

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA**

**FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT MICROBIOLOGIE ET
BIOCHIMIE**

N° :



**DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE
ET DE LA VIE**

FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRES

**OPTION : NUTRITION ET SCIENCES
DES ALIMENTS**

**Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique**

Par :

- Kadri Ouarda
- Saadi Narimane

Intitulé

**Application des enzymes dans la
bioremédiation des polluants
environnementaux**

Soutenu devant le jury composé de:

**Dr. Fatmi ahlam
Dr. Laib Samira
Dr. Bouazize samia**

Université M'sila
Université M'sila
Université M'sila

Présidente
Rapportrice
Examinatrice

Année universitaire : 2024 /2025

Remerciements

Louange à Allah, par Sa grâce les bonnes œuvres s'accomplissent, et par Sa faveur et Son aide les objectifs sont atteints. Louange à Celui qui a enseigné par le calame, qui a appris à l'homme ce qu'il ne savait pas. Nous Le louons avec la louange des reconnaissants et Le glorifions comme Il le mérite. Nous Lui demandons l'achèvement de Ses bienfaits et une fin pleine de bonté.

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à ma directrice de mémoire, Madame **Laïb Samira** pour ses orientations éclairées, son soutien constant et ses remarques précieuses qui ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail.*

*J'adresse également mes remerciements à **Dr. Fatmi Ahlam**, Présidente du jury, et à **Dr. Bouazize Samia**, Examinatrice, pour le temps qu'elles ont consacré à l'évaluation de ce travail et pour leurs observations enrichissantes.*

Je n'oublie pas non plus de témoigner ma haute considération à tous les enseignants du département pour les connaissances et le savoir qu'ils nous ont transmis tout au long de ces années d'études, ainsi qu'à tous ceux qui ont contribué à notre formation académique et scientifique.

Dédicace

À Celui sans qui aucune lettre n'aurait été écrite, aucun effort accompli, aucun rêve atteint...

À Allah, le Tout-Puissant, mon Créateur et Pourvoyeur, source d'inspiration et de force sur le chemin du savoir, j'adresse mes louanges les plus sincères et ma gratitude infinie pour Ses innombrables bienfaits.

À mes chers parents...

À vous qui avez semé en moi l'amour de l'apprentissage, qui m'avez soutenu(e) à chaque pas, avec patience, prière et affection...

Je vous dédie le fruit de cet effort, en témoignage d'une reconnaissance éternelle pour un dévouement inégalable.

À ma famille et à mes proches, qui ont été pour moi un refuge d'amour et un pilier de stabilité,

Merci pour votre affection inconditionnelle et votre confiance inébranlable qui m'ont porté(e) jusqu'ici.

À mes ami(e)s, compagnons de route dans les moments doux comme dans les instants difficiles,

Vous avez partagé mes espoirs, mes peines et mes réussites... Ce travail est aussi le vôtre.

À ma directrice de mémoire, Madame Laaib Samira, pour sa disponibilité, ses conseils avisés et son accompagnement constant tout au long de ce travail,

Recevez ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon estime sincère.

Et à toutes les personnes qui m'ont aidé(e), d'une parole, d'un sourire, d'un geste ou d'une prière,

Je vous dédie ce modeste travail, avec toute ma reconnaissance et mon respect.

Résumé:

La contamination de l'environnement par divers polluants pose un défi mondial majeur, et les limites des méthodes classiques de dépollution ont conduit à l'émergence de la bioremédiation enzymatique comme solution prometteuse. Cette approche repose sur l'utilisation d'enzymes capables de dégrader efficacement des polluants variés dans des conditions douces. L'étude met en lumière les rôles clés des oxydoréductases, hydrolases et lyases dans la détoxification de substances telles que les hydrocarbures, pesticides et métaux lourds, tout en soulignant les avancées technologiques comme l'immobilisation, l'ingénierie enzymatique et les nanotechnologies pour améliorer leur efficacité. Malgré des résultats encourageants en laboratoire, des obstacles persistent à grande échelle, notamment l'instabilité enzymatique et les coûts élevés, appelant à une recherche interdisciplinaire renforcée pour intégrer durablement ces techniques dans la gestion environnementale.

Mots-clés : Bioremédiation ; Enzymes, Dégradation des polluants

Abstract:

Environmental pollution by various contaminants poses a major global challenge. The limitations of conventional remediation methods have led to the emergence of enzymatic bioremediation as a promising solution. This approach relies on the use of enzymes capable of effectively degrading pollutants under mild conditions. The study highlights the key roles played by oxidoreductases, hydrolases, and lyases in detoxifying substances such as hydrocarbons, pesticides, and heavy metals. It also emphasizes technological advancements such as enzyme immobilization, enzyme engineering, and nanotechnologies to enhance their efficiency. Despite encouraging laboratory results, industrial-scale applications still face challenges, notably enzyme instability and high costs, necessitating interdisciplinary research support to sustainably integrate these solutions into environmental management.

Keywords: bioremediation, enzymes, pollutant degradation

الملخص:

تشكل تلوث البيئة بمختلف الملوثات تحديًا عالميًا كبيرًا، وقد أدت حدود الطرق التقليدية لإزالة التلوث إلى بروز المعالجة البيولوجية بالإنزيمات كحل واعد، تعتمد هذه المقاربة على استخدام إنزيمات قادرة على تحليل الملوثات بفعالية في ظروف معتدلة. تسلط الدراسة الضوء على الأدوار الرئيسية التي تؤديها إنزيمات الأكسيدو-اختزال، والهيدرولاز، واللياز في إزالة سمية مواد مثل الهيدروكربونات، والمبيدات، والمعادن الثقيلة، كما تبرز التقدمات التكنولوجية مثل التثبيت، والهندسة الإنزيمية، والتقنيات النانوية لتعزيز فعاليتها، ورغم النتائج المشجعة في المختبر، لا تزال هناك عقبات على المستوى الصناعي، أبرزها عدم استقرار الإنزيمات وارتفاع تكاليفها، مما يتطلب دعم البحث المتعدد التخصصات لدمج هذه الحلول بشكل مستدام في إدارة البيئة.

الكلمات المفتاحية: المعالجة البيولوجية، الإنزيمات، تحليل الملوثات

Liste des figures

Figure 1 : Catabolisme des triglycérides.....	28
Figure 2 : Effet du pH sur l'activité enzymatique.....	30
Figure 3 : Isomères de la 12-oxophytodiénoate réductase OPR3 (bleu) et OPR1 (vert) avec le cofacteur FMN (rose).	37
Figure 4 : Cartoon structures of the three-domain laccase from <i>Bacillus subtilis</i> (PDB 1GSK) and the homotrimeric two-domain laccase from <i>Streptomyces coelicolor</i> (PDB 3CG8). The domain assignments were made using the SWORD partition algorithm	38
Figure 5 : Peroxydases	38
Figure 6 : Structure cristallisée à 2,2 Å d'une protocatéchuate 3,4-dioxygénase d' <i>Acinetobacter baylyi</i> (en) ADP1 complexée avec du 3,4-dihydroxybenzoate (PDB 1EOB)	39
Figure 7 : L'alpha-Amylase pancréatique 1HNY, une glycoside hydrolase	40
Figure 8 : Estérases	40
Figure 9 : Lipases	41
Figure 10 : Protéases	41
Figure 11 : Amylases	42
Figure 12 : Déhalogénases.	43
Figure 13 : available via license: Creative Commons Attribution 4.0 International.....	43
Figure 14 : Monooxygénase.....	44
Figure 15 Une voie de dégradation schématique de l'orange de méthyle, en tant que colorant modèle, en présence de LiP en tant que nouvel agent catalyseur	54
Figure 16 : Mécanisme catalytique de la LiP.....	55
Figure 17 : Mécanisme catalytique de la MnP	56
Figure 18 : Inactivation de l'enzyme HRP par H ₂ O ₂ , pouvant se produire durant un cycle catalytique (composé aromatique considérée : le phénol)	57
Figure 19 : Voies catalytiques assistées par la peroxydase : (A) RB-5 et (B) RB-19.....	58
Figure 20 : Cycle catalytique simplifié du système laccase-médiateur.	59

Liste des tableaux

Tableau 1 : quelques micro-organismes utilisant les métaux lourds	5
Tableau 2 : Quelques micro-organismes capables de dégrader ou de tolérer des substances chimiques toxiques.....	5
Tableau 3 : quelques exemples de genres microbiens impliqués dans la bioremédiation des hydrocarbures.....	8
Tableau 4 : Différentes classes d'enzyme.....	24
Tableau 5 : Différentes applications des alpha-amylases.....	28
Tableau 6 : Comparaison entre différentes techniques d'immobilisation enzymatique.....	56
Tableau 7 : Avantages de l'intégration nanotechnologique dans la catalyse enzymatique..	57
Tableau 8 : Exemples de biocatalyseurs multifonctionnels dans la dépollution	57
Tableau 9 : Principes d'une approche circulaire en biotechnologie enzymatique.....	58

Liste des abréviations

BOD	Biochemical Oxygen Demand (Demande Biochimique en Oxygène)
BTEX	Benzène, Toluène, Éthylbenzène, Xylènes
CDO	Charge en Demande en Oxygène
CFU	Colony Forming Unit (Unité Formant Colonie)
CO₂	Dioxyde de carbone
COD	Chemical Oxygen Demand (Demande Chimique en Oxygène)
COV	Composés Organiques Volatils
DBO	Demande Biologique en Oxygène
DNA	Acide Désoxyribonucléique
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
MO	Matière Organique
O₂	Oxygène
PCB	Polychlorobiphényles
PCE	Perchloréthylène
PH	Potentiel Hydrogène
RNA	Acide Ribonucléique
TCE	Trichloréthylène
TNT	Trinitrotoluène
UV	Ultra-Violet

Table de matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Table de matières	
Introduction Générale.....	
1. Choix de thème	
2. Introduction	
3. Problématique.....	
4. Hypothèse.....	
5. Objectif de recherche	
Partie 1 :Généralités sur la bioremédiation et les enzymes	1
Chapitre 1 : La bioremédiation.....	2
I.1. Généralités.....	3
I.2. Concept	4
I.3.3. Organismes Utilisés	6
I.4. Types De Bioremédiation	9
I.4.1. Bioremédiation aérobie	9
I.4.2. Bioremédiation anaérobie :.....	10
I.5. Champ d'application de bioremédiation	11
I.6. Technique de bioremediation	11
I.7. Facteurs affectant la bioremédiation microbienne	15
I.9. Limites techniques de la bioremédiation	17
Chapitre2 :Les enzymes et leur mode d'action	18
II.1. Définition.....	21
II.2. Sources d'enzymes.....	22
II.4. Classification des enzymes.....	24
II.5. Les activités enzymatiques	24
II.6. Étude des paramètres influençant l'activité enzymatique.....	29
Partie 2 :Application des enzymes dans la bioremédiation	56
Chapitre 3_Enzymes utilisées dans la bioremédiation.....	56
III.1. Les oxydoréductases	37

III.2. Les hydrolases	40
III.3. Les lyases et autres enzymes spécifiques	43
Chapitre 4_Dégradation des polluants par les enzymes	36
VI.1. Les enzymes dégradant les eaux usées :	53
VI.1.2. Dégradation assistée par LiP des polluants dangereux :	54
VI.3. Performance de la biodégradation enzymatique des polluants des eaux usées :	60
VI.4.les systèmes de traitement des eaux usées liés aux enzymes :	65
VI.5. Traitement de la pollution minérale :	68
Partie 3_Perspectives et défis de la bioremédiation enzymatique	53
Chapitre 5_Optimisation et développement des techniques enzymatiques	53
V.1. Immobilisation et stabilisation des enzymes	54
V.2. Ingénierie enzymatique et enzymes recombinantes	56
V.3. Utilisation des nanotechnologies dans la bioremédiation enzymatique	57
Chapitre 6_Défis et perspectives	53
VI.1.Contraintes techniques et économiques	54
VI.2. Impact environnemental et acceptabilité sociale	55
VI.3. Perspectives de recherche et innovations futures	56
Conclusion	53
Références bibliographiques	53

Introduction Générale

Le choix de ce thème s'inscrit dans un contexte scientifique et environnemental d'actualité, marqué par l'augmentation croissante des pollutions industrielles et agricoles affectant les sols, les eaux et l'air. Face aux limites des méthodes physico-chimiques classiques de dépollution, la bioremédiation représente une alternative durable et éco-compatible. Plus précisément, l'utilisation des enzymes dans ce processus attire une attention particulière grâce à leur spécificité, efficacité et faible impact environnemental. Ce travail vise donc à explorer les mécanismes enzymatiques appliqués à la dépollution ainsi que leur potentiel dans le domaine de la biotechnologie environnementale.

La contamination de l'environnement par divers polluants organiques et inorganiques constitue aujourd'hui une problématique majeure à l'échelle mondiale. Les méthodes traditionnelles de dépollution présentent souvent des inconvénients tels que leur coût élevé, leur inefficacité partielle ou encore leur impact secondaire sur l'écosystème. Dans ce contexte, la bioremédiation, qui repose sur l'utilisation d'agents biologiques pour dégrader ou éliminer les polluants, apparaît comme une solution prometteuse. Parmi les outils biologiques mobilisés, les enzymes jouent un rôle crucial grâce à leur capacité à catalyser des réactions spécifiques sous des conditions douces. Cette étude se propose d'analyser les différents types d'enzymes utilisés dans la bioremédiation, leurs mécanismes d'action ainsi que les avancées technologiques favorisant leur utilisation à grande échelle.

Comment les enzymes peuvent-elles être efficacement utilisées dans les procédés de bioremédiation pour éliminer les polluants environnementaux tout en surmontant les contraintes techniques et économiques liées à leur application ?

L'utilisation d'enzymes spécifiques dans la bioremédiation permettrait d'améliorer significativement l'efficacité des traitements de dépollution, en ciblant les polluants de manière sélective, rapide et écologique, à condition que des approches technologiques adaptées soient mises en œuvre pour optimiser leur stabilité et leur activité.

Ce travail de recherche vise à :

- Identifier les principales classes d'enzymes utilisées dans la bioremédiation.
- Comprendre leurs mécanismes d'action dans la dégradation des polluants.
- Évaluer les avantages et les limites de l'application enzymatique en milieu réel.
- Explorer les techniques récentes d'optimisation enzymatique telles que l'immobilisation, l'ingénierie enzymatique et les nanotechnologies.

- Proposer des pistes de développement futur pour surmonter les défis liés à l'utilisation des enzymes en bioremédiation.

Partie 1 :

Généralités sur la bioremédiation et les enzymes

Chapitre 1 : La bioremédiation

I.1. Généralités

Le principe de ces méthodes repose sur la biodégradation naturelle des polluants grâce à l'intervention des micro-organismes (bactéries, champignons) et des plantes. La décontamination biologique vise à stimuler ce phénomène naturel pour en accroître l'efficacité, afin d'éliminer les polluants organiques ou inorganiques dans les délais les plus courts (**Nait et Djénad, 2015**).

L'avantage de ces techniques de traitement réside dans le maintien des propriétés physico-chimiques et biologiques des sols et des eaux traités. Ces techniques ont connu un essor significatif ces dernières années en raison de leur efficacité, de leur faible coût et de leur applicabilité à une grande variété de polluants organiques et inorganiques (**Girard et al., 2005**).

Les techniques de bioremédiation sont généralement plus rentables que les méthodes traditionnelles, ce qui explique leur large acceptation par le public (**Kumar et al., 2011 ; Sharma, 2012**). Cependant, comme toute technologie, la bioremédiation peut présenter certaines limites (**Girma, 2015**).

Selon Girma (2015), la plupart des systèmes de bioremédiation fonctionnent en conditions aérobies, mais les systèmes anaérobies pourraient également exploiter le potentiel microbien pour dégrader des substances récalcitrantes. Le contrôle et l'optimisation du processus de bioremédiation dépendent de plusieurs facteurs interdépendants. Ces facteurs incluent la présence d'une population microbienne capable de dégrader les polluants, la disponibilité des contaminants pour cette population, ainsi que des paramètres environnementaux tels que le type de site contaminé, la température, le pH, l'oxygène et les nutriments (**Sharma, 2012 ; Girma, 2015**).

Le processus de bioremédiation peut être optimisé dans des domaines spécifiques grâce à une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'activité et la croissance des microbes dans les sites pollués, leur métabolisme, leur comportement, leur potentiel métabolique et leur réaction aux changements environnementaux (**Alvarez et al., 2017**). Parmi les mécanismes de bioremédiation, on trouve la bioaccumulation, la biolixiviation, la biosorption, la biotransformation, la biominéralisation et les interactions métal-microbe. Les produits chimiques sont essentiels au développement et à la croissance des micro-organismes qui contribuent à réduire les métaux lourds dans le sol. Ces micro-organismes sont non seulement capables de dissoudre les métaux, mais aussi de réduire et d'oxyder les métaux lourds et les métaux de transition (**Sikkema et al., 1995**).

Actuellement, les scientifiques étudient certains micro-organismes génétiquement modifiés pour augmenter leur capacité à métaboliser des produits chimiques spécifiques, tels que les hydrocarbures et les pesticides. Les possibilités d'utiliser le génie génétique pour améliorer la bioremédiation ont connu un essor à la fin des années 1980. Les techniques de recombinaison

d'ADN ont été intensivement étudiées pour améliorer la dégradation des déchets dangereux en laboratoire. Les micro-organismes génétiquement modifiés possèdent une capacité de dégradation accrue et ont démontré leur efficacité pour dégrader divers polluants dans des conditions contrôlées. La technologie de modification génétique offre une large gamme d'applications actuelles et potentielles dans le cadre de la bioremédiation (**Fulekar, 2009**).

I.2. Concept

La bioremédiation est un processus qui utilise des organismes vivants tels que les plantes, les algues et les micro-organismes pour réduire, éliminer ou transformer les contaminants environnementaux en formes moins toxiques ou inoffensives. Il s'agit d'une technologie innovante et prometteuse pour éliminer les métaux lourds des eaux et des sols pollués (**Boopathy, 2000 ; Girma, 2015**).

Selon Girma (2015), la bioremédiation peut être définie comme le processus visant à réduire les polluants dangereux dans l'environnement à l'aide de micro-organismes ou de plantes, représentant ainsi la méthode la plus sûre pour décontaminer les sols et les eaux.

I.3. Organismes impliqués dans le processus de bioremédiation

I.3.1. Conditions et exigences des organismes utilisés en bioremédiation

Selon **Alexander, (1994)** Les organismes qui doivent être appliqués dans la bioremédiation doivent remplir les conditions suivantes :

- ❖ Les organismes devront avoir les enzymes efficaces importantes dans la bioremédiation.
- ❖ L'organisme doit être capable de vivre et de démontrer sa bio-activité dans des conditions de pollution.
- ❖ L'organisme doit être capable d'accéder au contaminant qui peut être non soluble dans les milieux aqueux ou fortement adsorbé sur des surfaces solides.
- ❖ Le site du substrat du contaminant doit être accessible pour le site actif de l'enzyme jouant un rôle dans la biorestauration.
- ❖ Le contaminant et le système enzymatique doivent entrer en contact étroit quelque part dans ou hors de la cellule.
- ❖ Des conditions environnementales favorables appropriées doivent exister ou être fournies pour faire naître la population du bioremédiateur potentiel.

La réussite de la bioremédiation dépend de la mise en place des conditions mentionnées ci-dessus.

En effet, des espèces de plantes, de bactéries et de champignons peuvent être utilisées pour éliminer les polluants. Cependant, les micro-organismes présentent le plus grand

potentiel de biorestoration, car ils sont des décomposeurs naturels dans différents écosystèmes et peuvent facilement proliférer (Alexander, 1994).

1.3.2. Organismes effectuant la bioremédiation

Les processus de bioremédiation peuvent être menés par les microorganismes autochtones, qui habitent naturellement dans le sol ou l'eau faisant l'objet de l'épuration ou par d'autres microorganismes, qui proviennent des différentes sources. Il existe un certain nombre de microorganismes qui peuvent être utilisés pour éliminer les métaux de l'environnement, tels que bactéries, champignons, levures et algues (Girma, 2015).

Tableau 1 : présente quelques micro-organismes utilisant les métaux lourds

<i>Micro-organisme</i>	<i>Éléments</i>
<i>Bacillus spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-Cuivre, Zinc
<i>Zooglea spp.</i>	Cuivre, Zinc
<i>Citrobacter spp.</i>	Uranium, Cuivre, Nickel
<i>Citrobacter spp.</i>	Cobalt, Nickel, Cadmium
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cadmium, Uranium, Plomb
<i>Aspergillus niger</i>	Or, Cuivre, Nickel, Uranium, Plomb, Mercure, Zinc
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Cadmium, Zinc, Argent, Thorium, Uranium
<i>Rhizo pusarrhizus</i>	Cadmium, Cuivre, Zinc

Les organismes naturels, qu'ils soient indigènes ou étrangers (introduits), sont les principaux agents utilisés pour la bioremédiation. Les organismes utilisés varient en fonction de la nature chimique des agents polluants, et doivent être sélectionnés avec soin car ils ne survivent que dans une gamme limitée de contaminants chimiques (Girma, 2015).

Tableau 2 : Quelques micro-organismes capables de dégrader ou de tolérer des substances chimiques toxiques

<i>Micro-organismes</i>	<i>Substances chimiques toxiques</i>
<i>Pseudomonas spp.</i>	Benzène, anthracène, hydrocarbures, PCBs
<i>Alcaligenes spp.</i>	Hydrocarbures halogénés, alkylbenzène linéaire sulfonates, aromatiques polycycliques aromatiques, PCBs
<i>Arthrobacter spp.</i>	Benzène, hydrocarbures, pentachlorophénol, phénoxyacétate, aromatiques polycycliques, aromatiques à longue chaîne, phénol, crésol, etc.
<i>Bacillus spp.</i>	Hydrocarbures halogénés, phénoxyacétates
<i>Corynebacterium spp.</i>	Aromatiques
<i>Flavobacterium spp.</i>	Naphtalène, biphényle

<i>Azotobacter spp.</i>	Hydrocarbures Aromatiques et ramifiés, benzène, cycloparaffines
<i>Rhodococcus spp.</i>	Hydrocarbures Aromatiques
<i>Mycobacterium spp.</i>	Aromatiques Hydrocarbures, hydrocarbures polycycliques

Leur taux de génération élevé, leur chimiotactisme, leurs systèmes enzymatiques et de sécrétion complexes en font des substituts précieux aux d'autres agents de remédiation chimiques et/ou physiques. Une étude continue pour identifier et sélectionner des nouvelles espèces et souches pour les processus de bioremédiation est hautement nécessaire (**Alexander, 1994**).

