pour des applications biotechnologiques.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce mémoire était de mener une campagne de bioprospection dans l'estuaire du fleuve Saint-Laurent afin d'isoler, d'identifier et de caractériser des souches fongiques présentant un potentiel pour la production d'enzymes ligninolytiques. En parallèle, il visait à développer des méthodologies et des protocoles adaptés à cet objectif. Les résultats obtenus ont révélé qu'une souche isolée en particulier, *Pestalotiopsis linearis*, possédait des capacités prometteuses pour la dégradation des composés s'apparentant aux matières lignocellulosiques, et ce dans des conditions s'apparentant aux paramètres environnementaux de l'estuaire. Les enzymes laccases produites par cette espèce ont démontré une activité supérieure à celle de l'enzyme de référence de *Trametes versicolor* pour des pH plus alcalins et des températures plus basses.

La campagne de bioprospection a permis l'isolement de 83 souches fongiques filamenteuses, cultivables sur des milieux de culture standard tels que PDA ou YMA. Un processus de criblage basé sur des milieux et des conditions de croissance sélectives ainsi que l'utilisation de réactifs colorimétriques réagissant en présence d'enzymes de modification des lignines a permis de sélectionner quatre souches pour une caractérisation approfondie : *Filosporella exilis*, *Pestalotiopsis linearis*, *Graphium rubrum* et *Magnaporthiopsis agrostidis*. Ces souches ont été identifiées par séquençage des régions ITS 1 et 4 et comparées aux bases de données BLAST™.

Les souches sélectionnées ont été caractérisées en termes de cinétiques de croissance, de températures cardinales, de tolérance au pH et à la salinité, ainsi que de préférences nutritionnelles pour diverses sources de carbone et d'azote. *Filosporella exilis* a montré une utilisation efficace du D-glucose, tandis que *Graphium rubrum* préférait le D-fructose, *Magnaporthiopsis agrostidis* avait une affinité pour des sources de carbone moins communes, et *Pestalotiopsis linearis* montrait une affinité pour les polyols. Pour les sources d'azote, les acides aminés variés ont montré les meilleures efficacités. Pour les sources d'azote simples ou inorganiques, l'urée pouvait satisfaire les quatre souches, mais *Graphium*

rubrum et *Magnaportheiopsis agrostidis* ont montré une augmentation des valeurs d'absorbance avec les nitrites, tandis que *Filospora exilis* a montré une meilleure utilisation du biuret.

La production d'enzymes ligninolytiques, telles que les cellulases, xylanases, laccases et peroxydases, a été évaluée pour les quatre souches isolées en termes de modèles cinétiques de production enzymatique en fonction du temps. *Pestalotiopsis linearis* s'est démarquée par sa production de laccases, de cellulases et de xylanases. Les enzymes produites ont été comparées à la laccase de référence de *Trametes versicolor*, et *Pestalotiopsis linearis* a montré des isoformes distinctes ou une utilisation du guaiacol comme médiateur, suggérant une diversité fonctionnelle ou une adaptation à différentes conditions environnementales.

La production de laccases par *Pestalotiopsis linearis* en fermentation en milieu solide a également été explorée en utilisant des substrats solides composés de matières résiduelles. Des méthodes ont été développées pour estimer la biomasse fongique en milieu solide, tant de façon qualitative que quantitative, en mesurant l'activité des laccases par milligramme d'ergostérol. Les résultats ont montré que les substrats tels que les boues mixtes de papeteries et les bouchons de liège pouvaient soutenir la croissance fongique et la production de laccases. Cependant, les boues de papeterie fraîches sont préférables pour la production de biomasse fongique comparativement à des boues conservées en contenant fermé durant une période de six mois. Une proportion jusqu'à 25% du volume de boue en fragments de bouchons de liège usagés semble favoriser l'activité laccases.

Ces méthodes ont permis une évaluation plus précise de l'activité enzymatique en fonction de la biomasse en milieu solide, un aspect important pour optimiser les conditions de culture et maximiser la production enzymatique. Des études supplémentaires pour optimiser les ratios carbone-azote pourraient permettre d'augmenter les gains en biomasse et la production d'enzymes de laccases en conditions de fermentation en milieu solide. Ce type de fermentation est particulièrement pertinent pour la production industrielle d'enzymes, car il permet d'optimiser la production en termes de coût et d'efficacité.