L'évolution a permis l'émergence d'une grande variété de micro-organismes présentant des capacités de biodégradation larges et flexibles. Ils peuvent survivre et détruire ou détoxifier des composés chimiques dans une grande variété de niche environnementales (chaleur, froid, pH bas, avec ou sans oxygène, etc.) (**Perry, 2001**).

Les organismes les mieux adaptés pour la bioremédiation sont souvent les espèces indigènes d'un habitat pollué particulier. Les microorganismes indigènes par définition survivre et se multiplie en présence de substances toxiques (**Perry, 2001**).

Selon Girma (**2015**), étant donné que des nombreux types des polluants peuvent être rencontrés dans un site contaminé, divers types de microorganismes peuvent être utilisés, sont probablement nécessaires pour une médiation efficace. Le premier brevet pour un agent de remédiation biologique a été déposé en 1974, il s'agissait d'une souche de *Pseudomonas putidath* qui était capable de dégrader le pétrole.

La découverte d'une espèce bactérienne *Geobacter metallireducens* est une bonne preuve de la nécessité de telles études. Cette bactérie réduit et élimine l'uranium radioactif des eaux de drainage dans les opérations minières et des eaux souterraines contaminées.

Même les cellules microbiennes mortes peuvent être utiles dans les technologies de bioremédiation (**Alexander, 1994**).

I.3.3. Organismes Utilisés

Les microorganismes impliqués dans cette biodégradation peuvent être : des bactéries, des archées, des algues ou encore des champignons. On dénombre après un siècle d'études 200 genres de ces microorganismes, représentant plus de 500 espèces et souches décrites (**Terrat, 2001**).

A. Bactéries

Dans le sol, les bactéries sont les micro-organismes les plus abondants et les plus actifs. En fonction des propriétés physico-chimique du sol ; tous les types physiologiques bactériens sont représentés dans la microflore tellurique : Autotrophes et hétérotrophes, thermophiles et psychrophiles, aérobies, anaérobies facultatifs et anaérobies très répandus, les

actinomycètes jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique (**Haritash et Kaushik, 2009**).

Les bactéries sont la classe des microorganismes activement impliqués dans la dégradation des hydrocarbures des sites contaminés. Un certain nombre d'espèces bactériennes sont connues pour la dégradation des HAP. La plupart d'entre eux, représentant l'efficacité de la biodégradation, elles sont isolées à partir de sols contaminés à long terme par les déchets pétrochimiques (**Haritash et Kaushik, 2009**).

Les différents genres bactériens fréquemment décrits pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures dans les environnements de sol comprennent : *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Collimonas*, *Corynebacterium*, *Dietzia*,

Flavobacterium, *Gordonia*, *Nocardia*, *No cardioïdes*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* et d'autres clones bactériens (**Obayori et Salam, 2010**).

B. Champignons

Dans des conditions d'humidité très faible, les champignons semblent plus résistants que les bactéries et sont relativement plus nombreux (**Sasson, 1967**). De nombreuses études sur les sols ont démontré l'utilité et l'efficacité des champignons dans la biorestauration des sols contaminés par des hydrocarbures (**Bogan et al., 1999**). Ils sont les principaux responsables de la dégradation des résidus organiques dans le sol ; il existe deux principaux types de champignons : la lignine filamenteuse et la non-lignine. Des exemples de champignons communément appelés « pourriture blanche » font partie de la famille des soies ligneuses en décomposition. Ils sont responsables de la dégradation des hydrocarbures pétroliers lourds. Ils attirent également l'attention dans diverses applications dans les industries papetière, alimentaire et pharmaceutique (**Sasson, 1967**).

Le principal avantage des champignons par rapport aux bactéries est que leur mycélium peut se multiplier dans le sol et produire des enzymes extracellulaires, telles que des oxydases à large spécificité de substrat, qui peuvent mieux entrer en contact avec les hydrocarbures (**Young et Cerniglia, 1995**).

C. Plantes

De nombreuses plantes peuvent fixer dans leurs cellules des métaux lourds, des radionucléides, des composés organiques polluants et d'autres produits indésirables ; certaines plantes produisent des enzymes qui décomposent ces polluants en produits moins toxiques ou non toxiques. Ils peuvent également accompagner le cercle mycorhizien et sont responsables de la fixation et/ou de la transformation. Le choix des plantes dépend aussi de leur taille et de leur capacité à percer les racines profondément dans le sol pour atteindre des couches de pollution

profondes (quelques mètres), et en fonction des types de polluants qu'elles peuvent ainsi capter (Colombano *et al.*, 2010).

I.3.3.1. Microorganismes dépolluants le sol

Le sol est composé de matière minérale provenant de l'érosion des roches et de matières organiques. Les microorganismes sont des êtres vivants microscopiques généralement unicellulaires qui multiplient naturellement dans tous les milieux et dans des conditions très variables, le sol comprend des bactéries, des champignons, des protozoaires, des algues et des virus (Soltani, 2004).

Les micro-organismes absorbent les métaux lourds de manière active (Bioaccumulation) et/ou passive (adsorption). Les parois cellulaires microbiennes, qui se composent principalement des polysaccharides, des lipides et des protéines, offrent des nombreux groupes fonctionnels qui peuvent lier les ions des métaux lourds, notamment les groupes carboxylate, hydroxyle, amino et phosphate. Parmi les diverses méthodes à médiation microbienne, le processus de biosorption semble être plus réalisable à grande échelle, semble plus facile à mettre en œuvre à grande échelle que le processus de bioaccumulation, car les microbes ont besoin d'un apport de nutriments pour leur activité d'éléments nutritifs pour leur absorption active des métaux lourds, ce qui augmente la demande biologique en oxygène ou la demande chimique en oxygène dans les déchets. En outre, il est très difficile de maintenir une population saine de microorganismes en raison de la toxicité des métaux lourds, et d'autres facteurs environnementaux (Girma, 2015).

Certains micro-organismes présents dans le sol et les eaux souterraines utilisent naturellement des produits chimiques nocifs pour les humains et l'environnement. Ces micro-organismes ont la capacité de transformer ces substances chimiques en eau et en gaz inoffensifs, tels que le dioxyde de carbone. La pollution des sols a récemment suscité une attention accrue du public, car l'ampleur du problème environnemental est si vaste qu'elle nécessite une action immédiate et des solutions efficaces. Par conséquent, il est crucial de réduire les effets toxiques des polluants du sol et de l'eau en recourant à des techniques de bioremédiation (Girma, 2015).

Tableau 3 : quelques exemples de genres microbiens impliqués dans la bioremédiation des hydrocarbures.

(Bouderhem, 2011).

<i>Bactéries Gram -</i>	<i>Bactéries Gram +</i>	<i>Champignons</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Acremonium</i>
<i>Flavobacterium</i>		<i>Fusarium</i>
<i>Agrobacterium</i>		<i>Trichoderma</i>

Un sol contenant des hydrocarbures modifie l'activité des microorganismes. Les bactéries et les champignons connaissent alors une phase de croissance intense pendant laquelle ils assimilent les produits issus de la dégradation des hydrocarbures. Ce processus de bioremédiation peut s'étendre sur plusieurs mois. Une fois les composés les plus facilement dégradables consommés, leur population diminue jusqu'à retrouver un niveau normal. Parfois, les hydrocarbures se lient partiellement à la matière organique du sol, devenant ainsi moins accessibles aux microorganismes, ce qui limite la dégradation complète des polluants (**Bertrand et Mille, 1989**).

I.3.3.2. Microorganismes dépolluants l'eau

Avant d'identifier ces microorganismes, il est essentiel de comprendre les paramètres influençant leur croissance. Ces facteurs incluent : la localisation géographique, le type de bassin où les bactéries sont cultivées, les caractéristiques des eaux usées entrant dans la station, ainsi que les paramètres d'exploitation du système, tels que l'aération, l'agitation et l'injection de produits chimiques. Ces éléments provoquent des variations quantitatives entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes. Par exemple, dans les stations d'épuration municipales, les bactéries gram-négatif du type protéobactéries (21-65 %) dominent, avec une prédominance de la classe Betaproteobacteria, largement responsable de l'élimination des matières organiques et des nutriments. D'autres groupes importants incluent les Bacteroidetes, Acidobacteria et Chloroflexi (**Cydzik-Kwiatkowska et Zielińska, 2016**).

Parmi les champignons, les Ascomycètes sont les plus abondants, représentant 6,3 à 7,4 % des microorganismes. Viennent ensuite les archéobactéries, notamment les Euryarchaeota (1,5 % des microorganismes). De plus, en présence d'ammoniac et d'oxygène, les Nitrosomonas sont très présents. Enfin, un âge élevé des boues favorise la colonisation du milieu par les protozoaires et les rotifères (**Cydzik-Kwiatkowska et Zielińska, 2016**).

La température influence également la présence de certaines espèces. Ainsi, la situation géographique affecte la composition des espèces microbiennes. Par ailleurs, dans le contexte industriel, la dominance de microorganismes spécifiques s'explique par leur capacité à dégrader des composants particuliers des eaux usées industrielles (**Cydzik-Kwiatkowska et Zielińska, 2016**).

I.4. Types De Bioremédiation

I.4.1. Bioremédiation aérobie

La bioremédiation aérobie se produit pendant la respiration bactérienne, en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons terminal. Ce métabolisme utilise des enzymes monooxygénases ou dioxygénases pour attaquer les molécules en ajoutant de l'oxygène (**Mounier, 2013**).

Selon **Zhanpeng et al (2002)**, la bioremédiation aérobie des matières organiques telles que HAP est le degré auquel les micro-organismes modifient physiquement et chimiquement les matières organiques. Cela peut être affecté par la modification de l'un des facteurs suivants:

- ❖ Taux de dégradation des composés organiques.
- ❖ La quantité d'oxygène consommée.
- ❖ Produits résultant de dégradations.
- ❖ Activité microbiologique.

Le schéma suivant (**Figure 1**) montrent les processus de bioremédiation d'une substance organique en conditions aérobiees :

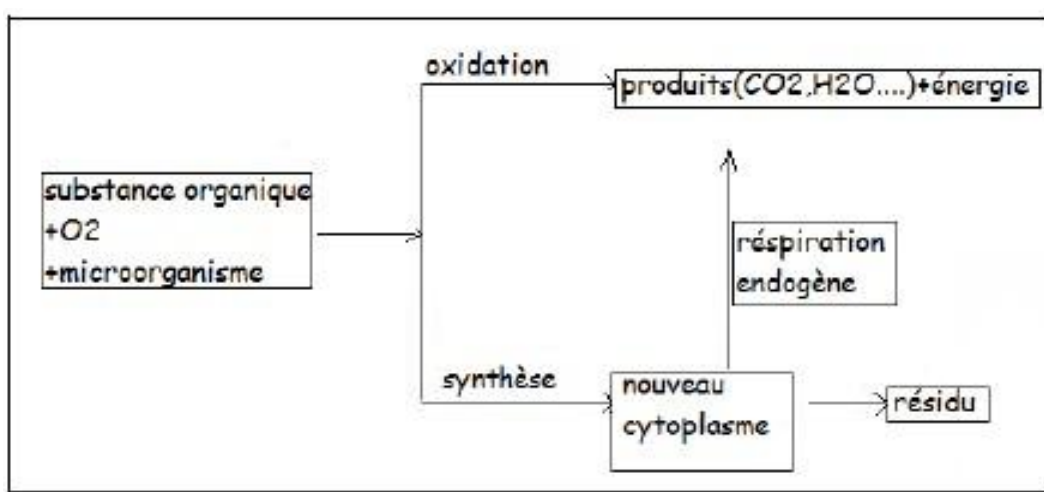


Figure 1: Dégradation aérobie de la matière organique (**Zhanpeng et al ., 2002**).

I.4.2. Bioremédiation anaérobie :

En absence d'oxygène, les bacteries metabolisent les HAP par voie anaerobie, mais beaucoup plus lentement qu'en aerobiose (**Martin, 2012**).

La bioremédiation anaérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes en conditions d'anaérobiose (**Aleksandra, 2010**).

Le schéma suivant (**Figure 2**) montre les processus de biodégradation que subit la matière organique en conditions anaérobies.

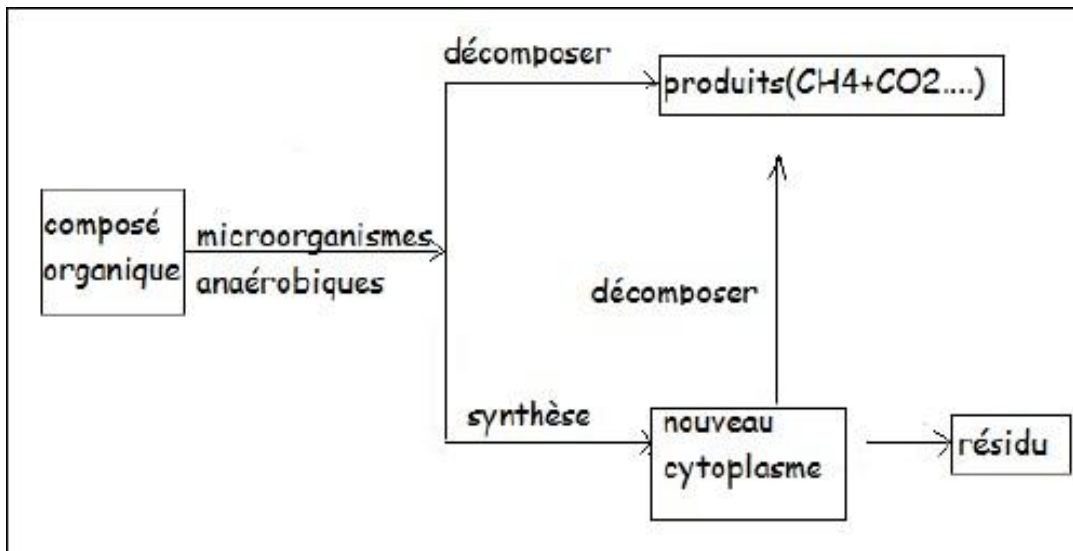


Figure 2: Dégradation anaérobie de la matière organique (Hongwei *et al.*, 2004).

I.5. Champ d'application de bioremédiation

Selon Peña (2016), le champ d'application de la bioremédiation est aujourd'hui très étendu, et chaque état de la matière peut être considéré comme un objet potentiel de bioremédiation :

- **Solide** : applications sur des milieux contaminés tels que les sols, les sédiments, les boues ou les déchets.
- **Liquide** : eaux de surface, eaux souterraines et eaux usées.
- **Gaz** : émissions industrielles, ainsi que les sous-produits issus du traitement des eaux ou des sols.

Une classification peut également être établie en fonction des types de polluants dégradables :

- **Hydrocarbures de tous types** : hydrocarbures aliphatiques, aromatiques comme les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes), hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), ainsi que les mélanges complexes tels que l'essence, le kérosène, le diesel, le fioul et le pétrole brut.
- **Hydrocarbures chlorés** : pesticides, herbicides, polychlorobiphényles (PCB), trichloréthylène (TCE), perchloréthylène (PCE) et autres composés similaires.
- **Composés nitroaromatiques** : trinitrotoluène (TNT) et autres dérivés.
- **Autres polluants** : composés organophosphorés, dioxines, cyanures, phénols et métaux lourds.

I.6. Technique de bioremediation

Selon le type d'application, il est possible de classer la biorémédiation comme un processus in situ ou ex situ, on distingue plusieurs processus :

I.6.1. Bioventing

Le bioventing implique une stimulation contrôlée du flux d'air, fournissant de l'oxygène pour augmenter l'activité microbienne et par conséquent, améliorer la biorémédiation (**Figure 3**). Habituellement, des nutriments et de l'humidité sont ajoutés pour obtenir la transformation en polluants plus inoffensifs pour l'environnement et pour améliorer l'assainissement. Cette technique a été utilisée avec succès dans l'assainissement de sols pollués par des produits pétroliers (**Da Silva et al ., 2020**).

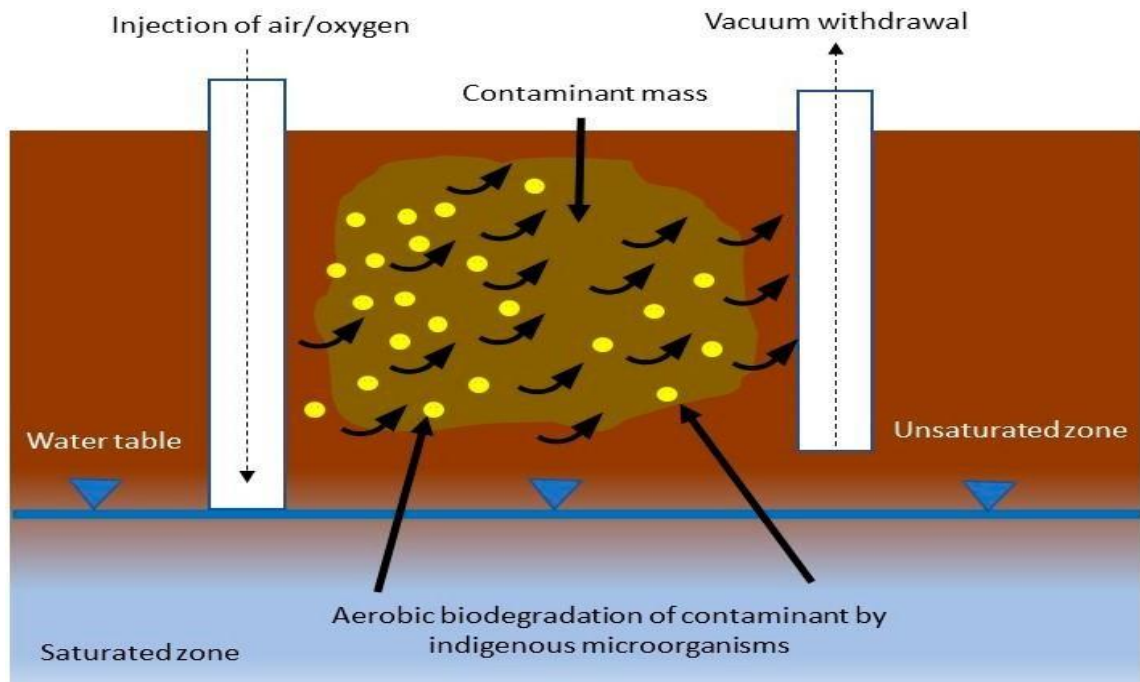


Figure 3: Système typique de bioventing (**Da Silva et al ., 2020**).

I.6.2. Biosparging

Dans le biosparging, l'air est introduit dans le sol pour favoriser la capacité de dégradation des micro-organismes. Contrairement au bioventing, l'air est introduit à l'intérieur de la zone saturée, ce qui provoque le mouvement ascendant des polluants volatils (**Figure 4**). L'efficacité du biosparging dépend de la perméabilité du sol qui détermine la disponibilité des polluants pour les microorganismes ainsi que la biodégradabilité des polluants (**Da Silva et al ., 2020**).

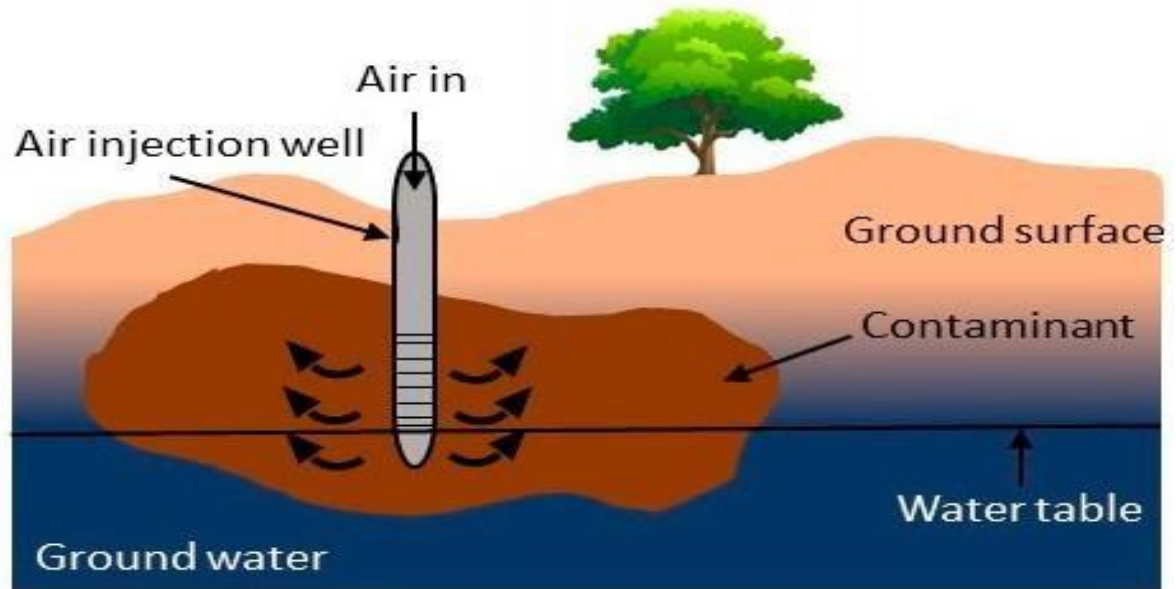


Figure 4: Système typique de biosparging (Da Silva *et al.*, 2020).

I.6.3. Bioaugmentation et biostimulation

Bioaugmentation

Dans la bioaugmentation, la microflore autochtone d'un site pollué est enrichie par l'ajout de microorganismes indigènes ou génétiquement modifiés, préalablement sélectionnés pour leur capacité à dégrader les polluants pétroliers. Cette méthode est particulièrement efficace lorsque les microorganismes indigènes ne parviennent pas à dégrader les contaminants (Da Silva *et al.*, 2020).

Biostimulation

La biostimulation consiste à stimuler la croissance des microorganismes indigènes en ajoutant des facteurs de croissance, tels que des nutriments (phosphore et azote). Cette approche présente l'avantage d'utiliser des microorganismes autochtones déjà bien adaptés à l'environnement et répartis sur le site. De plus, elle tient compte de la géologie du site, ce qui en fait une méthode adaptée aux conditions locales (Da Silva *et al.*, 2020).



Figure 5: Comparaison entre les techniques de bioaugmentation et de biostimulation (Da Silva *et al.*, 2020).