Les méthodes de criblage utilisées dans cette étude peuvent être améliorées en réduisant le nombre de milieux de culture pour l'isolement afin de diminuer les repiquages et accélérer le processus. Développer des microplaques "maison" pour tester l'influence de divers paramètres environnementaux, comme le pH et la salinité, sur l'assimilation des nutriments pourrait également augmenter la robustesse des données. L'utilisation de réactifs colorimétriques pour l'ATP permettrait d'augmenter la précision des mesures de croissance et d'activité métabolique. Les travaux futurs pourraient se concentrer sur la mise en place et la mise à l'échelle de procédés de fermentation en état solide pour la production de laccases. Identifier de nouveaux métabolites secondaires produits par *Pestalotiopsis linearis* pourrait également permettre de rentabiliser davantage la production en mettant en valeur des co-produits issus de la fermentation. La mise en valeur de ces souches et de leur potentiel applicatif constitue également une piste de recherche prometteuse.

Cette étude a apporté des contributions significatives à la compréhension de la diversité fonctionnelle des champignons dans les environnements estuariens. Conséquemment, suite à la réalisation de ce travail, la bioprospection de souches fongiques associées à l'estuaire du Saint-Laurent se poursuit par Biopterre et attire l'intérêt de plusieurs chercheurs et entreprises locales et internationales, intéressés par le potentiel des applications biotechnologiques des souches fongiques encore méconnues isolées de cet environnement.

En conclusion, ce mémoire a démontré le potentiel des souches fongiques isolées de l'estuaire du fleuve Saint-Laurent pour la production de laccases présentant des caractéristiques différentes de celles déjà commercialisées, tout en proposant des améliorations méthodologiques pour de futures recherches. Les perspectives incluent l'optimisation des conditions de culture et la mise en place de procédés industriels adaptés pour tirer pleinement parti des capacités enzymatiques de ces souches.

En conclusion, ce mémoire a démontré le potentiel des souches fongiques isolées de l'estuaire du fleuve Saint-Laurent pour la production de laccases présentant des caractéristiques différentes de celles déjà commercialisées, tout en proposant des améliorations méthodologiques pour de futures recherches. Les perspectives incluent l'optimisation des

conditions de culture et la mise en place de procédés industriels adaptés pour tirer pleinement parti des capacités enzymatiques de ces souches.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P (2018) Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresour Bioprocess* 5:4
- Agrawal S, Adholeya A, Barrow CJ, Deshmukh SK (2018) Marine fungi: an untapped bioresource for future cosmeceuticals. *Phytochem Lett* 23:15-20
- Alexander M (1991) *Introduction to soil microbiology*, 2nd edn. Wiley, New York
- Angelova M, Dolashka P, Ivanova L, Petrova S, Velkova L, Voelter W (2021) Potential of halotolerant and halophilic fungi as a source of new extracellular enzymes and antimicrobial compounds. *Mar Drugs* 19:319
- Arantes V, Jellison J, Goodell B (2012) Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:323–338.
- Arregui L, Ayala M, Gómez-Gil X, Gutiérrez-Soto G, Hernández-Luna CE, Herrera de los Santos M, Levin L, Rojo-Domínguez A, Romero-Martínez D, Saparrat MCN, Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA (2019) Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb Cell Fact* 18:200.
- Baldrian P (2006) Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30:215–242.
- Bending GD, Read DJ (1997) Lignin and soluble phenolic degradation by ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycol Res* 101:1348–1354.
- Bertrand B, Martínez-Morales F, Trejo-Hernández MR (2013) Fungal laccases: induction and production. *Rev Mex Ing Quim* 12:473-488

- Bielik A, Magnelli P (2018) Enzymatic removal of N-and O-glycans using PNGase F or the protein deglycosylation mix. In: Strasser R (ed) Protein glycosylation: methods and protocols. Methods Mol Biol 1821:27-36
- Bills GF, Polishook JD (1994) Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. Mycologia 86:187–198.
- BIOCORE (2019) Biocore project. Available at: www.biocore-europe.org/index.html
- Blow D (2000) So do we understand how enzymes work? Structure 8:77–81.
- Bonugli-Santos RC, Vasconcelos MR dos S, Passarini MRZ, Vieira GAL, Lopes VCP, Mainardi PH, Santos JA dos, Duarte LA, Otero IVR, Yoshida AMS, Feitosa VA, Pessoa A, Sette LD (2015) Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. Front Microbiol 6:269
- Bou-mitri C (2013) Stabilization and immobilization of laccase from *Coriolus hirsutus* and its biocatalysis in organic solvent media. PhD thesis, McGill University, Montreal
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254
- Buchan A, LeCleir GR, Gulvik CA, González JM (2014) Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. Nat Rev Microbiol 12:686–698.
- Buddhika UVA, Savocchia S, Steel CC (2021) Copper induces transcription of *BcLCC2* laccase gene in phytopathogenic fungus, *Botrytis cinerea*. Mycology 12:48–57.
- Cabrera MN (2017) Pulp mill wastewater: characteristics and treatment. In: Farooq R, Ahmad Z (eds) Biological wastewater treatment and resource recovery. InTech, Rijeka, p 119-139

- Chen H (2015) Lignocellulose biorefinery feedstock engineering. In: Chen H (ed) *Biotechnology of lignocellulose: theory and practice*. Springer, Dordrecht, p 87-124
- Chenthamarakshan A, Parambayil N, Miziriya N, Soumya PS, Lakshmi MSK, Ramgopal A, Dileep A, Nambisan P (2017) Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of Design of experiments. *BMC Biotechnol* 17:1–10.
- Chmelová D, Legerská B, Kunstová J, Ondrejovič M, Miertuš S (2022) The production of laccases by white-rot fungi under solid-state fermentation conditions. *World J Microbiol Biotechnol* 38:21.
- Christopher LP, Yao B, Ji Y (2014) Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Front Energy Res* 2:1–13.
- Cicatiello P, Dardano P, Pirozzi M, Gravagnuolo AM, De Stefano L, Giardina P (2017) Self-assembly of two hydrophobins from marine fungi affected by interaction with surfaces. *Biotechnol Bioeng* 114:2173-2186
- Colla IM, de O. Filho OBQ, Bertéli MBD, de Freitas JDS, Avelino K V., Ruiz SP, do Valle JS, Linde GA, Colauto NB (2023) Carbon-to-nitrogen ratios on laccase and mushroom production of *Lentinus crinitus*. *International Journal of Environmental Science and Technology* 20:3941–3952.
- Czeczuga B, Mazalska B, Godlewska A, Muszyńska E (2005) Aquatic fungi growing on dead fragments of submerged plants. *Limnologica* 35:283–297.
- Daniel G (2016) Fungal degradation of wood cell walls. In: Kim YS, Funada R, Singh AP (eds) *Secondary xylem biology: origins, functions, and applications*. Academic Press, London, p 131-167

- Das J, Badak M, Singh RK (2024) Sustainable Innovations and Production Strategies of White Rot Fungi-Derived Laccase. In: *Microbiology-2.0 Update for a Sustainable Future*. Springer Nature Singapore, Singapore, p 285–306
- Dashtban M, Schraft H, Syed TA, Qin W (2010) Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. 1:36–50.
- Dube HC (1971) Studies on the nutrition of the genus *pestalotiopsis*. *Mycopathol Mycol Appl* 44:183–191.
- Durand A (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. 13:113–125.
- Eckhardt LG (2002) *Leptographium* Species: Tree Pathogens, Insect Associates, and Agents of Blue-Stain. *Forest Science* 48:791–791.
- Estevez M, Martone PT, Lu F, Ruel K, Denny MW (2009) Report Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. 169–175.
- Bleam WF (2017) *Soil and environmental chemistry*, 2nd edn. Academic Press, London
- Fackler K, Schwanninger M (2012) How spectroscopy and microspectroscopy of degraded wood contribute to understand fungal wood decay. 587–599.
- Farhan Hanafi M, Sapawe N (2020) A review on the water problem associate with organic pollutants derived from phenol, methyl orange, and remazol brilliant blue dyes. *Mater Today Proc* 31:A141–A150.
- Farinas CS (2015) Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52:179–188.
- Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K et al. (2012) The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336:1715-1719