Les différences entre ces deux techniques, notamment en ce qui concerne l'ajout d'espèces sélectionnées et la présence de micro-organismes indigènes, sont décrites dans la (figure 5) (Da Silva *et al.*, 2020).

I.6.4. Biolixiviation

Solubilisation et entraînement dans la phase aqueuse par les microorganismes de polluants fixés ou piégés dans le sol ont appliqué cette méthode à des milieux contaminés par : Minerais, métaux lourds (Cu, Cr, Fe, Pb, Zn, Co), phosphore. (Vidali, 2001 ; Sharma, 2012).

I.6.5. Bioimmobilisation

Certains microorganismes ont la capacité d'immobiliser un ou plusieurs composants solubles (bactéries). Cette méthode a été appliquée à des milieux contaminés par des métaux, des produits pétroliers, etc. (Vidali, 2001 ; Sharma, 2012).

I.6.6. Biodégradation

Certains microorganismes peuvent transformer les polluants en substrats (source de carbone ou d'énergie). Cette méthode est utilisée pour décontaminer des milieux pollués par des hydrocarbures pétroliers (HAP, BTEX), des solvants industriels (TCE, PCE, PCB), des métaux lourds, etc. (Vidali, 2001 ; Sharma, 2012).

I.6.7. Biorestauration

Cette technique consiste à ajouter des nutriments (azote/phosphore) pour stimuler la croissance des microorganismes indigènes et favoriser la dégradation des polluants (Ademe, 2006).

I.6.8. Bioréacteur

Un bioréacteur crée une boue épaisse en mélangeant la partie fine du sol avec de l'eau et en ajoutant des nutriments pour stimuler la croissance microbienne. Cette méthode est considérée comme l'une des plus efficaces pour traiter les sols pollués, car les conditions de fonctionnement peuvent être contrôlées pour optimiser l'activité de biodégradation (**Ademe, 2006**).

I.6.9. Biopiles

Cette technique consiste à empiler le sol contaminé et à l'aérer pour favoriser la biodégradation en améliorant l'activité microbienne. Elle repose sur l'arrosage, l'aération et la lixiviation (**Ademe, 2006**).

I.6.10. Compostage

Le compostage est un procédé d'aération qui stimule la flore aérobie, optimisé par l'apport d'agents structurants (copeaux de bois, paille, fumier) et de populations fongiques capables de dégrader les xénobiotiques (**Ademe, 2006**).

I.7. Facteurs affectant la bioremédiation microbienne

La bioremédiation repose sur la capacité des bactéries, champignons, algues et plantes à dégrader, supprimer, modifier, immobiliser ou détoxifier divers polluants chimiques et physiques. Les voies métaboliques enzymatiques des microorganismes facilitent ces réactions biochimiques. L'efficacité de la bioremédiation dépend de plusieurs facteurs, notamment la nature chimique et la concentration des polluants, les caractéristiques physico-chimiques de l'environnement et leur accessibilité aux microorganismes (**El Fantroussi et Agathos, 2005**).

I.7.1. Facteurs biotiques ou biologiques

Les facteurs biotiques influencent la dégradation des composés organiques par les microorganismes. Ils incluent :

- L'activité enzymatique.
- Les interactions (compétition, succession, prédation).
- La mutation et le transfert horizontal de gènes.
- La croissance et la production de biomasse.
- La taille et la composition de la population microbienne (**Boopathy, 2000 ; Madhavi et Mohini, 2012**).

I.7.2. Facteurs abiotiques ou environnementaux

A. La température

La température influence l'activité métabolique des microorganismes. La plupart des bactéries se développent entre 20 et 30 °C (**Nait et Djenad, 2015**).

B. Le pH

Le pH affecte significativement l'activité microbienne. Les bactéries hétérotrophes préfèrent un pH de 6 à 8, tandis que les champignons prospèrent dans un pH plus acide (4 à 5) (Suarez, 2013).

C. L'humidité

Les microorganismes nécessitent un certain niveau d'humidité pour leur croissance. Une humidité excessive peut réduire la concentration d'oxygène, limitant ainsi la biodégradation (Suarez, 2013).

D. La structure et la nature du sol

La structure du sol influence l'activité microbienne. Les agrégats peuvent ralentir la diffusion de l'oxygène et des nutriments, tandis que la porosité du sol facilite l'injection de solutions nutritives et l'aération (Girard *et al.*, 2005 ; Nait et Djenad, 2015).

E. Les nutriments

Les microorganismes nécessitent des nutriments comme l'azote et le phosphore pour leur croissance. L'ajout de ces éléments stimule la population microbienne et accélère la biodégradation des hydrocarbures (Bireche et Berregui, 2014).

F. La teneur en oxygène

L'oxygène est essentiel pour les réactions d'oxydoréduction catalysées par les enzymes microbiennes (Suarez, 2013).

G. La biodisponibilité

La vitesse de dégradation dépend de la capacité de transport et du métabolisme microbien, ainsi que du transfert de masse des polluants. La biodisponibilité est influencée par des phénomènes comme l'adsorption, l'absorption, la désorption et la diffusion (Suarez, 2013).

H. La structure chimique

La biodégradabilité des hydrocarbures dépend de leur structure moléculaire. Les n-alcanes et les alcanes ramifiés (C10-C20) sont plus facilement dégradables, tandis que les HAP à 4 cycles ou plus sont plus récalcitrants (Suarez, 2013).

I.8. Avantages et inconvénients de la bioremédiation

I.8.1. Avantages

- Processus naturel et bien accepté par le public.
- Résidus inoffensifs (dioxyde de carbone, eau, biomasse).
- Destruction complète de nombreux contaminants.
- Élimination des risques de responsabilité liés à l'élimination des déchets.
- Pas de transfert de contaminants vers d'autres milieux.
- Peut être réalisée sur place, sans perturbation majeure.

- Coût souvent inférieur à d'autres technologies (**Vidali, 2001**).

I.8.2. Inconvénients

- Limité aux composés biodégradables.
- Risque de production de sous-produits plus toxiques.
- Spécificité des processus biologiques.
- Difficulté d'extrapolation des études en laboratoire à grande échelle.
- Nécessité de recherches pour les mélanges complexes de contaminants.
- Durée souvent plus longue que d'autres méthodes.
- Incertitudes réglementaires sur les critères de performance (**Vidali, 2001**).

I.9. Limites techniques de la bioremédiation

Selon Pierre et Vincent (2000), la bioremédiation rencontre des difficultés techniques liées à :

- La nature, la concentration et le volume des produits à traiter.
- L'adaptation des souches microbiennes indigènes.
- L'hétérogénéité de la dispersion des polluants dans le sol.
- Les modifications physico-chimiques du biotope (teneur en oxygène, température, dilution par les pluies).
- Les effets négatifs potentiels sur l'environnement (production de composés toxiques, destruction de la structure du sol).

Chapitre2 :

Les enzymes et leur mode d'action

II.1. Définition

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques indispensables à la vie. Ces macromolécules, dont la masse moléculaire varie entre 10 et 100 kDa, sont présentes dans toutes les cellules des organismes vivants. Elles jouent un rôle central dans les processus métaboliques en transformant les nutriments en énergie et en matériaux cellulaires (**Bergmeyer *et al.*, 1979 ; Pelmont, 1995 ; Drouin, 2005**).

Les enzymes fonctionnent en accélérant les réactions chimiques sans être consommées dans le processus. Elles sont hautement spécifiques, ce qui signifie qu'elles ne catalysent qu'une réaction particulière ou un groupe de réactions similaires. Cette spécificité est due à leur structure tridimensionnelle unique, qui permet à l'enzyme de se lier à un substrat spécifique et de faciliter sa transformation en produit.

En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes avaient été identifiées, et la structure d'environ 1300 d'entre elles avait été déterminée (**Patel *et al.*, 2005 ; Leisola *et al.*, 2001**). Ces découvertes ont ouvert la voie à des applications industrielles et biotechnologiques majeures, allant de la production alimentaire à la médecine en passant par la protection de l'environnement.

Applications industrielles des enzymes

Dans les procédés industriels, les enzymes sont privilégiées pour leur spécificité et leur efficacité. Elles permettent d'obtenir des effets précis avec peu de sous-produits indésirables, ce qui en fait des outils clés de la biotechnologie et de la bio-industrie (**Novo Nordsik, 1997 ; Arnaud *et al.*, 1993**).

Avantages des enzymes dans l'industrie

1. Spécificité élevée : Les enzymes ciblent des substrats spécifiques, réduisant ainsi la formation de sous-produits indésirables.
2. Conditions douces : Elles fonctionnent à des températures et des pH modérés, ce qui réduit la consommation d'énergie et les coûts de production.
3. Respect de l'environnement : Les enzymes sont biodégradables et ne produisent pas de déchets toxiques, contrairement à de nombreux produits chimiques industriels.
4. Rentabilité : Bien que les enzymes puissent être coûteuses à produire, leur efficacité et leur réutilisation potentielle en font des options économiques à long terme (**Sandhya *et al.*, 2005a**).

Exemples d'applications industrielles

- Industrie alimentaire : Les enzymes sont utilisées pour la production de fromages (chymosine), la clarification des jus de fruits (pectinases), et l'amélioration de la texture des produits de boulangerie (amylases).

- Détergents : Les protéases et lipases sont ajoutées aux détergents pour décomposer les taches de protéines et de graisses.

- Bioénergie : Les cellulases et les amylases sont utilisées pour convertir la biomasse en biocarburants.

- Médecine : Les enzymes sont utilisées dans les diagnostics médicaux et comme agents thérapeutiques, par exemple dans le traitement des maladies métaboliques.

II.2. Sources d'enzymes

Le choix de la source est une étape cruciale dans la production d'enzymes. Bien que certaines activités enzymatiques ne soient disponibles que dans une source unique, la plupart peuvent être obtenues à partir de plusieurs sources (**Walsh et Headon, 1994**).

II.2.1. Source microbienne

Les microorganismes, notamment les bactéries et les champignons, sont les sources les plus couramment utilisées pour la production d'enzymes. Ils présentent plusieurs avantages :

- Croissance rapide : Ils peuvent être cultivés en grande quantité en peu de temps grâce aux techniques de fermentation.

- Diversité enzymatique : Ils produisent une grande variété d'enzymes adaptées à des applications industrielles spécifiques.

- Modification génétique : Les microorganismes peuvent être génétiquement modifiés pour produire des enzymes plus efficaces ou plus stables (**Walsh et Headon, 1994**).

II.2.2. Source végétale

Les plantes ne sont généralement pas considérées comme des sources idéales d'enzymes industrielles en raison de leur croissance saisonnière et géographiquement limitée. De plus, la plupart des enzymes végétales sont intracellulaires, ce qui complique leur extraction et leur utilisation à grande échelle (**Walsh et Headon, 1994**).

Cependant, certaines enzymes végétales, comme la bromélaïne (extraite de l'ananas) et la papaïne (extraite de la papaye), sont utilisées dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique pour leurs propriétés protéolytiques.

II.2.3. Source animale

Certaines enzymes importantes sont traditionnellement extraites de tissus animaux ou de leurs sécrétions. Par exemple, la chymosine, une enzyme dérivée de l'estomac des jeunes

ruminants, est largement utilisée dans l'industrie fromagère pour coaguler le lait. Elle est également utilisée en thérapie digestive (Walsh et Headon, 1994).

II.3. Marché des enzymes

L'industrie des enzymes a connu une croissance spectaculaire au cours des dernières décennies. En 1982, le marché des enzymes industrielles était estimé à 375 millions de dollars canadiens. Ce chiffre est passé à 720 millions en 1990, puis à 1 milliard en 1994, et a atteint 1,92 milliards de dollars canadiens en 1996 (Arnaud *et al.*, 1993 ; Aviron-Violet *et al.*, 1982 ; Novo Nordisk, 1997).

En 2000, le marché global des enzymes industrielles et de spécialité était estimé à plus de 1,5 milliard de dollars américains. Selon les prévisions, il devrait atteindre 6 milliards de dollars d'ici 2011 (Kumar *et al.*, 2008b).

Concurrence et défis actuels

Aujourd'hui, la concurrence dans le secteur des enzymes industrielles est intense, entraînant une baisse des prix et une pression accrue sur les coûts de production. La capacité à produire des enzymes à faible coût est donc devenue un enjeu majeur. Par ailleurs, dans la plupart des applications industrielles, les enzymes ne représentent qu'une petite fraction (0,5 à 5 %) de la valeur du produit final, ce qui souligne l'importance de leur efficacité et de leur rentabilité (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

Perspectives d'avenir

L'industrie des enzymes continue d'évoluer grâce aux avancées technologiques, notamment dans les domaines de la génétique et de la biotechnologie. Les enzymes génétiquement modifiées ouvrent de nouvelles possibilités pour des applications plus spécifiques et plus efficaces. Par exemple, des enzymes capables de fonctionner dans des conditions extrêmes (températures élevées, pH acides ou basiques) sont développées pour des procédés industriels spécialisés.

De plus, la demande croissante pour des solutions durables et respectueuses de l'environnement stimule l'innovation dans ce secteur. Les enzymes jouent un rôle clé dans la transition vers une économie verte, notamment dans les domaines de la production d'énergie renouvelable, du traitement des déchets et de la chimie verte.

Applications émergentes

- **Bioremédiation** : Les enzymes sont utilisées pour décomposer les polluants environnementaux, tels que les hydrocarbures et les pesticides.

- **Médecine personnalisée** : Les enzymes sont utilisées pour développer des traitements ciblés pour des maladies spécifiques.

- **Agriculture durable** : Les enzymes sont intégrées dans les engrais et les produits phytosanitaires pour améliorer l'efficacité des cultures tout en réduisant l'impact environnemental.

En conclusion, les enzymes sont des acteurs essentiels dans de nombreux secteurs industriels et biologiques. Leur potentiel reste largement inexploité, et leur marché devrait continuer à croître à mesure que de nouvelles applications sont découvertes et développées.

II.4. Classification des enzymes

Les enzymes sont classées en fonction des réactions qu'elles catalysent, on distingue six familles (tab1)

Tableau 4 : Différentes classes d'enzyme (Pierre Feillet, 2000).

Classe	Réactions catalysées
EC 1 Oxydo-réductases	Oxydo-réduction (transfert d'oxygène)
EC 2 Transférases	Transfert de groupes fonctionnels
EC 3 Hydrolases	Coupage d'une molécule avec fixation d'eau (hydrolyse)
EC 4 Lyases	Coupage autre que l'hydrolyse
EC 5 Isomérases	Remaniement interne d'une molécule
EC 6 Ligases	Synthèses de nouvelles molécules par addition d'éléments

II.5. Les activités enzymatiques

II.5.1. Les enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques : catalyseurs de l'hydrolyse des protéines

Les enzymes protéolytiques, également appelées protéases ou protéinases, appartiennent à la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). Elles catalysent l'hydrolyse des protéines en clivant les liaisons peptidiques qui relient les acides aminés dans une chaîne polypeptidique. Ces enzymes peuvent être produites à la fois de manière extracellulaire et intracellulaire (**Kumar et al., 2008b**).

Les protéases sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, une stratégie qui protège la cellule contre une activité enzymatique prématurée et potentiellement dommageable (**Pelmont, 1995**). Elles remplissent une multitude de fonctions physiologiques, allant de la digestion générale des protéines à des processus de régulation plus spécifiques, tels que la modulation de l'activité d'autres protéines ou la participation à des voies de signalisation cellulaire (**Kumar et al., 2008a**).

Préférence pour les protéases microbiennes

Les protéases microbiennes sont privilégiées dans les applications industrielles en raison de leurs caractéristiques avantageuses. Elles sont produites par une grande variété de microorganismes, notamment des bactéries (comme les actinomycètes), des moisissures et des levures (**Devi et al., 2008**). Ces enzymes représentent environ 40 % du marché mondial des

enzymes, ce qui témoigne de leur importance économique et industrielle (**Sandhya et al., 2005b**).

Avantages des protéases microbiennes

- Stabilité : Elles sont souvent stables dans des conditions extrêmes de température et de pH.
- Spécificité : Elles peuvent être sélectionnées pour cibler des substrats spécifiques.
- Production à grande échelle : Les microorganismes peuvent être cultivés rapidement et à moindre coût.

II.5.1.1. Applications industrielles des protéases

Les protéases occupent une place prépondérante dans le marché des enzymes industrielles. Elles sont utilisées dans divers secteurs, allant de l'industrie alimentaire à la médecine en passant par les détergents et les tanneries.

Les protéases jouent un rôle crucial dans l'industrie alimentaire, où elles sont utilisées pour améliorer la texture, la saveur et la qualité nutritionnelle des produits.

➤ **Boulangeries**

Dans l'industrie de la boulangerie, les protéases sont utilisées pour modifier les propriétés de la pâte. Par exemple, les protéases d'*Aspergillus oryzae* hydrolysent le gluten, une protéine insoluble présente dans la farine de blé, ce qui facilite la manipulation de la pâte et permet la production d'une variété de produits de boulangerie. Les protéases d'origine bactérienne sont également utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (**Rao et al., 1998**).

➤ **Fromageries**

La fabrication du fromage est l'une des applications les plus anciennes et les plus importantes des protéases. Traditionnellement, la présure (extraite de l'estomac des jeunes ruminants) était utilisée pour coaguler le lait. Cependant, en raison des fluctuations de prix et de la disponibilité limitée de la présure, les protéases microbiennes produites par des microorganismes GRAS (Generally Recognized As Safe) comme *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* et *Endothia parasitica* sont de plus en plus utilisées (**Aviron-Violet et al., 1982**).

➤ **Synthèse de l'aspartame**

L'aspartame, un édulcorant artificiel, est synthétisé à l'aide de protéases. La thermolysine, une enzyme produite par *Bacillus thermoproteolyticus*, est utilisée pour catalyser la réaction de synthèse de l'aspartame. Cette méthode enzymatique est préférée aux méthodes chimiques en raison de sa capacité à maintenir la configuration stéréochimique nécessaire pour le goût sucré (**Rao et al., 1998**).

➤ **Préparation de produits à base de soja**

Les protéases sont utilisées pour modifier les protéines de soja, améliorant ainsi leurs propriétés fonctionnelles et nutritionnelles. Par exemple, la protéase alcalase est utilisée pour produire des hydrolysats de protéines solubles, qui sont ensuite incorporés dans des jus de fruits et des aliments diététiques (**Rao et al., 1998**).

II.5.1.2. Domaine pharmaceutique et médical

Les protéases ont des applications variées en médecine et en pharmacologie. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme suppléments digestifs pour les personnes souffrant de déficits enzymatiques. Des collagénases, produites par *Clostridium* sp., sont utilisées pour traiter les brûlures et les plaies, tandis que l'asparaginase, produite par *E. coli*, est utilisée dans le traitement de certaines formes de leucémie (**Rao et al., 1998 ; Gupta et al., 2002**).

II.5.1.3. Détergents

Les protéases sont des ingrédients clés dans les détergents domestiques et industriels. Elles dégradent les taches de protéines, améliorant ainsi l'efficacité du nettoyage. Les protéases utilisées dans les détergents doivent être stables à des températures élevées et à des pH alcalins. Les souches de *Bacillus* sont couramment utilisées pour produire ces enzymes (**Kumar et al., 2008b**).

II.5.1.4. Tanneries

Dans l'industrie du cuir, les protéases sont utilisées pour éliminer les poils et la laine des peaux animales. Bien que l'utilisation de protéases soit plus coûteuse que celle des produits chimiques traditionnels, elle offre des avantages environnementaux et qualitatifs (**Laxman et al., 2005**).

II.5.1.5. Autres applications

Les protéases sont également utilisées pour le traitement des déchets riches en protéines, le décreusage de la soie naturelle et la récupération de l'argent à partir de films photographiques (**Dalev, 1994 ; Sumantha et al., 2006**).

II.5.2. Les enzymes amylolytiques

Les amylases sont des enzymes capables d'hydrolyser les molécules d'amidon en une variété de produits, tels que les dextrans et les polymères composés de petites unités de glucose, produisant ainsi un sirop riche en fructose, glucose et maltose. Ces enzymes hydrolysent l'amidon (amylose et amylopectine) en dégradant ses produits en dextrans et oligosaccharides. Les amylases jouent un rôle majeur dans des applications biotechnologiques, notamment dans les industries alimentaire, de fermentation et textile. Environ 25 % des amylases sur le marché mondial sont utilisées dans l'industrie papetière. Elles peuvent provenir de plantes, d'animaux ou

de microorganismes, mais les amylases microbiennes sont les plus demandées en raison de leur adaptabilité industrielle (Janaki, 2017).

II.5.2.1. Applications de l' α -amylase

Les α -amylases microbiennes sont largement utilisées dans divers procédés industriels.

II.5.2.1.1. Utilisation dans les industries agro-alimentaires

➤ Glucoserie

L'industrie de la glucoserie utilise des α -amylases bactériennes ou fongiques pour dégrader l'amidon, un substrat complexe, en produits plus simples comme le glucose et le maltose (Martin *et al.*, 2003).

➤ Sucrierie

Dans l'industrie sucrière, les α -amylases facilitent l'extraction et le raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre en éliminant les traces d'amidon. Elles sont également utilisées pour produire des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et des sirops de chocolat (Martin *et al.*, 2003).

➤ Panification et biscuiterie

Les α -amylases, notamment celles d'*Aspergillus oryzae*, sont utilisées comme améliorants de panification pour réguler l'activité diastasique des farines. Elles dégradent l'amidon en maltose, améliorant ainsi la texture de la mie, des gâteaux et des biscuits, tout en optimisant le processus de fabrication (Malhotra *et al.*, 2000).

➤ Industrie des boissons

Les α -amylases sont utilisées dans la production d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées et de jus de fruits. En brasserie, elles permettent de produire des bières sans dextrines (Mamo *et al.*, 1999).

II.5.2.2. Domaine pharmaceutique et médical

Les α -amylases sont utilisées comme agents anti-inflammatoires et comme aides digestives pour prévenir les dyspepsies et les fermentations intestinales. Elles sont également utilisées comme marqueurs diagnostiques pour détecter des maladies comme l'insuffisance cardiaque, les oreillons et le cancer du pancréas (Merabti, 2006 ; Yihan *et al.*, 2010 ; Lo *et al.*, 2001 ; Benaouida, 2008).

II.5.2.3. Autres utilisations

Les α -amylases sont employées dans l'industrie textile pour le désencollage des tissus, dans la tannerie, la papeterie et les détergents pour éliminer les taches d'amidon. Elles sont également

utilisées dans le traitement des eaux résiduaires pour dégrader l'amidon (Benaouida, 2008 ; Merabti, 2006).