- Fountoulakis M, Juranville J-F, Manneberg M (1992) Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins. *J Biochem Biophys Methods* 24:265–274.
- Gadd GM (2004) Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist* 18:60–70.
- Gandier JA, Langelaan DN, Won A, O'Donnell K, Grondin JL, Spencer HL, Wong P, Tillier E, Yip C, Smith SP, Master ER (2017) Characterization of a Basidiomycota hydrophobin reveals the structural basis for a high-similarity Class I subdivision. *Sci Rep* 7:45863
- Gassara F (2012) Production économique d'enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide des déchets agroindustriels et leurs applications. PhD thesis, Institut National de la Recherche Scientifique, Université du Québec, Québec
- G-Biosciences (2024) Why Is Bovine Serum the Preferred Standard for Protein Assays?
- Gessner MO (2005) Ergosterol as a measure of fungal biomass. In: Graça MAS, Bärlocher F, Gessner MO (eds) *Methods to study litter decomposition*. Springer, Dordrecht, p 189-195
- Gessner MO, Chauvet E (1993) Ergosterol-to-Biomass Conversion Factors for Aquatic Hyphomycetes. *Appl Environ Microbiol* 59:502–507.
- Giroux L (2014) State of waste management in Canada. Canadian Council of Ministers of Environment, Ottawa, p 1-155
- Glassey J, Ward AC (2015) Solid state fermentation. Diversity, Dynamics and Functional Role of Actinomycetes on European Smear Ripened Cheeses 13:217–225.

- Glazunova O, Trushkin N, Moiseenko K, Filimonov I, Fedorova T (2018) Catalytic Efficiency of Basidiomycete Laccases: Redox Potential versus Substrate-Binding Pocket Structure. *Catalysts* 8:152.
- Gouvernement du Québec (2011) Politique québécoise de gestion des matières résiduelles, plan 2011-2015. Available at: www.environnement.gouv.qc.ca/matieres/pgmr/presentation.pdf
- Griffin DH (1996) *Fungal physiology*, 2nd ed. John Wiley & Sons (ed) Wiley-Liss, New York.
- de Gruyter H, Woudenberg JHC, Aveskamp MM, Verkley GJM, Groenewald JZ, Crous PW (2013) Redisposition of phoma-like anamorphs in pleosporales. *Stud Mycol* 75:1–36.
- Haile A, Gelebo GG, Tesfaye T, Mengie W, Mebrate MA, Abuhay A, Limeneh DY (2021) Pulp and paper mill wastes: utilizations and prospects for high value-added biomaterials. *Bioresour Bioprocess* 8:35.
- Harris DA, Bashford CL (1987) *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach*. Harris DA (ed) Oxford University Press.
- Hibbert EG, Dalby PA (2005) Directed evolution strategies for improved enzymatic performance. *Microb Cell Fact* 4:29.
- Hofrichter M (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb Technol* 30:454–466.
- Hölker U, Höfer M, Lenz J (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:175–186.
- Hölker U, Lenz J (2005) Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? *Curr Opin Microbiol* 8:301-306

- Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Swiderska-burek U, Jarosz-wilkolazka A, Paszczy A (2017) Lignin degradation : microorganisms , enzymes involved , genomes analysis and evolution. 941–962.
- Kulkarni S, Nene S, Joshi K (2017) Production of Hydrophobins from fungi. *Process Biochemistry* 61:1–11.
- Lee S, Kang M, Bae J, Sohn J (2019) Bacterial Valorization of Lignin : Strains , Enzymes , Conversion Pathways , Biosensors , and Perspectives. 7:1–18.
- Leisola M, Pastinen O, Axe DD (2012) Lignin — Designed Randomness. 2012:1–11.
- Levasseur A (2008) FOLy : An integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. 45:638–645.
- Lowery CE, Foster JW, Jurtshuk P (1968) The growth of various filamentous fungi and yeasts on n-alkanes and ketones. *Archiv für Mikrobiologie* 60:246–254.
- Lundell TK, Mäkelä MR, de Vries RP, Hildén KS (2014) Genomics, Lifestyles and Future Prospects of Wood-Decay and Litter-Decomposing Basidiomycota. p 329–370
- Machado D, Andrejev S, Tramontano M, Patil KR (2018) Fast automated reconstruction of genome-scale metabolic models for microbial species and communities. *Nucleic Acids Res* 46:7542–7553.
- Machado KMG, Matheus DR, Bononi VLR (2005) Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 36:246–252.
- Madusanka C, Udayanga D, Nilmini R, Rajapaksha S, Hewawasam C, Manamgoda D, Vasco-Correa J (2024) A review of recent advances in fungal mycelium based composites. *Discov Mater* 4:13.

- Maharachchikumbura SSN, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J, Crous PW (2014a) *Pestalotiopsis* revisited. *Stud Mycol* 79:121–186.
- Maharachchikumbura SSN, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J, Crous PW (2014b) *Pestalotiopsis* revisited. *Stud Mycol* 79:121–186.
- Manan M, Webb C (2017) Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering* 4:511–532.
- Martins S, Mussatto SI, Martínez-avila G, Montañez-saenz J, Aguilar CN, Teixeira JA (2011) Bioactive phenolic compounds : Production and extraction by solid-state fermentation . A review. *Biotechnol Adv* 29:365–373.
- Matthews R, Mortimer N, Lesschen JP, Lindroos TJ, Sokka L, Morris A, Henshall P, Hatto C, Mwabonje O, Rix J, Mackie E, Sayce M (2015) Carbon impacts of biomass consumed in the EU : quantitative assessment October 2015. 329.
- Mende DR, Bryant JA, Aylward FO, Eppley JM, Nielsen T, Karl DM, DeLong EF (2017) Environmental drivers of a microbial genomic transition zone in the ocean's interior. *Nat Microbiol* 2:1367–1373.
- Mitchell DA, Krieger N, Berovic M (2006) Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals of design and operation. Springer, Berlin
- Miyazawa K, Yoshimi A, Zhang S, Sano M, Nakayama M, Gomi K, Abe K (2016) Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall α -1,3-glucan synthase. *Biosci Biotechnol Biochem* 80:1853–1863.
- Montgomery HJ, Monreal CM, Young JC, Seifert KA (2000) Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biol Biochem* 32:1207-1217

- Mun HY, Oh Y, Goh J, Chung N (2019) First report of three *Filospora* species isolated from freshwater ecosystem in Korea. *Korean Journal of Mycology* 47:165–172.
- Nagy LG, Riley R, Tritt A, Adam C et al. (2015) Comparative genomics of early-diverging mushroom-forming fungi provides insights into the origins of lignocellulose decay capabilities. *Mol Biol Evol* 33:959-970
- Nevalainen KMH (2001) Strain improvement in filamentous fungi-an overview. *Applied Mycology and Biotechnology* 1:289–304.
- Niladevi KN, Prema P (2005) Mangrove Actinomycetes as the Source of Ligninolytic Enzymes. 19:40–47.
- Nirantar SR (2021) Directed evolution methods for enzyme engineering. *Molecules* 26:5599
- Oiza N, Moral-Vico J, Sánchez A, Oviedo ER, Gea T (2022) Solid-state fermentation from organic wastes: a new generation of bioproducts. *Processes* 10:2675
- Overy D, Correa H, Roullier C, Chi WC, Pang KL, Rateb M, Ebel R, Shang Z, Capon R, Bills G, Kerr R (2017) Does osmotic stress affect natural product expression in fungi? *Mar Drugs* 15:254
- Pandey A, Soccol C, Nigam P (1999) Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. In: Singh P, Pandey A (eds) *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation*. Springer, Dordrecht, p 198-208
- Pang KL, Overy DP, Jones EBG, Calado M da L, Burgaud G, Walker AK, Johnson JA, Kerr RG, Cha HJ, Bills GF (2016) ‘Marine fungi’ and ‘marine-derived fungi’ in natural product chemistry research: Toward a new consensual definition. *Fungal Biol Rev* 30.

- Peddireddi S (2008) Hydrophobins in Wood biology and Biotechnology. Dissertation, Georg-August-University of Göttingen:1–236.
- Peralta RM, da Silva BP, Gomes Côrrea RC, Kato CG, Vicente Seixas FA, Bracht A (2017) Enzymes from basidiomycetes: peculiar and efficient tools for biotechnology. In: Brahmachari G (ed) Biotechnology of microbial enzymes. Academic Press, London, p 119-149
- Plaxton WC (2019) Avoiding Proteolysis during the Extraction and Purification of Active Plant Enzymes. *Plant Cell Physiol* 60:715–724.
- Quintanar L, Stoj C, Taylor AB, Hart PJ, Kosman DJ, Solomon EI (2007) Shall we dance? How a multicopper Oxidase chooses its electron transfer partner. *Acc Chem Res* 40:445–452.
- Raghukumar S (2017) Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems: Marine fungi.
- Rao RG, Thammaiah V, Sridhar M (2018) A novel versatile peroxidase from *Lentinus squarrosulus* (MH172167) towards enhanced delignification and digestibility of crop residues. *BioResources* 14:5132-5149
- RECYC-QUÉBEC (2015) Bilan 2015 de la gestion des matières résiduelles au Québec. Available at: www.recyc-quebec.gouv.qc.ca/sites/default/files/documents/bilan-gmr-2015.pdf
- Riva S (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol* 24:219–226.
- Rivera M, Qiu F, Bunce RA, Stark RE (1999) Complete isomer-specific ¹H and ¹³C NMR assignments of the heme resonances of rat liver outer mitochondrial membrane cytochrome b5. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 4:87–98.
- Rodr S, Sanrom MA (2005) Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. 22:211–219.