Tableau 5 : Différentes applications des alpha-amylases

Industrie	Application
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon, accompagné d'une importante de la viscosité (liquéfaction) (Alais <i>et al.</i> , 2008).
Sucrierie	Réduction de la viscosité des sirops de canne à sucre, en hydrolysant les contaminants amylacés pour assurer le processus de cristallisation (van der <i>et al.</i> , 2002).
Biscuiterie panification	Amélioration des propriétés rhéologique et fermentaires de la pâte, ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croûte (Pandey <i>et al.</i> , 2000).
Papeterie	Liquéfaction de l'amidon pour préparer la sauce de couchage permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille (Tolan, 1996).
Détergent	Dégradation des taches à base d'amidon, les oligosaccharides et les dextrans libérés de l'action hydrolytique sont solubles, ce qui facilite le découpage physique de la tâche (Kotwitz <i>et al.</i> , 1994).
Industrie pharmaceutique	Traitement de diabète et de l'obésité (Nielsen <i>et al.</i> , 2001).

II.5.3. Les enzymes lipolytiques

Les triacylglycérol-hydrolases ou les lipases sont des enzymes atypiques vu leurs mécanismes d'action et leurs spécificités de substrats. Selon le milieu réactionnel de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique (fig02) (Mukhtar *et al.*, 2017).

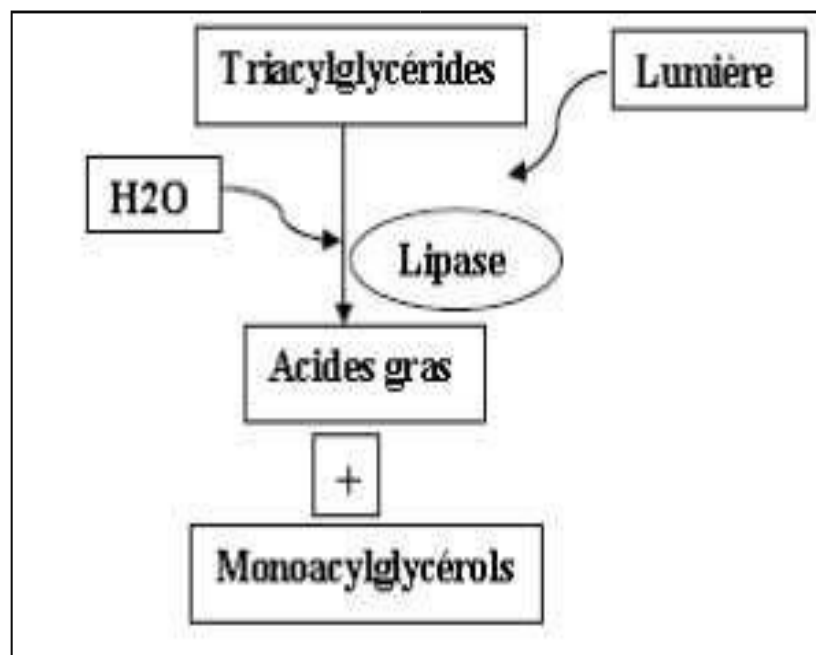


Figure 1 : Catabolisme des triglycérides (Mukhtar *et al.*, 2017).

Les lipases microbiennes présentent plusieurs avantages par rapport aux lipases d'origine animale, notamment des procédés de fabrication simples, une grande stabilité face à la température, aux détergents et aux enzymes protéolytiques. Elles sont utilisées dans le traitement des huiles et graisses, les cosmétiques, les diagnostics et les détergents. Ces caractéristiques ont

permis le développement de nombreuses applications industrielles, faisant des lipases microbiennes une classe importante d'enzymes d'intérêt en recherche fondamentale et appliquée (Patrick *et al.*, 2008 ; Geraldine *et al.*, 2009).

II.5.3.1. Applications dans l'industrie agro-alimentaire

Les lipases microbiennes sont utilisées pour développer des saveurs dans les produits laitiers (fromages, beurre, margarine, boissons alcooliques, chocolat au lait et bonbons) en hydrolysant sélectivement les triglycérides pour libérer des acides gras, qui agissent comme arômes ou précurseurs d'arômes. Elles sont également utilisées en boulangerie, biscuiterie, chocolaterie et dans la fabrication de produits laitiers ou fermentés, ainsi que pour la maturation des fromages et des charcuteries (Najjar, 2010 ; Hasan *et al.*, 2006).

Les lipases sont également employées dans l'inter-estérification des huiles et graisses pour produire des acylglycérols modifiés, impossibles à obtenir par des procédés chimiques conventionnels (Sharma *et al.*, 2001 ; Fickers *et al.*, 2008).

II.5.3.2. Applications dans les détergents

Les lipases sont largement utilisées dans les détergents pour éliminer les taches d'huile et de graisse. Elles fragmentent les taches en petites particules, facilitant leur élimination lors du lavage. Cette application est particulièrement importante pour les textiles modernes qui nécessitent des lavages à basse température (Najjar, 2010 ; Sharma *et al.*, 2001 ; Fickers *et al.*, 2008).

II.5.3.3. Applications en bioremédiation

Les lipases sont utilisées pour traiter les milieux aquatiques et les sols contaminés par des huiles minérales. Elles réduisent la charge lipidique dans les effluents industriels et participent à la dégradation des hydrocarbures dans les sols pollués, faisant de la bioremédiation une méthode privilégiée pour restaurer les environnements contaminés (Najjar, 2010 ; Gandhi, 1997 ; Hasan *et al.*, 2006).

II.5.3.4. Applications en tannerie

En tannerie, les lipases sont utilisées pour éliminer les graisses sous-cutanées des peaux avant le tannage. Elles réduisent la quantité de surfactants et de détergents nécessaires, contribuant à produire des peaux plus souples et élastiques (Fickers *et al.*, 2008).

II.5.3.5. Applications dans l'industrie du papier

Les lipases sont utilisées pour contrôler la formation de poix, un mélange collant de résine et de goudrons végétaux qui nuit à la qualité du papier. En hydrolysant les esters de sitostérol, les lipases améliorent la qualité du papier et sont utilisées à grande échelle dans l'industrie papetière (Sharma *et al.*, 2001 ; Hasan *et al.*, 2006 ; Singh *et al.*, 2012).

II.6. Étude des paramètres influençant l'activité enzymatique

L'activité enzymatique et la stabilité des enzymes peuvent être affectées par divers facteurs externes.

II.6.1. La température

Une augmentation excessive de la température peut dénaturer la structure tertiaire des enzymes, réduisant ainsi leur activité catalytique (Jarrar, 2011).

II.6.2. Le pH

Le pH influence la structure des enzymes. Des modifications des charges des chaînes latérales des acides aminés peuvent entraîner la dénaturation et la désactivation de l'enzyme (Wallach, 1997). La plupart des enzymes ne sont actives que dans un domaine de pH bien défini. L'évolution de l'activité enzymatique en fonction du pH est une courbe de Gauss, ayant une évolution similaire à celle de la température (Fig04). (Jarrar, 2011).

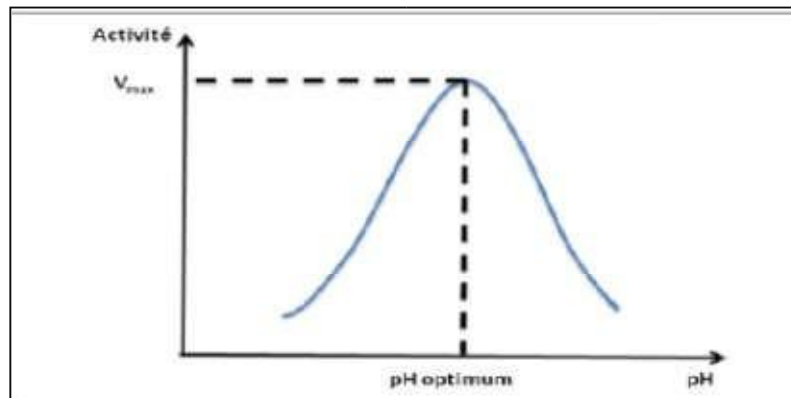


Figure 2 : Effet du pH sur l'activité enzymatique (Jarrar, 2011).

II.6.3. La concertation en substrat

Les réactions enzymatiques sont traitées comme s'il n'y avait qu'un seul substrat et un seul produit. Bien que cela soit le cas de quelque réaction catalysée par des enzymes, la plupart de ces réactions comportent deux substrats ou plus et deux produit ou plus. Cependant malgré cette considération la discussion reste valable.

Si on augmente la concentration du substrat [S] en maintenant constante toutes les autres conditions, la vitesse initiale mesurée (V_i : vitesse mesurée quand une très petites quantité du substrat réagit) augmente jusqu'à une valeur maximale (V_{max}). Donc, la vitesse augmente avec l'augmentation de la concentration en substrat jusqu'à un point où l'enzyme est dite « saturée » par le substrat, la vitesse (Benmedjahed et Bengrine, 2017).

Partie 2 :

Application des enzymes dans la bioremédiation

Chapitre 3

Enzymes utilisées dans la bioremédiation

La bioremédiation repose sur l'utilisation d'organismes vivants, notamment les microorganismes et leurs enzymes, pour éliminer ou neutraliser les polluants présents dans l'environnement. Les enzymes catalysent des réactions biochimiques spécifiques qui permettent de transformer des contaminants toxiques en composés moins nocifs, voire inoffensifs. En effet, leur capacité à agir de manière ciblée sur des substrats variés en fait des outils précieux pour le traitement durable de la pollution. Ce chapitre explore en détail les principales catégories d'enzymes utilisées en bioremédiation : les oxydoréductases, les hydrolases et les lyases, ainsi que d'autres enzymes spécifiques. L'objectif est de comprendre leurs mécanismes d'action, leurs domaines d'application, leurs avantages, ainsi que les limites et perspectives de leur utilisation industrielle et environnementale.

III.1. Les oxydoréductases

III.1.1. Définition et mécanisme d'action

Les oxydoréductases sont des enzymes qui catalysent les réactions d'oxydoréduction, c'est-à-dire le transfert d'électrons entre molécules. Elles sont essentielles pour transformer des composés chimiques toxiques en formes plus stables ou biodégradables. Ces enzymes interviennent principalement dans la dégradation des composés aromatiques, phénoliques et des hydrocarbures. Elles fonctionnent souvent avec des cofacteurs comme le NADH ou le FAD qui facilitent le transfert d'électrons. (Gianfreda *et al.*, 2020)

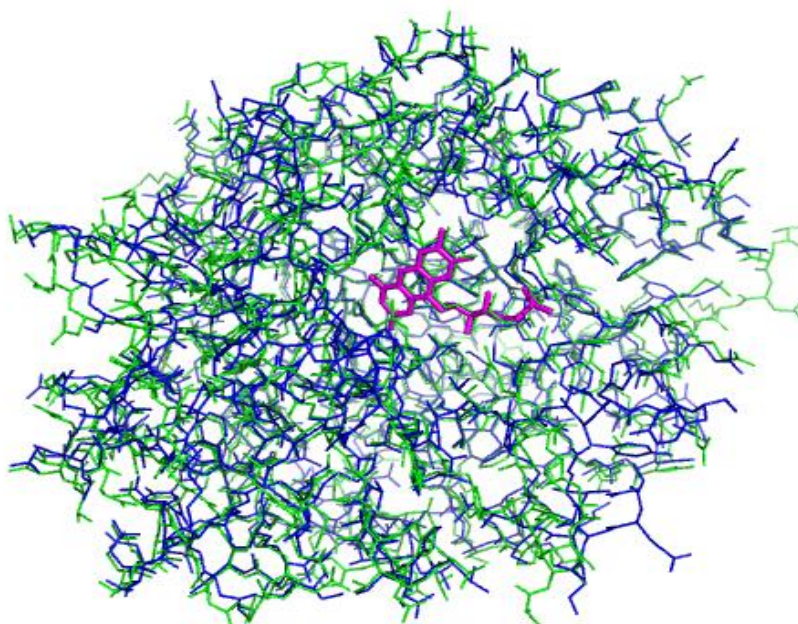


Figure 3 : Isomères de la 12-oxophytodiénoate réductase OPR3 (bleu) et OPR1 (vert) avec le cofacteur FMN (rose).

Source : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Oxydor%C3%A9ductase>

III.1.2. Types d'oxydoréductases impliquées

- **Laccases** : Ces enzymes multicopper oxydent une large gamme de substrats phénoliques et non phénoliques, jouant un rôle central dans la dégradation des colorants textiles, des lignines, et des pesticides.

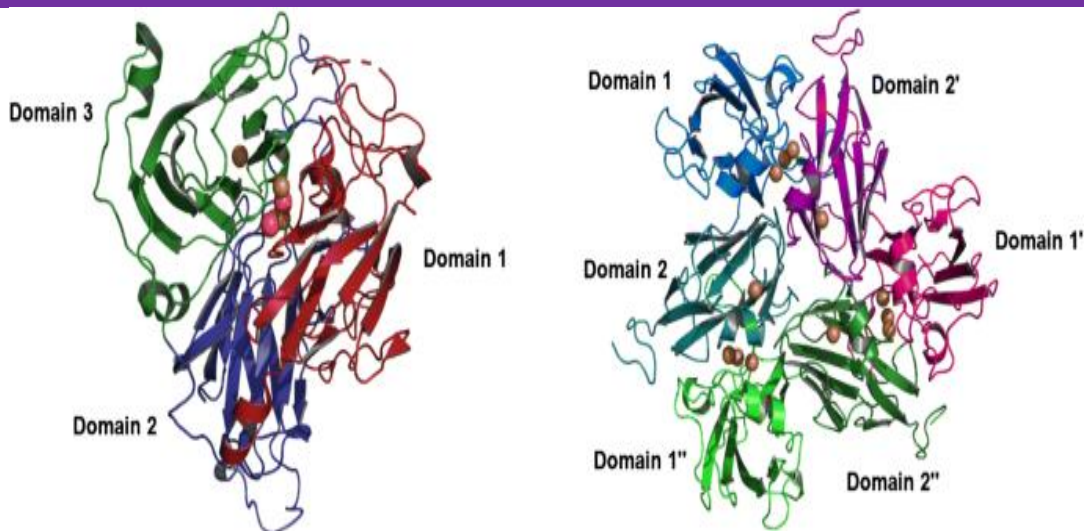


Figure 4 : Cartoon structures of the three-domain laccase from *Bacillus subtilis* (PDB 1GSK) and the homotrimeric two-domain laccase from *Streptomyces coelicolor* (PDB 3CG8). The domain assignments were made using the SWORD partition algorithm

Source : Leticia Arregui .et autres. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation Arregui *et al.* Microb Cell Fact (2019) 18:200

Peroxydases : Utilisent le peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électrons pour oxyder des phénols et des hydrocarbures. Elles sont employées dans la dépollution des eaux usées industrielles.

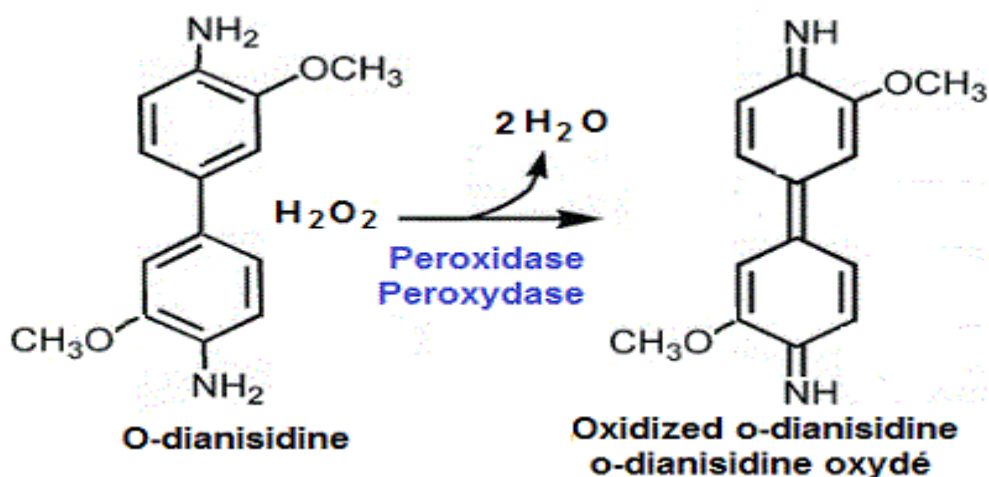


Figure 5 : Peroxydases

Source : <https://www.takween.com/etudiants-etudes/peroxydase-cinetique-structure-TP.html>

• **Dioxygénases** : Introduisent des atomes d'oxygène dans des structures aromatiques, facilitant ainsi leur clivage et leur transformation. (Gianfreda *et al.*, 2020)

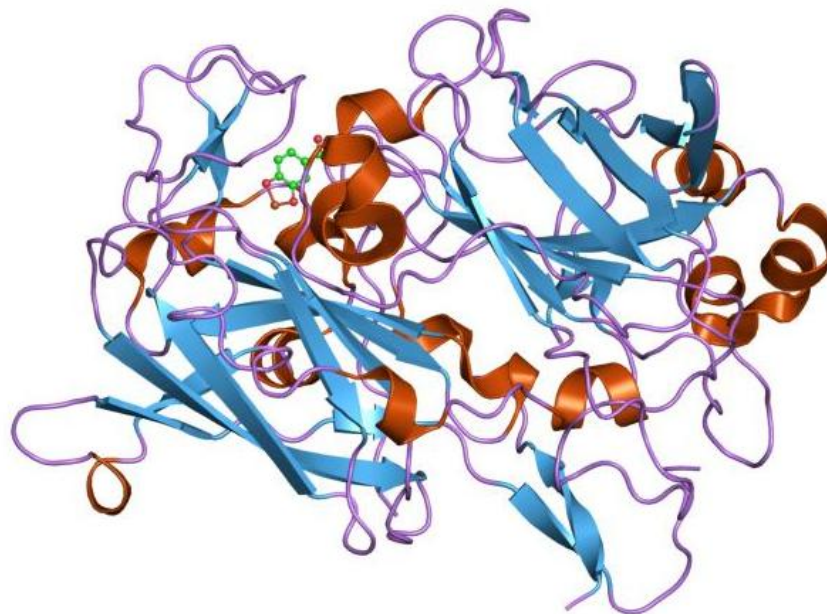


Figure 6 : Structure cristallisée à 2,2 Å d'une protocatéchuate 3,4-dioxygénase d'Acinetobacter baylyi (en) ADP1 complexée avec du 3,4-dihydroxybenzoate (PDB 1EOB)

Source : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Dioxyg%C3%A9nase>

III.1.3. Applications environnementales spécifiques

Les oxydoréductases sont utilisées dans la dépollution des sols et des eaux contaminés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), et les pesticides. Leur application permet une réduction significative de la toxicité et de la persistance des polluants. (Gianfreda *et al.*, 2020)

III.1.4. Avantages et limites

Elles présentent une activité élevée à faible concentration de substrat et dans des conditions variées. Cependant, elles peuvent être sensibles aux paramètres environnementaux (pH, température, présence de métaux lourds) ce qui limite parfois leur efficacité in situ. (Gianfreda *et al.*, 2020)

III.2. Les hydrolases

III.2.1. Définition et rôle catalytique

Les hydrolases catalysent la rupture des liaisons chimiques par ajout d'une molécule d'eau. Elles sont essentielles pour décomposer les polymères organiques complexes en unités plus simples, facilitant ainsi leur biodégradation. (Joutey *et al.*, 2013)

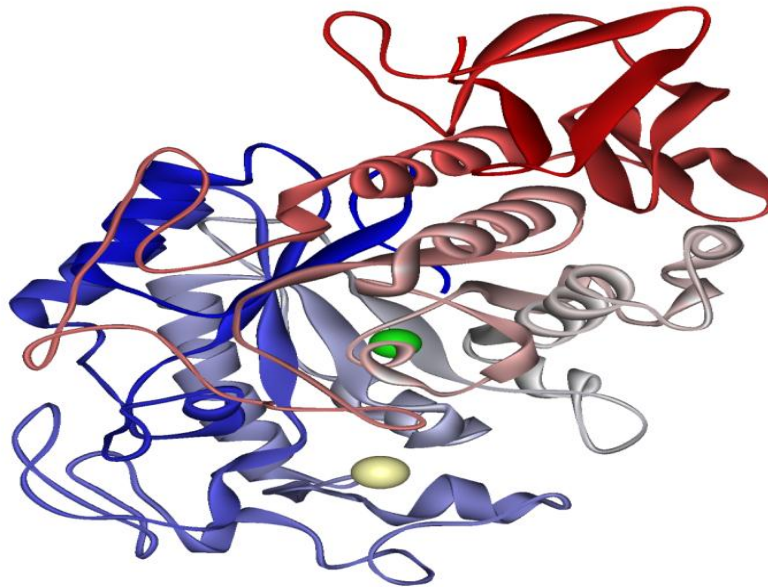


Figure 7 : L'alpha-Amylase pancréatique 1HNY, une glycoside hydrolase

Source : https://fr.wikipedia.org/wiki/Glycoside_hydrolase

III.2.2. Principaux types d'hydrolases utilisés

- **Estérases** : Hydrolysent les esters présents dans divers plastifiants et solvants.

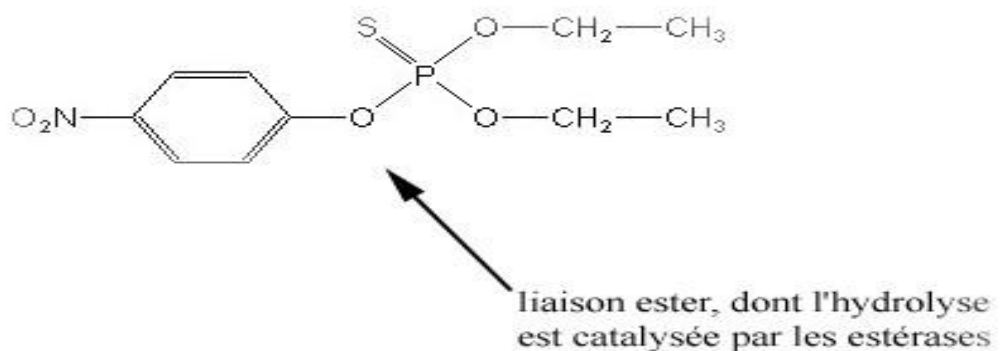


Figure 8 : Estérases

Source : [https://acces.ens-](https://acces.ens-lyon.fr/biotic/evolut/mecanismes/moustiques/html/testfiltreesterase.htm)

[lyon.fr/biotic/evolut/mecanismes/moustiques/html/testfiltreesterase.htm](https://acces.ens-lyon.fr/biotic/evolut/mecanismes/moustiques/html/testfiltreesterase.htm)

- **Lipases** : Dégradent les graisses et huiles dans les rejets industriels.