- Rodríguez Couto S, Sanromán MA (2005) Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem Eng J*.
- Rodríguez-Rodríguez CE, Caminal G, Vicent T, Díaz-Cruz MS, Eljarrat E, Farré M, de Alda MJL, Petrović M, Barceló D (2012) Fungal-Mediated Degradation of Emerging Pollutants in Sewage Sludge. p 137–164
- Rohrmann S, Molitoris HP (1992) Screening for wood-degrading enzymes in marine fungi. *Canadian Journal of Botany* 70:2116–2123.
- Rosales E, Rodríguez Couto S, Sanromán MA (2007) Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme Microb Technol* 40:1286–1290.
- Schimel J, Balser TC, Wallenstein M (2007) Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* 88:1386–1394.
- Seifert KA, Gams W (2011) The genera of Hyphomycetes – 2011 update. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 27:119–129.
- Sette LD, Paulo S (2013) Ligninolytic enzymes from marine- derived fungi: production and applications. Woodhead Publishing Limited.
- Silva Coelho-Moreira J da, Bracht GM, Castoldi R, Silva Mariano S da, Dorneles F, Bracht A, Marina R (2013) Involvement of lignin-modifying enzymes in the degradation of herbicides. In: Price AJ, Kelton JA (eds) *Herbicides - advances in research*. InTech, Rijeka, p 165-187
- Singh MP (2009) Application of Biolog FF MicroPlate for substrate utilization and metabolite profiling of closely related fungi. *J Microbiol Methods* 77:102–108.
- Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A (2009) Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 44:13-18

- Soccol CR, Costa ESF da, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LP de S (2017a) Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*.
- Soccol CR, Costa ESF da, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LP de S (2017b) Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation* 1:52–71.
- Soccol CR, Vandenberghe LPS (2003) Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem Eng J* 13:205-218
- Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev* 96:2563-2605
- Song Y, Geng K, Zhang B, Hyde KD, Zhao WS, Wei JG, Kang JC, Wang Y (2013) Two new species of *Pestalotiopsis* from Southern China. *Phytotaxa* 126:22–30.
- Stoilova I, Krastanov A, Stanchev V (2010) Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 01:208–215.
- Sya A, Ali M (2021) Decolorization kinetics and mass transfer mechanisms of Remazol Brilliant Blue R dye mediated by different fungi. *Sci Rep* 11:29-38
- Thibault C (2015) Une nouvelle stratégie pour récupérer des composés aromatiques à partir de déchets de bois. Available at: www.iramis.cea.fr/Phoce/Vie_des_labos/Ast/ast.php?t=fait_marquant&id_ast=2528
- Thomas L, Larroche C, Pandey A (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 81:146–161.

- Tuisel H, Sinclair R, Bumpus JA, Ashbaugh W, Brock BJ, Aust SD (1990) Lignin peroxidase H2 from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and stability to temperature and pH. *Arch Biochem Biophys* 279:158–166.
- Valette N (2018) Caractérisation fonctionnelle de petites protéines sécrétées chez les champignons lignolytiques. PhD thesis, Université de Lorraine, Nancy
- Vandenberghe LPS, Pandey A, Carvalho JC, Letti LAJ, Woiciechowski AL, Karp SG, Thomaz-Soccol V, Martínez-Burgos WJ, Penha RO, Herrmann LW, Rodrigues AO, Soccol CR (2021) Solid-state fermentation technology and innovation for the production of agricultural and animal feed bioproducts. *Systems Microbiology and Biomanufacturing* 1:142–165.
- Van der Heijden M, Boonstra A (1984) Fungal growth and ergosterol production in composts. *Appl Environ Microbiol* 46:113–120.
- Verduzco-Oliva R, Gutierrez-Urbe JA (2020) Beyond enzyme production: Solid state fermentation (SSF) as an alternative approach to produce antioxidant polysaccharides. *Sustainability (Switzerland)* 12.
- Verkleij G (2020) Fungal Biodiversity Centre (CBS) - Fungi strains. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht. Available at: www.gbif.org/dataset/82dc5194-f762-11e1-a439-00145eb45e9a
- Vrsanska M, Voberkova S, Langer V, Palovcikova D, Moulick A, Adam V, Kopel P (2016) Induction of Laccase, Lignin Peroxidase and Manganese Peroxidase Activities in White-Rot Fungi Using Copper Complexes. *Molecules* 21:1553.
- Wang T, Xiang Y, Liu X, Chen W, Hu Y (2017) A novel fluorimetric method for laccase activities measurement using Amplex Red as substrate. *Talanta* 162:143–150.
- Weinhandl K, Winkler M, Glieder A, Camattari A (2014) Carbon source dependent promoters in yeasts. *Microb Cell Fact* 13:5.

- Weiss L (2015) Contribution à l'étude des facteurs de régulation transcriptionnelle impliqués dans la synthèse des effecteurs symbiotiques chez le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*. MSc thesis, Université de Lorraine, Nancy
- Wert JL, Deleu M, Coppée S, Richel A (2017) Hemicelluloses and lignin in biorefineries. CRC Press, Boca Raton
- Wertz J-L, Deleu M, Coppée S, Richel A (2017) Hemicelluloses and Lignin in Biorefineries, CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Wertz JL (2010) La lignine. FARR-Wal Report DGO3/4, Région Wallonne
- Wessels JGH (2000) Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist* 14:153-159
- Williamson JD, Jennings DB, Guo WW, Pharr DM, Ehrenshaft M (2002) Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols-multifunctional plant protection? *J Am Soc Hortic Sci* 127:467-473
- Wong PTW, Walker J (1975) Germinating phialidic conidia of *Gaeumannomyces graminis* and *Phialophora*-like fungi from gramineae. *Transactions of the British Mycological Society* 65:41-IN8.
- Wu Y, Shin H (2017) Fungal and mushroom hydrophobins: a review. *J Mushrooms* 15:1-7
- Yin Q, Zhou G, Peng C, Zhang Y, Kües U, Liu J, Xiao Y, Fang Z (2019) The first fungal laccase with an alkaline pH optimum obtained by directed evolution and its application in indigo dye decolorization. *AMB Express* 9:151.
- ZAK J, WILLIG M, MOORHEAD D, WILDMAN H (1994) Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biol Biochem* 26:1101–1108.

Zhou N, Thilakarathna WPDW, He QS, Rupasinghe HPV (2022) A review: depolymerization of lignin to generate high-value bio-products: opportunities, challenges, and prospects. *Front Energy Res* 9:813723

ANNEXES 1

EXEMPLE DE CALCUL UTILISÉ POUR LES POINTAGES NORMALISÉS

Cette méthode convertit les valeurs brutes en un intervalle compris entre 0 et 1 en utilisant la formule suivante :

$$z_i = \frac{x_i - \min(x)}{\max(x) - \min(x)}$$

Où :

- z_i est le pointage normalisé.
- x_i est la valeur brute de l'échantillon.
- $\min(x)$ est la valeur minimale de l'ensemble des échantillons.
- $\max(x)$ est la valeur maximale de l'ensemble des échantillons.

Voici des exemples de calculs de pointages normalisés :

Exemple : Pointage normalisé pour gaïacol au jour 10

Supposons que les valeurs brutes des échantillons pour l'absorbance au jour 10 sont :

- $x_A = 0.5$
- $x_B = 0.7$
- $x_C = 0.2$
- $x_D = 1.0$

La valeur minimale $\min(x)$ est 0.2 et la valeur maximale $\max(x)$ est 1.0.

Le pointage normalisé pour chaque échantillon est calculé comme suit :

- Pour $x_A=0.5$:

$$z_A = 0.5 - 0.2 / 1.0 - 0.2 = 0.30 / 0.8 = 0.375$$

- Pour $x_B = 0.7$:

$$z_B = 0.7 - 0.2 / 1.0 - 0.2 = 0.5 / 0.8 = 0.625$$

- Le même calcul est répété pour les échantillons Z_C et Z_D

Pointage total :

Les pointages normalisés pour le gaïacol aux jours 10 et 20, ainsi que pour le RBBR au jour 20, sont calculés de la même manière. Ensuite, la somme des pointages pour chaque souche est comparée, ce qui permet de classer les souches en tenant compte de l'ensemble des critères pondérés sur une même échelle de valeurs.