Figure 9 : Lipases

Source : <https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/2664/lipase>

- **Protéases** : Ciblent les protéines présentes dans les déchets organiques.

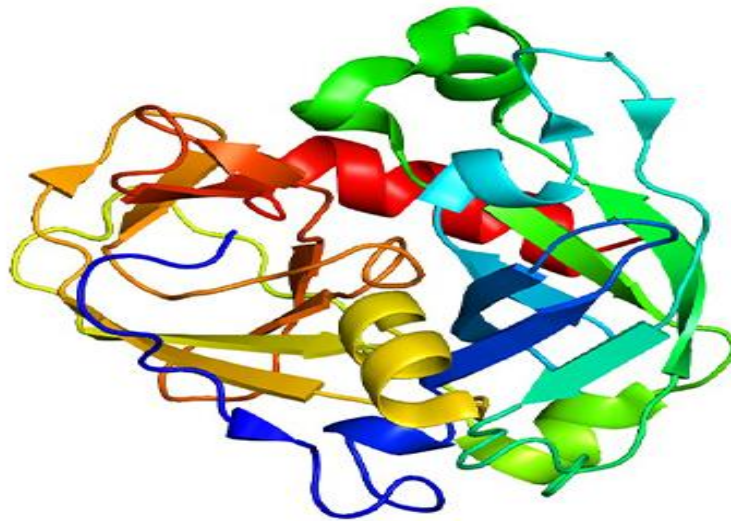


Figure 10 : Protéases

Source : <https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/2664/lipase>

- **Amylases** : Agissent sur les polysaccharides comme l'amidon pour les transformer en sucres simples. (Joutey *et al.*, 2013) .

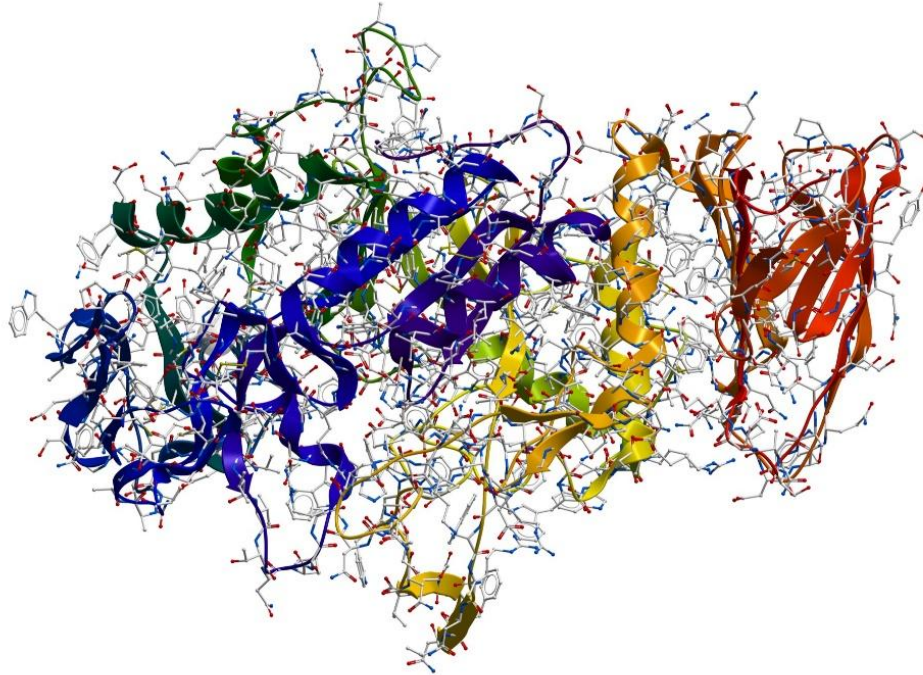


Figure 11 : Amylases

Source : <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-amylase-648/>

III.2.3. Cas d'usage dans la décontamination

Les hydrolases sont utilisées dans le traitement des déchets agroalimentaires, des huiles industrielles et des composés biodégradables présents dans les eaux usées. Leur efficacité dépend de la compatibilité enzyme-substrat et des conditions environnementales. (Joutey *et al.*, 2013)

III.2.4. Perspectives d'amélioration par ingénierie enzymatique

Grâce au génie génétique et à l'évolution dirigée, il est possible de produire des hydrolases plus robustes, spécifiques et stables, adaptées aux environnements extrêmes ou aux substrats récalcitrants. (Joutey *et al.*, 2013)

III.3. Les lyases et autres enzymes spécifiques

III.3.1. Mécanismes d'action des lyases

Les lyases catalysent la rupture de liaisons chimiques (C–C, C–O, C–N) sans hydrolyse ni oxydation, produisant souvent des doubles liaisons. Leur action est essentielle pour la dégradation de certaines molécules complexes et polluantes. (Purnomo *et al.*, 2011)

III.3.2. Exemples d'enzymes spécifiques

- **Déhalogénases** : Suppriment les atomes d'halogène (Cl, Br, F) dans les polluants halogénés, rendant les molécules plus biodégradables.

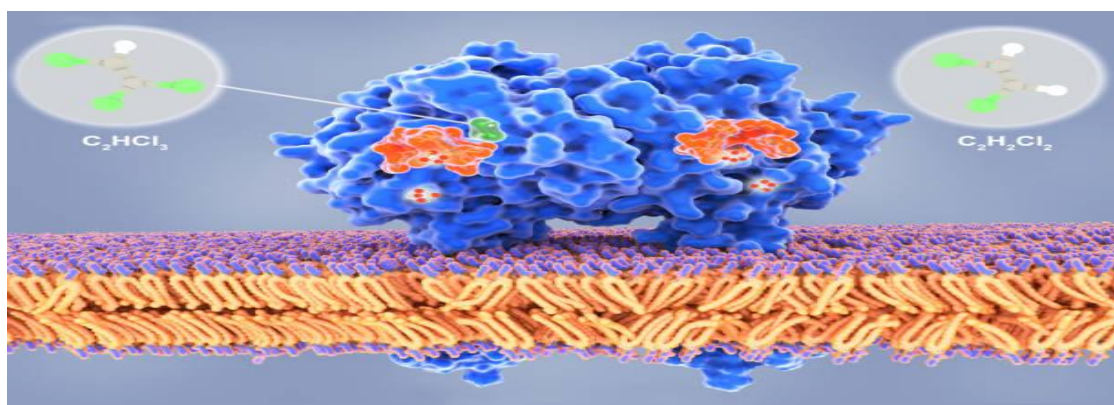


Figure 12 : Déhalogénases.

Source : <https://sciencephotogallery.com/>

- **Décarboxylases** : Enlèvent des groupes carboxyle, modifiant la solubilité et la réactivité des polluants.

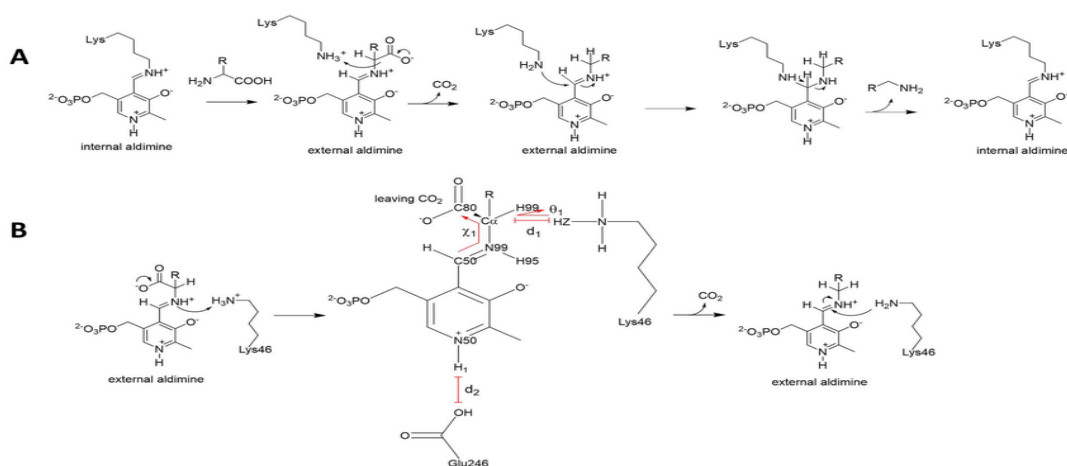


Figure 13 : available via license: Creative Commons Attribution 4.0 International

Source : https://www.researchgate.net/figure/Schematic-reaction-mechanism-of-PLP-dependent-decarboxylases-and-definition-of-reactive_fig1_353241726

• **Monooxygénases** : Insèrent un atome d'oxygène dans des composés stables, préparant leur dégradation ultérieure. (Purnomo *et al.*, 2011)



Jmol

Figure 14 : Monooxygenase

Source : <https://en.wikipedia.org/wiki/Monooxygenase>

III.3.3. Intérêt dans la dégradation des polluants récalcitrants

Ces enzymes sont utilisées pour éliminer les composés résistants comme les solvants chlorés, les pesticides halogénés et autres polluants organohalogénés qui échappent aux processus classiques de bioremédiation. (Purnomo *et al.*, 2011)

III.3.4. Défis technologiques et pistes de recherche

Les principales contraintes sont la rareté naturelle de ces enzymes, leur faible stabilité et la difficulté de les produire en grande quantité. Les recherches se concentrent sur la métagénomique, la synthèse enzymatique et la bio-ingénierie pour surmonter ces obstacles. (Purnomo *et al.*, 2011)

Les enzymes sont des outils prometteurs pour la bioremédiation grâce à leur spécificité, leur efficacité et leur compatibilité écologique. Leur diversité fonctionnelle permet de cibler une large gamme de polluants. Toutefois, pour généraliser leur usage industriel, il reste essentiel d'améliorer leur stabilité, leur production et leur efficacité in situ. Les progrès en biotechnologie et en ingénierie moléculaire ouvrent la voie à des solutions enzymatiques durables pour la dépollution environnementale. (Singh & Ward, 2004)

Chapitre 4

Dégradation des polluants par les enzymes

Ces dernières années, divers polluants et à des niveaux alarmants ont été rejetés dans les milieux aquatiques. Comme la plus largement méthode de traitement des eaux usées employée, la boue activée traditionnelle peut éliminer efficacement la plupart des polluants tandis que les contaminants résistants comme l'huile, la graisse, les produits pharmaceutiques, les pesticides et les plastiques sont difficiles à être éradiqués. Les eaux usées contenant de l'huile et de la graisse sont généralement produites par les laiteries, les huileries, les abattoirs et les déchets alimentaires

À l'heure actuelle, les méthodes de traitement des eaux usées comprennent principalement des méthodes physico-chimiques et biologiques. Les méthodes physicochimiques comme l'oxydation chimique, la distillation, les techniques de séparation par membrane et l'adsorption ont été utilisées pour le traitement des eaux usées.

Les méthodes biologiques sont plus respectueuses de l'environnement et pourraient éliminer la plupart des polluants des eaux usées. Ces méthodes employaient des plantes, microbes et enzymes pour le traitement des eaux usées

VI.1. Les enzymes dégradant les eaux usées :

VI.1.1 Définition :

L'enzyme est un biocatalyseur efficace qui peut biodégrader les substances spécifiquement dans des conditions douces. Les enzymes ont des sites actifs spécifiques, capables de se lier avec des substrats spécifiques et réduire l'énergie d'activation au cours des processus enzymatiques. Ainsi, ces processus ont une forte cinétique et spécificité de la réaction. De plus, les enzymes peuvent minimiser le temps nécessaire au transport des substrats dans les cellules, ce qui rend ces derniers processus plus efficaces. (Feng *et al.* 2021).

Il existe six classes d'enzymes et les plus utilisées dans le traitement des eaux usées sont les hydrolases et les oxydoréductases. Ces deux classes d'enzymes peuvent biocatalyser la plupart des polluants dans les eaux usées en raison de leur large éventail de substrats. À l'heure actuelle, des enzymes comme la lipase, la laccase, la peroxydase ont été utilisées commercialement (Feng *et al.* 2021).

1. Traitement enzymatique dans différents polluants des eaux usées :

Sélection d'enzymes :

L'efficacité enzymatique dans le traitement des eaux usées dépend fortement des types d'enzymes et leurs sources. D'une part, les enzymes ne peuvent catalyser qu'un type de réaction

en raison de leur spécificité. Par exemple, les lipases catalysent la dégradation de l'huile, de la graisse, tandis que la protéase est capable de décomposer les protéines. (Feng *et al.*, 2021).

VI.1.2. Dégradation assistée par LiP des polluants dangereux :

La Lignine peroxydase (1,2-bis (3,4-diméthoxyphényl) propane-1,3-diol) ou peroxyde d'hydrogène oxydoréductase : EC(1.11.1.14) symbolisée par LiP réalise le clivage/dépolymérisation oxydative de la lignine en présence de peroxyde d'hydrogène. Pour la première fois, LiP a été extraite du bouillon de culture d'un champignon ligninolytique *Phanerochaete chrysosporium*, mais maintenant ces enzymes se trouvent dans de nombreux micro-organismes, en particulier les basidiomycètes à pourriture blanche (Bilal *et al.*, 2019).

En raison de la faible spécificité du substrat avec un potentiel redox élevé et non spécifique, libre et supporté par un porteur, les LiP se caractérisent par une capacité distincte à oxyder une large gamme de composés aromatiques phénoliques et non phénoliques, ainsi que de nombreux autres produits chimiques organiques tels que les xénobiotiques (Bilal *et al.*, 2019)

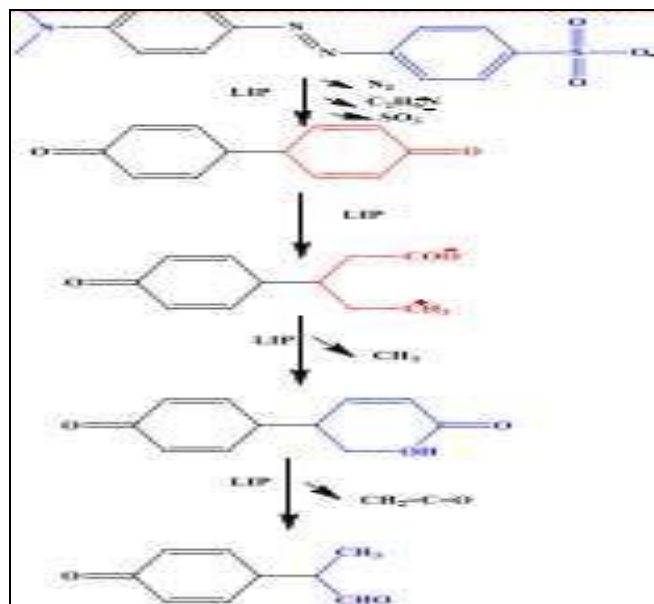


Figure 15 Une voie de dégradation schématique de l'orange de méthyle, en tant que colorant modèle, en présence de LiP en tant que nouvel agent catalyseur

(Bilal *et al.*, 2019).

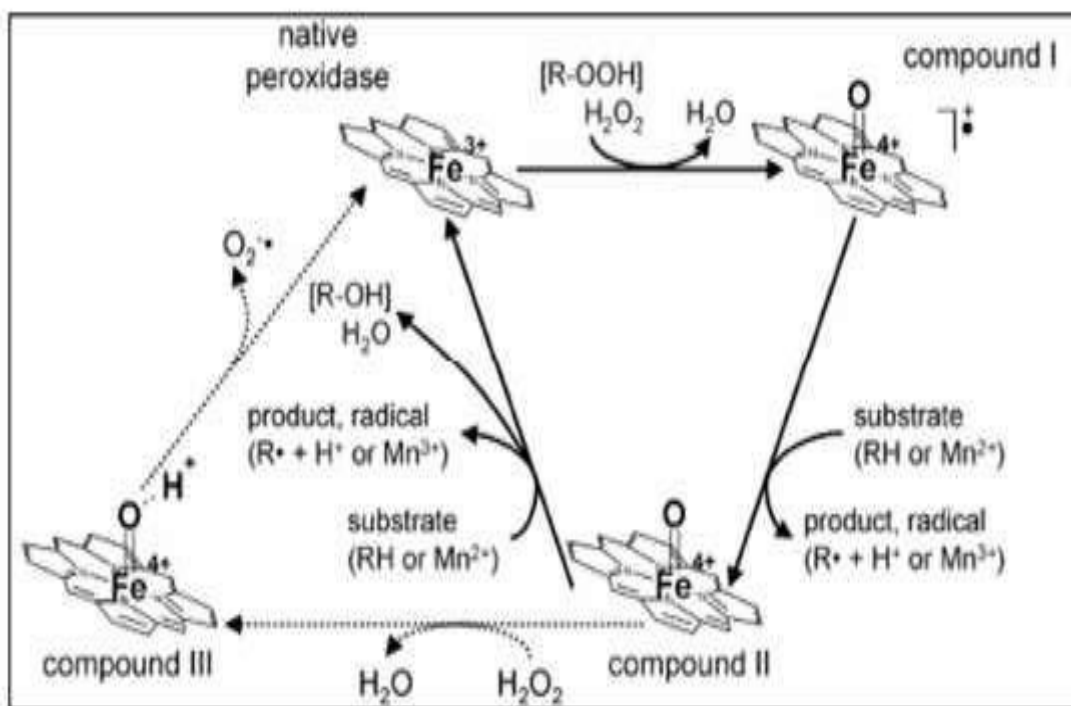


Figure 16 : Mécanisme catalytique de la LiP

(Diakité, 2016).

VI.2.3. Dégradation assistée par MnP des polluants dangereux :

Les manganèse peroxydases (Mn(II) : hydrogène-peroxyde oxydoréductase) : EC (1.11.1.13), appartenant au groupe des oxydoréductases, sont des enzymes contenant de l'hème glycosylé avec une perspective biotechnologique profonde. MnP a d'abord été découvert dans l'extrait de culture de *Phanerochaete chrysosporium*, mais maintenant cette enzyme est également identifiée dans de nombreuses pourritures blanches, champignons (WRF) et bactéries (Bilal *et al.*, 2019).

La catalyse par MnP est dépendante du manganèse, avec Mn²⁺ comme substrat préféré qui peut s'oxyder pour former Mn³⁺. Chélaté, Mn³⁺ peut alors jouer le rôle de médiateur de transfert de charge diffusible, permettant ainsi l'oxydation de divers substrats phénoliques y compris les phénols simples, les colorants synthétiques et les composés de lignine phénoliques modèles) La MnP possède également la capacité d'oxyder ou cliver les structures non phénoliques avec l'aide de différents médiateurs dont les radicaux thiole ou lipidique (Zhuo *et Fan*, 2021).

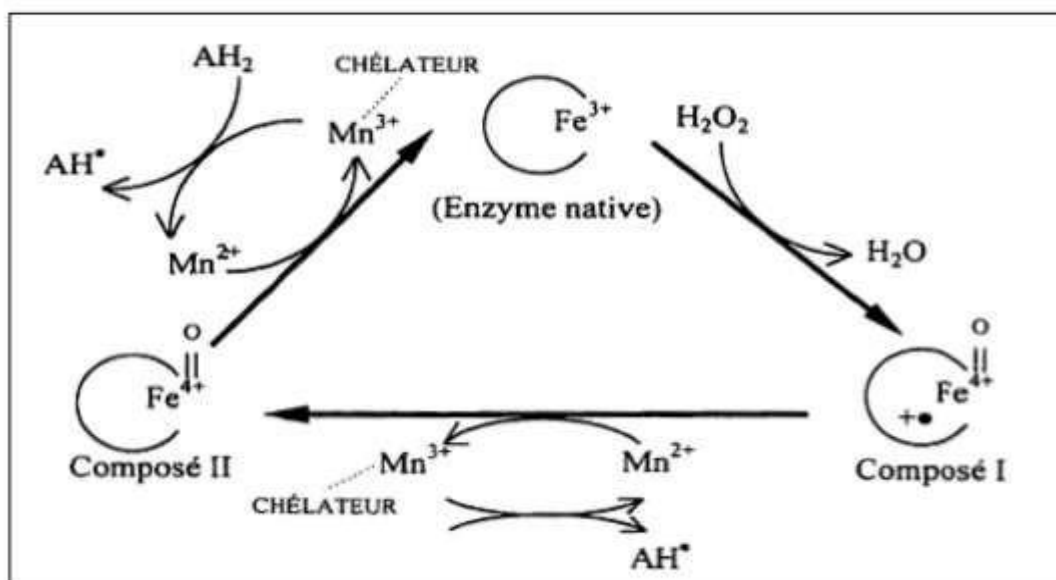


Figure 17 : Mécanisme catalytique de la MnP

(Diakit , 2016).

VI.2.4. Dégradation assistée par la peroxydase polyvalente :

La peroxydase polyvalente (VP) est une peroxydase ligninolytique contenant de l'hème avec une architecture moléculaire hybride qui combine les fonctionnalités de la MnP et la LiP.

Autrement dit, la VP combine les propriétés catalytiques des deux MnP (c'est-à-dire l'oxydation des substrats phénoliques en oxydant Mn²⁺ en Mn³⁺) et LiP (c'est-à-dire l'oxydation des composés aromatiques non phénoliques). Ainsi, la polyvalence catalytique du VP permet son application dans les réactions médiées par Mn³⁺ ou indépendantes du Mn pour des substrats aromatiques, à potentiel redox faible ou élevé ce qui le rend également utile pour la catalyse de divers polluants organiques (Zhuo et Fan, 2021).

VI.2.5. Dégradation assistée par la des peroxydases décolorantes:

Les peroxydases décolorantes (DyP) appartiennent à la classe des peroxydases fongiques. Elles ont été découvertes, pour la première fois, au WRF comme *Bjerkandera adusta* en 1999 et nommés en fonction de leur capacité à dégrader une large gamme de composés colorants. Des membres supplémentaires du DyP ont ensuite été trouvés dans les protéomes d'autres champignons ainsi que dans plusieurs espèces bactériennes). (Zhuo et Fan, 2021).

Ces enzymes ont des structures protéiques uniques et des séquences d'acides aminés distinctes, tout en présentant une préférence substrat pour les colorants anthraquinoniques et une activité peroxydase élevée vis-à-vis une variété de composés organiques. Les fonctions physiologiques des DyP sont encore inconnues, mais leurs propriétés biotechnologiques potentielles ont attiré une attention considérable pour leur application dans l'environnement. De

plus, la DyP peut également dégrader des pigments naturels comme le β -carotène, la bixine et le rocou et plusieurs colorants à potentiel redox élevé tels que Reactive Blue 5, et Azure B, ainsi que le substrat phénolique 2,6-diméthoxyphénol. (Zhuo et Fan, 2021).

VI.2.6. Dégradation assistée par HRP :

Les enzymes extraites et récupérées des racines de raifort ont également été utilisées à des fins de nettoyage de l'environnement. Parmi une variété d'isoenzymes de peroxydase distinctes trouvées dans la nature, la peroxydase C de raifort (HRP : EC 1.11.1.7) est considérée comme l'enzyme la plus abondante. HRP est une enzyme contenant de l'hème qui catalyse l'oxydation des acides phénoliques, des phénols aromatiques (bisphénols, pyrogallol) et des amines non aromatiques (c'est-à-dire indoles, 4-aminoantipyrine, etc.) à l'aide de peroxyde d'hydrogène (Bilal et al., 2019).

Les applications notables des HRP incluent la protection de l'environnement, la dégradation des eaux usées contenant des phénols et la transformation de composés toxiques tels que les xénobiotiques, les colorants, les produits pharmaceutiques et autres contaminants dangereux à partir de l'eau potable et les effluents industriels.

La présence de composés phénoliques comme polluants dangereux dans les eaux usées issues de diverses industries telles que textile, chimique, médicale, papier et pharmaceutique est devenu un environnement émergent et préoccupation de nos jours et ravive donc beaucoup d'attention. (Bilal et al., 2019).

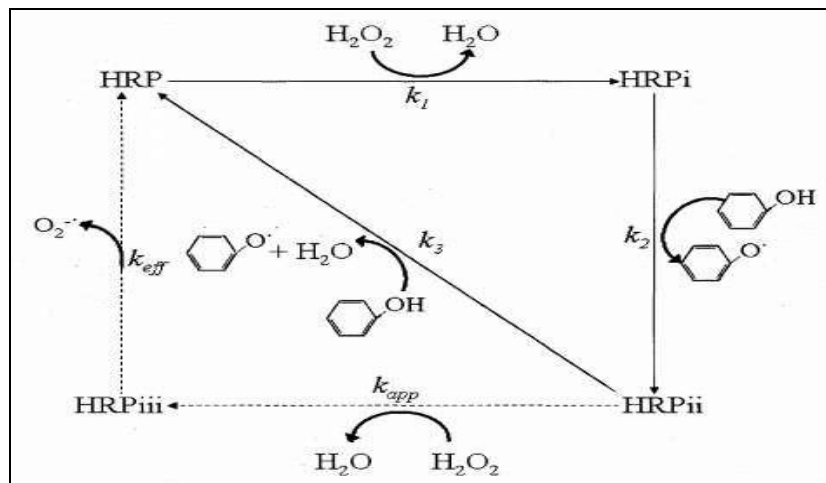


Figure 18 : Inactivation de l'enzyme HRP par H₂O₂, pouvant se produire durant un cycle catalytique (composé aromatique considérée : le phénol)

(Auriol, 2007).

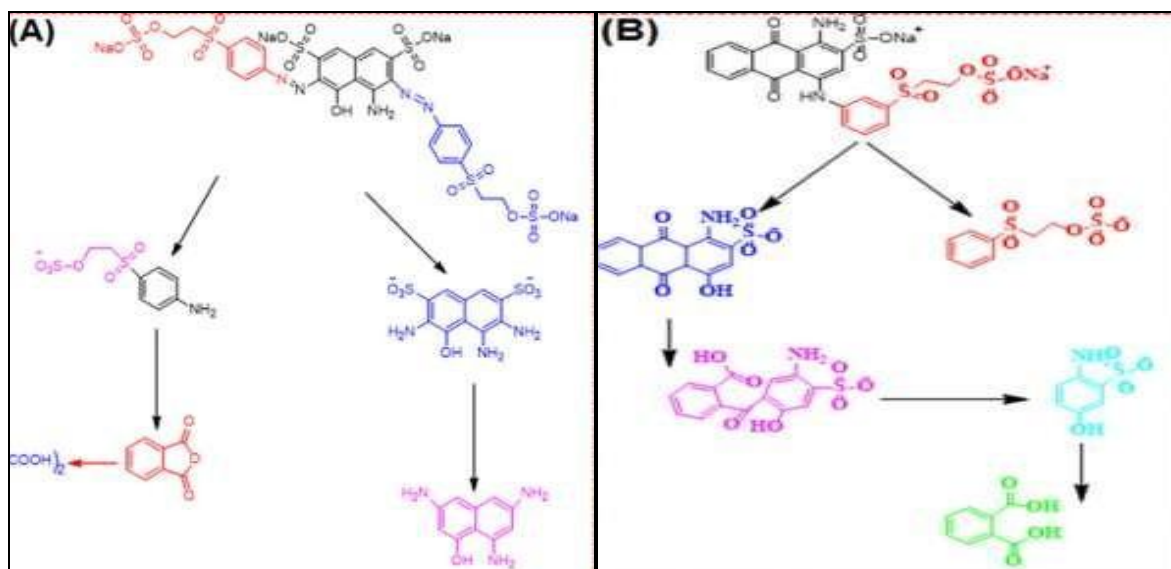


Figure 19 : Voies catalytiques assistées par la peroxydase : (A) RB-5 et (B) RB-19

(Bilal *et al.*, 2019).

VI.2.7. Dégradation assistée par laccases des polluants dangereux :

Les laccases (p-diphénol dioxygène oxydoréductases : EC 1.10.3.2) sont des oxydoréductases extracellulaires avec une existence abondante dans les bactéries et les plantes. Néanmoins, les laccases provenant de sources fongiques telles que *Trametes versicolor*, *T. vilosa* ou *Cerrenauni colore* sont d'un grand intérêt à cause de leur haute performance catalytique, leur rentabilité et leur abondante disponibilité. (Bilal *et al.*, 2019).

En raison de leur faible spécificité de substrat, ces enzymes peuvent catalyser une grande variété de réactions, en particulier l'oxydation par un électron des monophénols, des diphenols et des polyphénols comme amines aromatiques, diamines, N-hétérocycles, phénothiazines, etc. Les processus d'oxydation induits par les laccases génèrent des radicaux phénoxy réactifs avec une réduction simultanée de l'oxygène en eau, ce qui évite le besoin pour H₂O₂. (Bilal *et al.*, 2019).

Structurellement, les laccases sont une classe d'enzymes multicuivre contenant quatre ions cuivre dans leur structure aux propriétés différentes. Ils ont d'énormes applications dans les secteurs industriels du textile, de l'alimentation, des carburants et pharmaceutiques.

Concernant les caractéristiques, les propriétés omniprésentes et large spécificité de substrat font en sorte que les laccases agissent sur une grande variété de composés phénoliques et sont donc de plus en plus appliquées comme approche d'assainissement plus durable pour dégrader les contaminants liés à l'environnement de l'eau et du sol. Ces enzymes ne nécessitent pas de cofacteurs coûteux et utilisent seulement l'oxygène moléculaire comme co-substrat pour la

catalyse, ce qui présente des économies de coûts significatives par rapport aux autres peroxydases. (Bilal *et al.*, 2019).

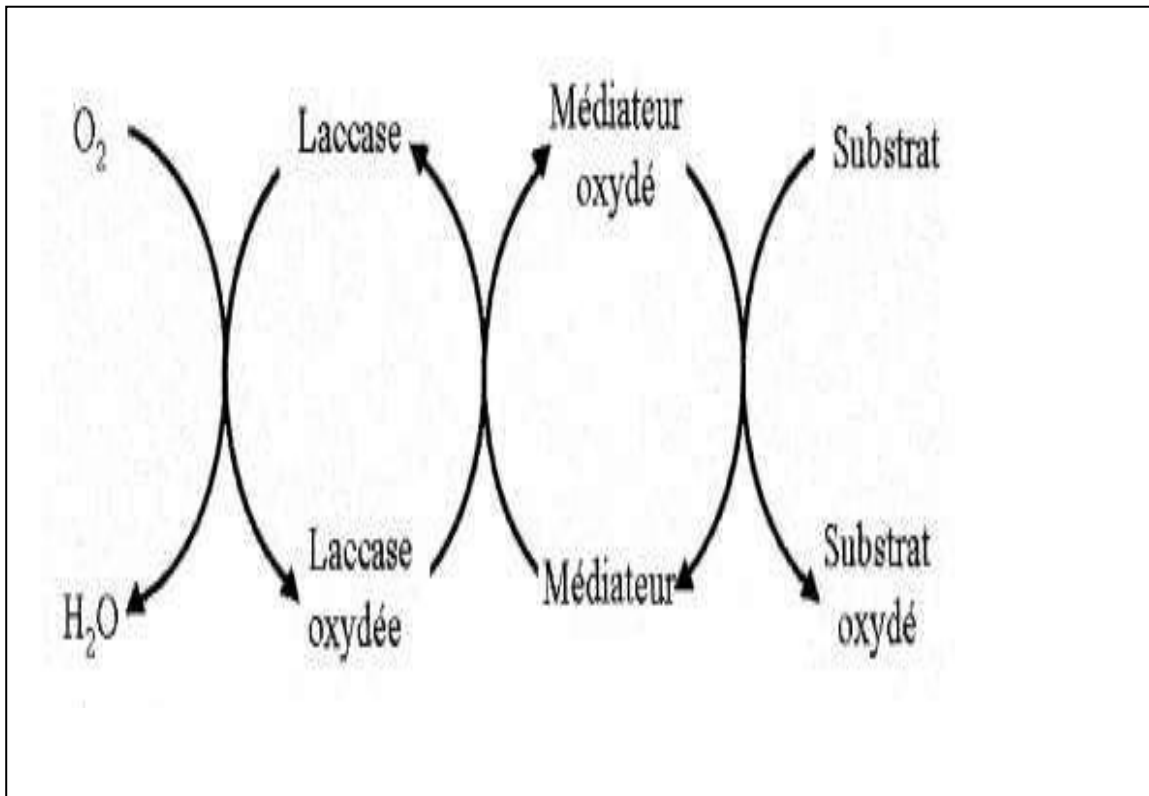


Figure 20 : Cycle catalytique simplifié du système laccase-médiateur (Auriol, 2007).

VI.2.8. Dégradation assistée par les tyrosinases des polluants dangereux :

Les tyrosinases (o-diphénol oxydoréductases oxygénées : EC 1.14.18.1) sont des enzymes contenant du cuivre, largement répandues dans la nature et se trouvent dans les bactéries, les champignons, les insectes, les plantes et les mammifères. Ces enzymes jouent un rôle important dans la synthèse de mélanine et d'autres pigments à partir de l'oxydation de la tyrosine. (Bilal *et al.*, 2019).

Mécaniquement, les tyrosinases sont différentes des laccases dans leur catalyse de l'oxydation des composés phénoliques et de leurs dérivés et par conséquent génèrent des quinones correspondantes à celle de radicaux libre et molécules d'eau comme sous-produit. Néanmoins, à l'instar des laccases, les tyrosinases présentent un grand potentiel pour catalyser la biotransformation de nombreux composés tels que le phénol, les monophénols et leurs dérivés multisubstitués, c'est-à-dire les bisphénols, chloro- et nitrophénols en raison de leur plus grande spécificité de substrat. (Bilal *et al.*, 2019).

VI.3. Performance de la biodégradation enzymatique des polluants des eaux usées :

VI.3.1. Biodégradation des huiles et graisses

La croissance incontrôlée de la population mondiale et sa demande alimentaire et des ressources a conduit à d'énormes quantités de viande et d'huile comestible, mais aussi dans la façon dont il est gaspillé. Un rapport a montré que le marché mondial du pétrole valait 83,4 milliards de dollars en 2015, et il passerait à 130,3 dollars milliards en 2024. Environ 203,8 millions de tonnes d'huiles végétales comestibles ont été produits en 2018, avec une consommation de 197,3 millions de tonnes. Aussi, la production animale, l'abattoir la production de viande a connu une augmentation fulgurante au cours des dernières décennies. Les industries florissantes de la viande et de l'huile comestible ont généré une énorme quantité des eaux usées. Ces eaux usées contenant des huiles et des graisses ont une forte charge organique et inorganique qui est nocive pour les milieux aquatiques même les eaux de surface en cas de sortie sans traitement efficace et simplement ajoutées à la pollution mondiale (**Feng et al., 2021**).

Les lipases, qui sont utilisées commercialement, sont les enzymes les plus employées dans le traitement des eaux usées contenant des huiles et des graisses car elles peuvent les décomposer en acides gras libres plus simples et en glycérol. Les bonnes performances de l'hydrolyse de l'huile et la graisse par les lipases a été signalée, par exemple une lipase commerciale a été utilisée pour la décomposition des déchets gras flottants des industries agroalimentaires laitières et carnées. Les résultats ont montré que cette lipase commerciale peut favoriser la libération d'acides gras à longue chaîne, en particulier d'acides insaturés lorsque le pH initial est ajusté à 7,0. La lipase extracellulaire produite par *Candida rugosa* peut éliminer 93 % de triglycérides de l'huile de palme dans les eaux usées après 48 heures. Cependant, l'hydrolyse par la lipase des huiles et des graisses doit être considérée comme une méthode de prétraitement puisque les produits de transformation de la lipase sont simples acides gras et glycérol. Ces processus enzymatiques doivent encore être combinés avec d'autres méthodes telles que boues activées ou fermentation anaérobie pour compléter le traitement. (**Feng et al., 2021**).

VI.3.2. Biodégradation des médicaments :

Les produits pharmaceutiques constituent des micropolluants organiques courants dans le milieu aquatique et ont été détectés au cours des dernières décennies.

Avec l'utilisation intensive de produits pharmaceutiques, plus de 200 différents composés actifs pharmaceutiques ont été signalés dans le plan d'eau. Anti-infectieux, agents cardiovasculaires, agents du système nerveux central, les agents métaboliques, les hormones, et d'autres produits pharmaceutiques courent dans les eaux usées. Maintenant, l'élimination des

produits pharmaceutiques par les systèmes conventionnels à boues activées est insuffisante. **(Feng et al., 2021).**

Un rapport a montré que seuls 4 des 35 produits pharmaceutiques ont atteint plus de 90 % d'élimination en utilisant des boues d'épuration activées provenant de usines de traitement des eaux usées municipales, alors que moins de 50 % d'élimination de 17 composés a été observé. Un autre rapporta montré que les installations de traitement des eaux usées ne pouvaient éliminer que 20 à 90 % des résidus d'antibiotiques passivement. En fait, des antibiotiques comme céphalosporines, tétracyclines et fluoroquinolones sont difficiles à dégrader naturellement. Plusieurs résidus de produits pharmaceutiques se trouvent dans les eaux usées traitées et sont constamment rejetés dans le milieu aquatique. Ils ont été détectée dans les eaux de surface, souterraines et même potables. Malgré les faibles concentrations de produits pharmaceutiques dans les eaux usées rejetées, leur bioaccumulation est au mieux minime. Jusqu'à 6,5, 0,52 et 0,71 mg/L de ciprofloxacine, de norfloxacine et d'oxytétracycline respectivement ont été observés dans les écosystèmes d'eau douce. L'écotoxicité de certains produits pharmaceutiques a été rapportée, mais l'effet de la plupart d'entre eux en milieu aquatique est largement inconnue. L'inefficacité dans le traitement insuffisant des produits pharmaceutiques représentent une grande menace pour les milieux aquatiques en raison de leur bioaccumulation et de leur potentiel écotoxicologique. **(Feng et al., 2021).**

Certains chercheurs ont signalé la faisabilité de procédés enzymatiques pour le traitement des eaux usées contenant des produits pharmaceutiques, et les oxydoréductases sont des enzymes efficaces pour éliminer ces produits. Par exemple, la chloroperoxydase immobilisée (CPO) a été utilisée pour le traitement des eaux usées qui renferment les antibiotiques lévofloxacine et rifaximine. Il convient de noter que le processus enzymatique peut causer une pollution supplémentaire puisque les produits pharmaceutiques seront transformés en sous-produits toxiques. **(Feng et al., 2021).**

Malheureusement, environ 3000 substances différentes ont été utilisées comme ingrédients pharmaceutiques et on en sait moins sur les effets environnementaux de la plupart des produits pharmaceutiques puisque leurs voies de biodégradation sont complexes et mal comprises. Les structures complexes des produits pharmaceutiques entrave l'application du traitement des eaux usées à base d'enzymes. **(Feng et al., 2021).**

Par conséquent, plus d'études sur les mécanismes et les voies de transformation des produits pharmaceutiques à base d'enzymes sont nécessaire **(Feng et al., 2021).**

VI.3.3. Biodégradation des pesticides :

Le caractère répandu des pesticides menace grandement les écosystèmes aquatiques et la santé humaine en raison de leur forte utilisation, gaspillage et taux de résidus élevé. Les pesticides sont hautement toxiques et leurs résidus prendront fin dans les plans d'eau par ruissellement et percolation. Ils ont un impact sur la qualité de l'eau, sur le métabolisme, la régulation et les processus biochimiques des organismes aquatiques donc perturbent l'équilibre des écosystèmes aquatiques. (Feng *et al.*, 2021).

Actuellement, les pesticides organophosphorés et carbamates sont les pesticides les plus couramment utilisés et ils corrompent l'environnement et la santé animale car ils peuvent agir comme inhibiteurs de la cholinestérase. D'autres toxicités qui ne sont pas liés à la cholinestérase, mais dont l'issue mettrait en jeu le pronostic vital observé. L'utilisation de certains pesticides hautement toxiques tels que le triazophos, le méthamidophos et le carbofuran sont restreints mais ils sont toujours en forte demande, notamment dans les pays en développement. (Feng *et al.*, 2021).

Les enzymes clés dans la décomposition des pesticides ont également été signalées. Par exemple, la laccase immobilisée sur des nanoparticules de fer magnétique a montré plus de 99% d'élimination du chlorpyrifos en 12 heures à pH 7. D'autres enzymes comme l'anhydrolase acide organophosphorée (OPAA) et les hydrolases organophosphorées (Ophs) peuvent décontaminer les pesticides. Ainsi que la dégradation des pesticides à base de monoenzymes, la synergie de plusieurs enzymes pourrait également donner un bon résultat. Dans une réaction à double enzyme pour la décomposition du chlorure d'acétylcholine, l'acétylcholinestérase pourrait transformer le chlorure d'acétylcholine (Ach) en choline, tandis que la choline est encore décomposée par la choline oxydase (CHO) en bêtaïne et en peroxyde d'hydrogène. Puisque de nombreux traitement monoenzymatiques des pesticides ne sont pas respectueux de l'environnement, la combinant de plusieurs enzymes sera un bon moyen d'obtenir un effet enzymatique inoffensif (Feng *et al.*, 2021).

VI.3.4. Biodégradation des produits de soins personnels :

Dans le monde d'aujourd'hui, les produits de soins personnels (PCP) sont largement utilisés dont les shampooings, les crèmes, les crèmes solaires, les détergents et les filtres UV qui sont tous PCP typiques dans la vie de millions de personnes. (Feng *et al.*, 2021).

Ces PCP pénètrent dans le milieu aquatique directement et indirectement. D'une part, les PCP entrent directement dans le milieu aquatique par des activités récréatives comme la natation et la baignade à l'extérieur. A l'inverse, l'insuffisance de l'élimination de ces contaminants par les stations d'épuration et les activités humaines comme la douche, le nettoyage, le blanchiment entraînent un apport indirect de PCP. (Feng *et al.*, 2021).

En fait, le triclosan (TCS), filtres UV comme l'octocrylène, benzophénone-3 et oxybenzone sont couramment utilisés comme composés organiques dans les PCP qui sont toxiques. Il a été rapporté qu'un extrait enzymatique extracellulaire (principalement laccase) de *Trametes versicolor* (ATCC 7731) pourrait dégrader efficacement l'oxybenzone en présence d'un médiateur redox. La laccase du champignon de la pourriture blanche

Coriolopsis polyzona combiné avec le médiateur 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline6-sulfonique (ABTS) pourrait éliminer efficacement le TCS après une heure de traitement dans les conditions de 40 °C et pH 4. Malgré le grand potentiel du traitement des PCP à base d'enzymes, d'autres études sont nécessaires car les résultats dans ce domaine sont encore rares (Feng *et al.*, 2021).

VI.3.5. Biodégradation des produits chimiques industriels :

VI.3.5.1. Phénols et composés phénoliques :

En tant que matériau important dans l'industrie, les phénols et les composés phénoliques jouent un rôle important dans l'industrie du textile, papier, plastique, produits pharmaceutique et autres. Ces composés mettent en danger l'homme et les organismes aquatiques entraînant une grande menace pour l'environnement, même à faible concentration (Feng *et al.*, 2021).

À l'heure actuelle, l'élimination à base d'enzymes du phénol et des composés phénoliques a été étudiée. En fait, l'élimination complète de 0,4 mM de phénol a été obtenu par une laccase immobilisée après 40 min de traitement sous les conditions de 35 °C et pH 4,5. Les peroxydases sont aussi des enzymes efficaces dans la transformation des composés phénoliques puisque leurs sites actifs, qui renferment le cofacteur hème et la sélénocystéine activée, sont d'accès faciles. Une recherche a montré que les peroxydases immobilisées pouvaient éliminer 99,9 % du phénol à 1 mM après 5 heures de traitement dans les conditions de température ambiante et pH 7,0. De même, pour une poudre de tégument de graines de soja immobilisée en tant que peroxydase de soja pour l'élimination de phénol provenant d'eaux usées de raffinerie dans un bioréacteur à lit fixe. (Feng *et al.*, 2021).

Jusqu'à 97% d'élimination du phénol a été observée dans les meilleures conditions possibles, étant 1 mM comme concentration initiale de phénol, 56, 14 mM de concentration de peroxyde d'hydrogène et un débit de 5,5 ml/min (Feng *et al.*, 2021).

VI.3.5.2. Les teintures :

Avec l'essor des industries du textile et de l'habillement, de plus en plus d'eaux usées contenant des colorants sont produits en raison de l'utilisation des teintures et leur fixation sur le

tissu. Les industries de l'imprimerie, du cuir et du plastique sont également des sources de production d'eaux usées contenant des colorants. Les structures de la plupart des colorants sont complexes et ont une stabilité caractéristique élevée qui résiste naturellement à la biodégradation. Les colorants synthétiques peuvent affecter la chaîne alimentaire et ces composés peuvent être transformés en produits nocifs, constituant une grande menace pour l'environnement aquatique et les organismes qui y vivent. (Feng *et al.*, 2021).

À présent, le traitement des colorants à base d'enzymes est principalement divisé en biodégradation, décoloration et détoxification. Les oxydoréductases sont les enzymes les plus utilisées pour le traitement des effluents qui contiennent des colorants. La peroxydase de raifort immobilisée sur un gel de polyacrylamide ou réticulée a montré une efficacité dans la dégradation du colorant azoïque méthyl orange et a donné une dégradation maximale du méthyl orange (93,5%) à pH 6. En outre, la laccase peut éliminer efficacement deux sulfamides en présence de 1-hydroxybenzotriazole (HBT) comme médiateur. Une toxicité significativement diminuée de la solution de sulfonamide traitée à la laccase a également été observée selon une étude de microtoxicité par l'inhibition de la croissance bactérienne. (Feng *et al.*, 2021).

Cependant, des recherches utilisant de vraies eaux usées contenant des colorants sont nécessaires puisque presque toutes les expériences menées étaient conduites dans des laboratoires avec des eaux usées synthétiques, ce qui n'est pas propice aux applications réelles (Feng *et al.*, 2021).

VI.3.5.3. Plastiques :

Les plastiques sont répandus dans notre vie et en particulier dans l'emballage qui crée beaucoup de commodité mais aussi un produit qui ne peut pas être décomposé. Le polyéthylène (PE), le polyamide (PA), le polyéthylène téréphtalate (PET), le polystyrène (PS), le polychlorure de vinyle (PVC), les polyuréthanes (PUR) et le polypropylène (PP) sont des plastiques couramment utilisés. Cependant, les plastiques comme l'éthylène et le propylène sont dérivés d'hydrocarbures fossiles qui résistent à la biodégradation. (Feng *et al.*, 2021).

Ainsi, ils s'accumuleront plutôt que de se décomposer dans l'environnement. La production généralisée de matières plastiques et leur faible taux de recyclage aggrave également la situation. En 2015, plus de 6,3 milliards de tonnes de plastiques ont été générés et seulement 9 % ont été recyclés. Les plastiques résiduels endommagent considérablement l'environnement en raison de

leurs caractéristiques de toxicité et d'accumulation. Les plastiques sont répandus dans les milieux aquatiques et surtout dans les océans du monde et même dans l'eau potable. (Feng *et al.*, 2021).

Bien que les plastiques soient résistants à la biodégradation, des enzymes impliquées dans leur décomposition comme la PET hydrolase, la tannase et la MHETase ont été trouvées. Malheureusement, l'efficacité de la dégradation enzymatique des plastiques est faible. Il faudra des semaines pour hydrolyser complètement le PET par PETase à partir d'*Ideonalla sakaiensi* (IsPETase), qui est une dépolymérase efficace et spécifique. Récemment, des études portant sur l'augmentation de la thermostabilité et l'activité enzymatique de la PETase à rapporté un grand succès. À l'heure actuelle, les enzymes impliquées dans la dégradation de l'AP et la PET ont été enregistrées alors que l'on en savait moins sur les enzymes hydrolases de PVC, de PP, de PE et de PUR. Cependant, la dégradation de ces plastiques est possible par certaines enzymes car de nombreux microbes qui peuvent dégrader les plastiques ont été trouvées. La dégradation des plastiques à base d'enzymes est faisable et prometteuse mais d'autres recherches comme l'augmentation de la diversité enzymatique et son efficacité est nécessaire pour l'application efficace dans le traitement des eaux usées qui contiennent les plastiques (Feng *et al.*, 2021).

VI.4.les systèmes de traitement des eaux usées liés aux enzymes :

VI.4.1.Systèmes enzymatiques libres :

Dans ces systèmes, les enzymes peuvent être divisées en enzymes brutes et des enzymes purifiées. Les deux types d'enzymes ont donné de bons résultats dans l'élimination des polluants. Cependant, les enzymes purifiées sont chères car des méthodes comme la séparation par membrane, la chromatographie d'exclusion stérique et la chromatographie sur colonne sont nécessaires pour la purification enzymatique. Les enzymes purifiées étaient moins efficaces pour éliminer les polluants des eaux usées que les enzymes brutes dans certains cas puisque les enzymes brutes contiennent des médiateurs (Feng *et al.*, 2021).

Il a été rapporté que la laccase brute extraite de *Tramete versicolor* peut éliminer complètement le naproxène (NPX) alors qu'une élimination de 60 % a été obtenue par une laccase commerciale extraite de *Myceliophthora thermophila*. Cependant, cela ne signifie pas que les enzymes brutes sont meilleures que les enzymes purifiées. Étant donné que les enzymes sont chères, la forte demande d'enzymes qui ne peuvent pas être recyclées dans le traitement des eaux usées rend ces systèmes non réalisables et les enzymes restantes doivent être éliminées à la fin du traitement. Beaucoup d'études doivent être faites pour résoudre le coût et/ou les problèmes

de contamination en cas d'utilisation d'enzymes libres pour le traitement des eaux usées (**Feng et al., 2021**).

VI.4.2. Les systèmes enzymatiques immobilisés :

Les enzymes immobilisées sont souvent utilisées et étudiées dans les systèmes enzymatiques. Dans ces systèmes, les enzymes sont combinées physiquement ou attachées à diverses matrices, et les capacités de catalyse des enzymes sont maintenues en même temps. Puisque les enzymes sont attachées à la matrice, ces systèmes sont faciles à contrôler car les enzymes peuvent facilement se séparer avec eaux usées. De plus, les enzymes immobilisées peuvent être réutilisées plusieurs fois, ce qui diminue davantage la pollution et réduit considérablement le coût du traitement. (**Feng et al., 2021**).

Néanmoins, l'immobilisation réduit la perte d'activité de l'enzyme, prolonge sa durée de vie et améliore sa résistance au pH et à la température plutôt que des enzymes libres. Il faut savoir que dans ces systèmes, les méthodes d'immobilisation et les matériaux de support sont d'une grande importance pour le coût des processus, activité et la cinétique enzymatique et l'efficacité du traitement. (**Feng et al., 2021**).

Les méthodes d'immobilisation généralement utilisées comprennent l'adsorption, inclusion, attachement covalent et réticulation. Ces méthodes d'immobilisation peuvent être divisées en méthodes physiques et chimiques. En général, l'immobilisation chimique offre une bonne stabilité enzymatique mais diminuera l'activité enzymatique car les liaisons covalentes formées entre l'enzyme et les matériaux de support perturbent la structure native de l'enzyme alors que les méthodes d'immobilisation physique d'inclusion ont moins d'influence sur la structure enzymatique mais présentent, néanmoins une faible stabilité enzymatique. Cependant, ce constat n'est pas absolu. Ainsi, dans les méthodes physiques, la stabilité enzymatique est améliorée en modifiant la surface des supports. Par exemple, un nanobiochar qui a été traité par $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (50/50, v/v) a été utilisé comme support pour l'immobilisation de laccase. (**Feng et al., 2021**).

Ceci a entraîné une amélioration de la stabilité opérationnelle, vis-à-vis le pH et de stockage de la laccase immobilisée par rapport au laccase libre. Bien que les méthodes physiques sont moins d'influence sur l'activité enzymatique, la perte d'activité enzymatique ne doit pas être ignorée. Il a été rapporté que 30 à 40 % d'activité enzymatique seront perdues en 3 cycles de réaction. (**Feng et al., 2021**).

Quant au processus d'immobilisation chimique, les méthodes sont plus complexes que les méthodes physiques puisqu'elles sont liées aux réactions chimiques. Ces méthodes d'immobilisation peuvent affecter la performance du processus enzymatique. Il a été rapporté que deux peroxydases immobilisées ont eu des effets différents sur l'élimination du phénol sous les

mêmes conditions. Les méthodes d'immobilisation doivent être déterminées par l'application demandée. Au cours des processus d'immobilisation, la toxicité des réactifs doit être prise en considération pour éviter les problèmes environnementaux. Le coût des matériaux, la toxicité, la surface et la résistance mécanique sont des critères importants pour la sélection matricielle. (Feng *et al.*, 2021).

Les matériaux des supports d'immobilisation peuvent être divisés en trois types, à savoir la matrice inorganique, la matrice organique et la matrice organique-synthétique. Des supports inorganiques comme le gel de silice et le charbon actif sont stables et ont une bonne diffusion et caractéristiques d'écoulement. Aussi, la résistance à la contamination microbienne et généralement abordable ce qui constitue un avantage. Les protéines et les glucides tels que la cellulose ou la chitine appartiennent à la matrice organique, qui est peu coûteuse et disponible en grande quantité. Cependant, ces supports sont facilement contaminés par des microbes et possèdent des capacités de diffusion et d'écoulement limitées. Les supports à matrice organique-synthétique sont d'accès facile, difficiles à contaminer par les formes de vie microbiennes et sont largement utilisés dans les procédures enzymatiques. Ces supports, cependant, peuvent provoquer une perte d'enzymes et réduire leur activité à cause de l'hydrophobie ou la propriété hydrofuge des supports. (Feng *et al.*, 2021).

De nombreuses études réussies ont été menées sur les enzymes immobilisées et leur rôle dans le traitement des eaux usées. Par conséquent, les méthodes d'immobilisation doivent être sélectionnées selon l'objectif de recherche des matériaux plus adaptés doivent être étudiés pour parvenir à un meilleur système qui considère le coût, la stabilité et l'activité enzymatique (Feng *et al.*, 2021).

VI.4.3. Les systèmes liés aux médiateurs enzymatiques :

Les médiateurs enzymatiques sont des composés stables de faible poids moléculaire qui peuvent fonctionner comme un obturateur d'électrons entre l'enzyme et les substrats. Les médiateurs peuvent élargir la gamme des substrats enzymatiques en produisant des radicaux hautement réactifs. Aussi, ces petites molécules facilitent le processus enzymatique et améliorent l'efficacité d'élimination des polluants cibles. Typiquement, les médiateurs ont servi à améliorer le processus d'oxydation lorsque le potentiel redox de l'enzyme était supérieur à celui du substrat. (Feng *et al.*, 2021).

Les médiateurs enzymatiques peuvent être divisés en médiateurs naturels et médiateurs synthétiques. La syringaldéhyde (SA), l'acétovanillone, le méthyle de vanille et l'alcool 4-hydroxybenzylique (HBA) sont des médiateurs naturels tandis que l'acide violurique (VLA) est d'origine synthétique. Malgré que les médiateurs sont capables d'améliorer le processus

enzymatique, l'activité enzymatique peut être inhibée. Néanmoins, l'utilisation des médiateurs peut causer de nouveaux problèmes environnementaux car ils sont toxiques, mais ce ci est lié à la dose de médiateur. En dépit de leur toxicité, les médiateurs sont nécessaires lors du traitement des composés tels que TCS et oxybenzone. Ainsi, trouver une concentration de médiateur bon marché et appropriée pour améliorer la stabilité et l'efficacité du processus enzymatique sont extrêmement importantes. (Feng *et al.*, 2021).

VI.5. Traitement de la pollution minérale :

Les eaux usées des unités productrices de boissons renferment surtout de la pollution organique mais aussi de l'azote, du phosphore et d'autres minéraux provenant des opérations de lavages et de rinçage des cuves, des machines et des espaces de production. L'azote et le phosphore doivent être éliminés dans les eaux usées avant leur rejet dans la nature car ils peuvent être responsables du phénomène d'eutrophisation des milieux récepteurs. Cette pathologie environnementale est la cause du comblement des plans d'eau et entraîne la réduction du pouvoir de rétention. En outre, les matières organiques azotées peuvent aussi entraîner une demande élevée en oxygène dans les cours d'eau, ce qui contribue à l'appauvrissement de l'oxygène dissous dans le milieu récepteur causant une perturbation du développement de la faune aquatique. (Sawdogo, 2018).

Le sodium pour sa part tire son origine de l'utilisation de produits de désinfection tels que la soude caustique et l'hypochlorite de sodium. Ces produits sont très disponibles, d'utilisation facile et bon marché. (Sawdogo, 2018).

La présence du sodium dans les eaux rejetées peut causer des altérations dans la structure du sol lors de la réutilisation des eaux usées ou des eaux usées traitées pour l'irrigation causant une diminution de la capacité de rétention de l'eau (Sawdogo, 2018).

VI.5.1. Traitement de l'azote :

Dans les milieux aqueux, les composés azotés sont présents généralement sous forme organique mais aussi sous diverses formes minérales (ion ammonium, nitrites, nitrates.) voire gazeux (ammoniac dissout). L'élimination conventionnelle de l'azote par voie biologique passe par l'étape d'ammonification, puis à travers la nitrification et la dénitrification, elles-mêmes pouvant se diviser en sous étapes intermédiaires. La mise en œuvre de l'activité bactérienne est due à l'action de populations de microorganismes et des activités enzymatiques spécifiques aux formes azotées en solution (Sawdogo, 2018).

Dans le cas des systèmes intensifs à cultures en suspension, la mise en œuvre de l'opération repose sur l'utilisation soit de deux réacteurs biologiques en série, l'un aérobie pour

oxyder les formes réduites en nitrates et l'autre anoxie pour réduire les formes oxydées produites en azote gazeux, soit d'un seul réacteur biologique alternant des phases aérée et anoxie, soit d'un mixage des deux systèmes avec un réacteur anoxie et un réacteur en alternance aéré/anoxie, notamment en cas de limitation de matière organique. On distingue donc :

- **L'ammonification :**

C'est la première étape de la dégradation des produits organiques azotés présents dans les effluents. Elle permet la transformation des formes organiques de l'azote en ion ammonium. (Sawdogo, 2018).

- **La nitrification :**

C'est le processus de transformation dans les eaux usées de l'azote ammoniacal en nitrate. La nitrification s'opère en deux étapes : la nitritation qui oxyde l'ammonium en nitrites et la nitratisation qui convertit les nitrites en nitrates. Ces deux processus sont réalisés en milieu aéré par des microorganismes spécifiques. La nitritation se fait par les bactéries autotrophes appelées bactéries nitritantes ou encore Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB). Elles peuvent être réparties en cinq genres dont les noms portent le préfixe « nitroso » : *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibrio*. L'équation globale d'oxydation de l'ammonium en nitrite est alors donnée par l'équation suivante (Sawdogo, 2018) :



La réaction de nitratisation est réalisée par les bactéries nitritantes du genre *Nitrobacter Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* et *Nitrocystis* appelées Nitrite Oxydizing Bacteria (NOB).

L'équation de la réaction d'oxydoréduction globale de la nitratisation est donnée par l'équation suivante :



- **La dénitrification :**

C'est le processus biologique qui se déroule en condition d'anoxie, soit en teneur en oxygène dissout nulle et un potentiel d'oxydoréduction positif mais inférieur à 100 mV. Il permet la réduction des ions nitrates en azote gazeux en passant par des stades intermédiaires de composés oxydés d'azote, de nitrite, d'oxyde nitrique et d'oxyde nitreux notamment. Les microorganismes intervenant au cours de la dénitrification sont les bactéries hétérotrophes anaérobies facultatives. Ces bactéries utilisent l'oxygène intégré dans les ions nitrites et nitrates comme accepteurs d'électrons et la matière organique comme source de carbone et d'énergie.

Les bactéries les plus fréquemment rencontrées sont des *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* et *Thiobacillus*. L'équation suivante résume les opérations se produisant lors de ce processus (Sawdogo, 2018) :



VI.5.2. Traitement du phosphore :

D'après le rapport de l'IFC (2007), la concentration en phosphate dans les effluents de brasseries, varie entre 10 et 50 mg/L, dont 70% sont sous la forme soluble et le reste sous forme d'orthophosphate (HPO_4 , PO_4^{3-}). De façon conventionnelle, les processus de traitement primaire et secondaire éliminent environ 10 à 30% de phosphore dans les eaux usées, ce qui n'est pas suffisant au regard de la réglementation environnementale qui recommande une concentration en phosphore total de 50 mg/L dans les eaux usées de brasseries rejetées. Cette réglementation stipule que le processus biologique d'élimination du phosphore est basé sur l'exposition de la biomasse dans les conditions alternant anaérobie et aérobie. (Sawdogo, 2018).

Il en résulte donc une absorption élevée dans les cellules. Le processus est communément appelé « absorption cellulaire de luxe ». Cette alternance de conditions améliore l'élimination du phosphore par des microorganismes spéciaux appelés organismes accumulateurs de phosphore (OAP). Ces derniers sont capables d'absorber 7 à 8 % de phosphore dans leur masse cellulaire, alors que les autres microorganismes ont une capacité d'absorption de 1 à 2 %. Les cellules peuvent être éliminées par la sédimentation des boues riches en phosphore ou le phosphore peut être libéré des cellules et précipiter de façon chimique avec du sulfate d'aluminium, du chlorure de fer ou de la chaux (Sawdogo, 2018).

VI. 5.3. Elimination du sodium :

Le sodium est un élément secondaire dont la teneur naturelle dans les sols est faible mais toujours suffisante pour les besoins des cultures. Cette teneur est en général inférieure ou égale à 0,03%. Pour cela, l'analyse du sodium fournit une indication sur la salinité du sol. Dans le cas d'épandages massifs et répétés d'effluents sodiques (effluents agro-industriels type laiterie ou sucrerie), le suivi de la teneur en sodium est indispensable pour éviter les risques de déstabilisation structurale. (Sawdogo, 2018).

La présence du sodium, dans les eaux d'irrigation, requiert une attention particulière car un excès de cet élément entraîne un risque de dégradation de la structure du sol, particulièrement visible en surface par une aggravation de la battance. En cas de forte teneur, la croissance des végétaux est fortement perturbée et le pH du sol s'élève significativement.

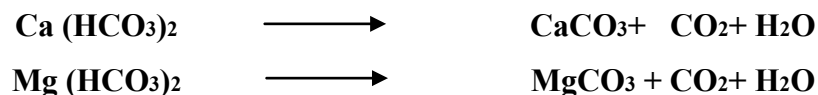
Le sodium est un élément retenu avec une faible énergie sur la capacité d'échange cationique (CEC). Il est donc facilement et rapidement lessivable par les pluies drainantes hivernales. (Sawdogo, 2018).

L'élimination du sodium dans les eaux fait appel à des procédés de filtration sur membranes (osmose inverse ou nanofiltration), d'électrodialyse, de désionisation (avec des résines échangeuses d'ions) ou de distillation. En fait, l'osmose inverse est très utilisée dans le cadre du dessalement de l'eau de mer c'est-à-dire l'élimination du chlorure de sodium (NaCl). La nano filtration, pour sa part, permet avec une consommation énergétique moins importante que l'osmose inverse, de retenir les ions de façon générale avec des rendements intéressants. Ces rendements pourraient être suffisants dans le cadre du traitement des eaux usées où les besoins de réutilisation pour l'irrigation commandent des concentrations de sodium inférieures à 150 mg/L (Sawdogo, 2018).

VI.5.4. Elimination du calcium et du magnésium :

Cette opération est communément appelée adoucissement. La dureté représente la teneur en calcium et magnésium dans l'eau. Il existe :

➤ **La dureté temporaire** : qui peut être éliminée par chauffage de l'eau car elle représente la combinaison du calcium et du magnésium avec les ion bicarbonate.



➤ **La dureté permanente** : elle ne peut pas être éliminée par chauffage et qui correspond à la combinaison du calcium et du magnésium avec les anions des sels d'acide forte (SAF) essentiellement chlorures et sulfates et plus rarement nitrate.

(Ouali, 2017).

La dureté est la cause de multiples problèmes notamment de consommation excessive de détergents en blanchisserie et de formation de dépôts dans les chaudières. La dureté maximale acceptable pour une eau de consommation est de 300 à 500 mg /l exprimée en

CaCO₃ alors qu'une dureté modérée est de 60 à 120mg /l. (Ouali, 2017).

L'adoucissement peut être réalisé de différentes manières. Il s'agit de précipitation chimique en utilisant divers réactifs échangeurs ioniques tels que : la chaux, carbonate de sodium (Ouali, 2017).

VI.5.5. Elimination du silicium :

C'est beaucoup plus un procédé d'adsorption qu'une précipitation chimique. Le procédé est surtout appliqué dans le traitement des eaux de chaudières sous pression. Deux réactifs sont utilisés : l'aluminate de sodium et la magnésie anhydre (**Ouali, 2017**)

Partie 3

Perspectives et défis de la bioremédiation enzymatique

Chapitre 5

Optimisation et développement des techniques enzymatiques

L'optimisation enzymatique est devenue un axe central dans l'amélioration de la bioremédiation, notamment en raison de la capacité des enzymes à catalyser efficacement la dégradation de polluants environnementaux complexes. L'optimisation vise à surmonter les limites naturelles des enzymes, telles que leur stabilité, leur spécificité ou leur efficacité en conditions extrêmes (pH, température, contaminants). (Sheldon & van Pelt, 2013)

Ce chapitre a pour but d'explorer les stratégies modernes d'optimisation enzymatique, incluant l'immobilisation, l'ingénierie enzymatique, l'utilisation des nanotechnologies et les perspectives technologiques émergentes pour une bioremédiation durable, écologique et économiquement viable. (Rao *et al.*, 2021)

V.1. Immobilisation et stabilisation des enzymes

V.1.1. Concepts de base et définitions

L'immobilisation enzymatique est une technique essentielle en biotechnologie qui consiste à restreindre le mouvement des enzymes en les fixant sur un support solide ou dans une matrice, permettant ainsi leur réutilisation et une séparation aisée du produit final. Cette stratégie vise à surmonter les limitations des enzymes libres, qui, bien qu'efficaces, sont souvent instables, sensibles aux variations de pH et de température, et difficiles à récupérer après la réaction. Contrairement aux enzymes libres qui sont dissoutes dans la phase liquide réactionnelle, les enzymes immobilisées sont confinées dans un environnement physique ou chimique, ce qui facilite leur stabilité, leur recyclabilité et leur durabilité dans des processus industriels ou environnementaux prolongés (Datta, Christena, & Rajaram, 2013).

Les interactions physico-chimiques sous-jacentes à l'immobilisation enzymatique jouent un rôle clé dans la stabilité et l'efficacité de l'enzyme. Parmi ces interactions, on retrouve les liaisons ioniques (entre groupes chargés positivement et négativement), les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes (souvent entre chaînes latérales non polaires), ainsi que les liaisons covalentes, qui offrent une fixation plus permanente de l'enzyme sur le support. L'encapsulation physique dans des gels polymériques ou des matrices, comme l'alginate ou le polyacrylamide, est également couramment utilisée pour créer un microenvironnement favorable à l'activité enzymatique tout en limitant sa diffusion hors du système (Hanefeld, Gardossi, & Magner, 2009).

V.1.2. Méthodes d'immobilisation enzymatique

L'immobilisation enzymatique peut être réalisée selon plusieurs techniques, chacune présentant des avantages et des limites spécifiques selon l'application visée.

L'adsorption physique est une méthode simple et réversible qui repose sur des forces faibles comme les interactions électrostatiques, hydrophobes ou de Van der Waals. Bien que peu coûteuse et ne nécessitant pas de modification chimique de l'enzyme, elle est souvent instable, avec des risques de désorption lors des changements de conditions opératoires. **La liaison covalente**, en revanche, implique la fixation de l'enzyme via des groupes fonctionnels sur un support solide (ex. $-NH_2$, $-COOH$). Elle confère une stabilité supérieure à l'enzyme, mais peut entraîner une altération de son site actif si les conditions de couplage ne sont pas optimisées.

L'**encapsulation** dans des matrices polymériques telles que l'alginate ou la gélatine protège les enzymes de l'environnement extérieur, mais peut limiter la diffusion du substrat vers le site actif.

Enfin, les **agrégats enzymatiques réticulés (CLEAs)** représentent une méthode sans support, où les enzymes sont précipitées puis stabilisées par des agents réticulants (comme le glutaraldéhyde). Cette approche permet une forte concentration enzymatique, une stabilité accrue, et une résistance aux solvants organiques (Sheldon, 2007).

V.1.3. Choix du support et impact sur l'activité enzymatique

Le choix du support est déterminant pour la réussite de l'immobilisation enzymatique. **Les supports naturels** tels que l'alginate, le chitosane ou la cellulose sont largement utilisés en raison de leur biocompatibilité, biodégradabilité et faible coût. Ils conviennent particulièrement aux applications environnementales où la non-toxicité est primordiale. En revanche, **les supports synthétiques**, notamment la silice fonctionnalisée, les polymères organiques (comme le polyacrylamide) ou encore les nanomatériaux (nanotubes de carbone, nanoparticules de silice), offrent une meilleure stabilité mécanique et thermique, ainsi qu'un contrôle précis de la porosité et de la surface spécifique.

Un bon support doit présenter : une **surface spécifique élevée** pour maximiser l'interaction enzyme-support, une **porosité adaptée** pour permettre la diffusion des substrats et produits, une **inertie chimique** pour éviter les interactions non spécifiques, et une **résistance mécanique** pour supporter les cycles d'utilisation répétés (Ansari & Husain, 2012).

V.1.4. Avantages et inconvénients de l'immobilisation

L'immobilisation enzymatique présente plusieurs **avantages significatifs** dans les processus industriels et environnementaux. La possibilité de **réutiliser l'enzyme** sur plusieurs cycles permet une réduction des coûts opérationnels. Elle confère également **une meilleure stabilité thermique, chimique et mécanique**, en protégeant les enzymes contre la dénaturation causée par les conditions extrêmes du procédé. De plus, l'**isolement facile** de l'enzyme du produit final facilite la purification et améliore la qualité du produit.

Cependant, cette technique comporte aussi **des limitations**. Une **perte partielle d'activité enzymatique** peut survenir à cause de modifications structurelles lors de l'immobilisation. De plus, **le coût élevé des supports** spécifiques et des procédés de fixation peut limiter son application à grande échelle. Enfin, les **limitations de diffusion** des substrats et des produits dans la matrice peuvent réduire l'efficacité catalytique (Mateo *et al.*, 2007).

V.1.5. Applications industrielles et environnementales

Des applications concrètes incluent :

- **Les laccases immobilisées** pour la dégradation des colorants textiles.
- **Les lipases immobilisées** pour le traitement des déchets gras dans les eaux usées.
- Des **études de cas** ont démontré l'efficacité de ces systèmes dans la dépollution de sols contaminés. (Rodriguez Couto & Toca Herrera, 2006)

V.2. Ingénierie enzymatique et enzymes recombinantes

V.2.1. Définition et fondements de l'ingénierie enzymatique

L'ingénierie enzymatique consiste à modifier les propriétés d'enzymes via :

- La **mutation dirigée**, ciblant des acides aminés précis.
- L'**évolution dirigée**, simulant l'évolution naturelle par mutations aléatoires et sélection.
- L'**ingénierie de site actif**, visant à améliorer la catalyse. (Arnold, 1998)

V.2.2. Techniques d'obtention d'enzymes recombinantes

Ces enzymes sont produites par clonage de gènes dans des hôtes comme *E. coli*, levures ou champignons. Les étapes comprennent l'optimisation des promoteurs, l'ajustement des codons, et la purification post-expression. (Adrio & Demain, 2014)

V.2.3. Objectifs de l'ingénierie enzymatique

Les objectifs sont multiples :

- **Augmenter la spécificité/substrat et l'affinité catalytique.**
- **Accroître la stabilité** à des pH, températures ou solvants extrêmes.
- **Renforcer la tolérance** aux inhibiteurs comme les métaux lourds. (Bornscheuer & Pohl, 2001)

V.2.4. Cas pratiques et applications

Des exemples notables :

- **Laccases recombinantes** pour la dégradation des pesticides organophosphorés.

- **Peroxydases modifiées** pour les hydrocarbures dans les sols.

- **Hydrolases ingénierées** pour la dégradation enzymatique des plastiques. (Joo *et al.*, 2008)

V.2.5. Défis, limites et considérations éthiques

Les principales limites incluent :

- Le **coût de production élevé**.

- Les **préoccupations éthiques** autour des OGM.

- La **réglementation stricte** en matière de biosécurité. (Erickson, 2008)

V.3. Utilisation des nanotechnologies dans la bioremédiation enzymatique

V.3.1. Introduction aux nanotechnologies et nanomatériaux

Les nanotechnologies apportent de nouvelles propriétés physico-chimiques. Les **nanoparticules métalliques** (Ag, Fe₃O₄, Au), **nanotubes de carbone** et **matériaux hybrides bio-nano** sont les plus couramment étudiés. (Kumar *et al.*, 2014)

V.3.2. Nano-immobilisation enzymatique

L'immobilisation sur **nanoparticules** permet d'augmenter la surface de contact, protéger les enzymes de la dénaturation, et améliorer leur transport vers le substrat. (Wang *et al.*, 2013)

V.3.3. Effets des nanotechnologies sur la cinétique enzymatique

L'association enzymes-nanomatériaux peut **modifier la vitesse de réaction**, **réduire l'inhibition**, et permettre une **meilleure catalyse** dans des milieux complexes. (Zhou *et al.*, 2018)

V.3.4. Intégration dans des dispositifs hybrides

Les enzymes fixées sur des nanostructures sont utilisées dans :

- **Des bioréacteurs enzymatiques** pour les effluents industriels.

- **Des systèmes à libération contrôlée** de catalyseurs.

- **Des composites multifonctionnels** combinant plusieurs fonctions de dépollution.

(Singh *et al.*, 2011)

V.3.5. Risques et bioéthique

Malgré les avantages, des **préoccupations environnementales** subsistent :

- Toxicité des nanoparticules pour la faune et la flore.
- Bioaccumulation possible.
- Nécessité de réglementations strictes. (Nel *et al.*, 2006)

Ce chapitre a mis en évidence les diverses stratégies d'**optimisation enzymatique** allant de l'immobilisation classique aux technologies émergentes comme les **nanomatériaux** et **l'intelligence artificielle**. L'intégration de ces approches favorise une bioremédiation plus ciblée, plus efficace et respectueuse de l'environnement. Ces avancées ouvrent la voie à une **dépollution durable et intelligente**, intégrée aux principes de l'économie circulaire. (Saratale *et al.*, 2021)

Chapitre 6

Défis et perspectives

L'utilisation des enzymes immobilisées dans les procédés de bioremédiation et de transformation industrielle représente une avancée remarquable en biotechnologie. Toutefois, malgré les succès obtenus, de nombreuses contraintes techniques, économiques et environnementales persistent et limitent encore la généralisation de ces technologies à grande échelle.

Ce chapitre se propose d'examiner les principaux défis associés à l'application des systèmes enzymatiques, en abordant d'une part les limitations structurelles et financières, et d'autre part les préoccupations écologiques et sociales croissantes. Enfin, une attention particulière sera portée aux perspectives de recherche, en soulignant les innovations récentes et les axes de développement futurs, notamment dans les domaines de la nanotechnologie, de la bio-ingénierie et de l'économie circulaire.

VI.1. Contraintes techniques et économiques

L'utilisation des enzymes dans les procédés de bioremédiation présente un grand potentiel en matière de durabilité environnementale. Toutefois, la mise en œuvre à grande échelle de ces technologies enzymatiques se heurte à plusieurs contraintes techniques et économiques majeures.

VI.1.1. Coût de production élevé

La production industrielle des enzymes, notamment par génie génétique, demeure coûteuse. Cela résulte du besoin de systèmes d'expression performants, de milieux de culture spécifiques, ainsi que de procédés de purification complexes pour garantir une enzyme active et stable. Le coût peut encore augmenter lorsqu'une purification élevée est nécessaire pour éviter les interférences avec d'autres biomolécules présentes dans le milieu naturel ou industriel. Par conséquent, la rentabilité de ces procédés pose encore un défi dans les applications environnementales à large échelle. **(Chaplin & Bucke, 1990)**

VI.1.2. Stabilité limitée dans des conditions réelles

Même si les enzymes peuvent fonctionner dans des conditions optimisées au laboratoire, leur activité peut être fortement compromise dans des environnements réels qui présentent des variations de température, de pH, de salinité, et la présence d'inhibiteurs comme les métaux lourds. Les enzymes libres, notamment, perdent rapidement leur activité lorsqu'elles sont exposées à de telles conditions, ce qui limite leur efficacité dans des contextes industriels ou environnementaux variés. **(Palmer & Bonner, 2007)**

VI.1.3. Durée de vie et recyclabilité

Un autre obstacle technique est la faible durée de vie de certaines enzymes lorsqu'elles sont utilisées de manière continue dans des bioréacteurs ou dans des systèmes ouverts. Bien que les techniques d'immobilisation puissent améliorer cette durée de vie, elles entraînent souvent une réduction de l'activité enzymatique, compromettant ainsi l'efficacité globale du système. De plus, la récupération et le recyclage efficaces des enzymes restent technologiquement complexes et économiquement exigeants. **(Trevan, 1980)**

VI.1.4. Infrastructures et savoir-faire spécialisés

L'optimisation et l'exploitation des enzymes dans des systèmes de traitement environnementaux nécessitent des infrastructures spécifiques (fermenteurs, systèmes de contrôle, instrumentation analytique) et une main-d'œuvre hautement qualifiée. Le manque de compétences techniques dans certaines régions, notamment dans les pays en développement,

constitue un frein à la diffusion et à l'adoption généralisée de ces biotechnologies. (Crueger & Crueger, 2005)

VI.1.5. Compétitivité économique face aux solutions conventionnelles

Les méthodes conventionnelles de traitement des polluants, bien que parfois moins durables, sont souvent perçues comme plus économiques à court terme. L'utilisation des enzymes, bien qu'efficace et respectueuse de l'environnement, peine encore à s'imposer face à des technologies bien établies, en raison de son coût initial élevé et du retour sur investissement différé. Il est donc crucial de développer des stratégies de réduction des coûts, notamment via la réutilisation des enzymes, l'ingénierie de souches hyperproductrices, ou encore l'exploitation de coproduits industriels. (Demain & Solomon, 1986)

VI.2. Impact environnemental et acceptabilité sociale

VI.2.1. Effets positifs sur l'environnement

L'application des enzymes dans la dépollution environnementale offre une alternative verte aux traitements chimiques classiques. Les enzymes catalysent des réactions spécifiques à température et pression modérées, réduisant ainsi la consommation énergétique et la génération de sous-produits toxiques. Elles permettent de dégrader sélectivement des composés organiques dangereux comme les hydrocarbures, les colorants ou les pesticides, ce qui diminue la charge polluante des sols, des eaux et de l'air. Par conséquent, l'empreinte écologique des procédés enzymatiques est globalement faible. (Glick, Pasternak, & Patten, 2010)

VI.2.2. Risques environnementaux potentiels

Bien que les enzymes soient d'origine biologique, leur impact dépend du contexte d'application. Par exemple, des enzymes génétiquement modifiées ou produites à partir d'organismes recombinants pourraient susciter des préoccupations en matière de biosécurité. De plus, certains procédés d'immobilisation utilisent des supports ou des solvants non biodégradables, qui peuvent s'accumuler dans l'environnement s'ils ne sont pas correctement gérés. (Evans & Furlong, 2003)

VI.2.3. Acceptabilité sociale et perception publique

La perception sociale des technologies enzymatiques reste contrastée. D'un côté, le public est de plus en plus sensible aux technologies durables et respectueuses de l'environnement. Les enzymes bénéficient ainsi d'une image généralement positive, en particulier lorsqu'elles sont utilisées dans des domaines tels que le traitement des eaux usées ou la dépollution des sols.

D'un autre côté, l'utilisation de biotechnologies issues du génie génétique peut susciter des inquiétudes éthiques ou sanitaires, notamment en l'absence d'une communication transparente sur les processus de fabrication, les risques et les avantages. Il est donc essentiel d'accompagner le développement technologique par des campagnes d'information, une réglementation claire et une concertation avec les parties prenantes (citoyens, collectivités, ONG). (DaSilva, 2004)

VI.2.4. Réglementation environnementale

La mise en œuvre des procédés enzymatiques dans l'environnement est soumise à des réglementations strictes, en particulier lorsqu'il s'agit d'organismes recombinants ou d'applications in situ. Ces cadres juridiques, bien qu'indispensables pour garantir la sécurité, peuvent ralentir l'adoption à grande échelle de ces technologies innovantes. Il est donc nécessaire de faire évoluer la réglementation en faveur des biotechnologies propres, tout en assurant une évaluation rigoureuse des impacts environnementaux. (Rehm & Reed, 2001)

VI.3. Perspectives de recherche et innovations futures

VI.3.1. Optimisation des techniques d'immobilisation

Les recherches futures s'orientent vers le développement de techniques d'immobilisation plus efficaces, à faible coût et écologiquement responsables. L'intégration de matériaux hybrides (biosourcés et nanostructurés) permet une meilleure stabilité enzymatique, une augmentation de la surface de contact et une réduction des pertes d'activité. Ces supports intelligents pourront répondre aux défis actuels liés à la durabilité et à la régénéralité des catalyseurs biologiques. (Pandey, 2006)

Tableau 6 : Comparaison entre différentes techniques d'immobilisation enzymatique

Technique	Coût	Stabilité enzymatique	Réutilisabilité	Impact écologique
Adsorption physique	Faible	Faible	Moyenne	Faible
Liaison covalente	Élevé	Élevée	Élevée	Moyenne
Encapsulation (alginate)	Moyen	Moyenne	Moyenne	Bonne
CLEAs	Moyen	Élevée	Élevée	Bonne
Nanoparticules fonctionnalisées	Élevé	Très élevée	Très élevée	Excellente

Référence : Pandey, A. (2006). *Enzyme technology*. Springer.

VI.3.2. Intégration des nanotechnologies et de la bio-ingénierie

La convergence entre biotechnologie, nanotechnologie et science des matériaux ouvre la voie à des plateformes enzymatiques plus performantes. Par exemple, les nanotransporteurs peuvent être utilisés pour délivrer de manière ciblée des enzymes dans des environnements contaminés, ce qui améliore leur efficacité tout en limitant les impacts secondaires. Parallèlement, l'ingénierie des protéines permet de créer des enzymes mutantes plus stables, plus sélectives ou actives dans des conditions extrêmes. (Bhattacharyya & Banerjee, 2002)

Tableau 7 : Avantages de l'intégration nanotechnologique dans la catalyse enzymatique

Avantage principal	Exemple d'application	Résultat attendu
Augmentation de la surface active	Nanoparticules métalliques	Plus grande accessibilité du substrat
Ciblage spécifique des substrats	Nanocapsules enzymatiques	Moins de pertes enzymatiques
Stabilité en conditions extrêmes	Enzymes fixées sur nanomatériaux inorganiques	Activité prolongée
Réduction des doses enzymatiques	Supports poreux à haute affinité	Moins de consommation, plus d'efficacité

Référence : Bhattacharyya, B. C., & Banerjee, R. (2002). *Enzyme engineering and technology*. Oxford University Press.

VI.3.3. Développement de biocatalyseurs multifonctionnels

Les tendances émergentes visent à concevoir des biocatalyseurs capables d'agir sur plusieurs substrats ou d'enchaîner différentes réactions dans une seule étape. Ces systèmes dits "multi-enzymatiques" ou "cascade enzymatique" sont particulièrement adaptés aux procédés de traitement des polluants complexes (hydrocarbures, métaux lourds, déchets organiques). (Scragg, 2005)

Tableau 8 : Exemples de biocatalyseurs multifonctionnels dans la dépollution

Type de biocatalyseur	Fonction 1	Fonction 2	Application environnementale
Laccase + peroxydase	Oxydation	Réduction	Dégradation des colorants textiles
Lipase + estérase	Hydrolyse	Transestérification	Traitement des huiles usées
Enzymes nitroréductases	Réduction	Détoxification	Bioremédiation des composés nitroaromatiques

Référence : Scragg, A. H. (2005). *Biotechnology for sustainable development*. John Wiley & Sons.

VI.3.4. Enjeux de durabilité et économie circulaire

À long terme, l’objectif est d’intégrer pleinement les biotechnologies enzymatiques dans les logiques d’économie circulaire. Cela suppose de concevoir des procédés fermés, où les enzymes sont recyclées, les supports réutilisés, et les déchets valorisés en sous-produits utiles. Ces perspectives nécessitent une synergie entre recherche fondamentale, ingénierie appliquée et politiques publiques en faveur de l’innovation verte. (Glazer & Nikaido, 2007)

Tableau 9 : Principes d’une approche circulaire en biotechnologie enzymatique

Principe de durabilité	Application enzymatique	Avantage environnemental
Réutilisation du support	Support en chitosane recyclable	Réduction des déchets solides
Recyclage enzymatique	Enzymes stabilisées sur billes	Moins de consommation d’enzymes
Valorisation des coproduits	Transformation en biomatériaux	Réduction des pertes de ressource
Utilisation de matériaux verts	Supports biosourcés (cellulose)	Moindre empreinte carbone

Référence : Glazer, A. N., & Nikaido, H. (2007). *Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology*. Cambridge University Press.

En résumé, bien que l’immobilisation enzymatique constitue une solution prometteuse pour de nombreuses applications industrielles et environnementales, son déploiement reste entravé par des défis d’ordre technique, économique et écologique. L’intégration de technologies avancées comme les nanomatériaux, l’édition génétique et les biocatalyseurs multifonctionnels offre néanmoins de nouvelles opportunités pour surmonter ces obstacles. L’avenir de la biotechnologie enzymatique dépendra ainsi de la capacité des chercheurs et des industriels à innover tout en garantissant durabilité, acceptabilité sociale et viabilité économique. Une démarche interdisciplinaire et écoresponsable sera la clé pour transformer ces défis en leviers d’innovation

Conclusion

Face à l'ampleur croissante de la pollution environnementale causée par les activités humaines, la recherche de solutions durables et efficaces s'impose comme une priorité. La bioremédiation enzymatique s'inscrit dans cette dynamique en exploitant le pouvoir catalytique naturel des enzymes pour dégrader une large gamme de polluants organiques et inorganiques, tout en respectant l'équilibre des écosystèmes.

Tout au long de ce travail, nous avons mis en évidence le rôle central des enzymes, en particulier les oxydoréductases, les hydrolases et certaines lyases, dans les processus de détoxification de divers contaminants tels que les hydrocarbures, les pesticides, les métaux lourds et les effluents industriels. Leur efficacité repose sur leur spécificité, leur rapidité d'action ainsi que leur potentiel à être optimisées grâce à des approches innovantes telles que l'immobilisation, l'ingénierie enzymatique et les nanotechnologies.

Cependant, malgré les résultats encourageants obtenus en laboratoire, plusieurs défis subsistent quant à leur application à grande échelle : instabilité enzymatique, coûts de production élevés, variabilité des conditions environnementales et acceptabilité sociale des biotechnologies environnementales. Ces obstacles soulignent la nécessité de renforcer la recherche interdisciplinaire pour améliorer la performance des systèmes enzymatiques et favoriser leur intégration dans des stratégies de gestion environnementale globales.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Ademe., 2006. Agence de l'environnement et de la Maitrise de l'Energie, France.
- Alais C., Linden G. et Mielo L. (2008). Biochimie alimentaire, DUNOD. 6ème édition, paris, pp.67-71.
- Alexander M (1994) Biodegradation and bioremediation. Academic, Boston, MA.
- Alvarez, A., Saez, J.M., Costa, J.S.D., Colin, V.L., Fuentes, M.S., Cuozzo, S.A., Benimeli, C.S., Polti, M.A., Amoroso, M.J., 2017. Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. Chemosphere 166, 41–62.
- Arnaud, A., C. Berset, J. Bocquet, M. Bouix, Y. Cerisier E G.F. Cuvellier, D. De Nettancourt, J.M. Engasser, P. GaW, J. Goursaud, M. Cnrenini, J.P. Guiraud, A. Iwen4 C. JupiqJ.-M. Lebeault, J.-Y. Leveau, J. Martial, C. Mawas, F. Normand-Plessieq S. Pierrard, J. Pourqug P.-J. Raugel, H. Richard, H. Steenbrugge, E. Teoule, D. Thomas et J.-P. Vandecasteele (1993). Biotechnologies. 4ième ed, Scriban R. (éd), Technique et Documentation La voisie E Paris, France, 904 pages.
- Aviron-Violet P., Baret J.L., Bertrand C., Blazy B., Bouvier F. (1982). Les enzymes: Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. pp.23;123;140–153.

B

- Benaouida K. (2008). Étude de l'alpha amylase de levure isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Thèse magister. Biotechnologie microbiennes. Constantine. UM. 104p.
- Bergmeyer H.U., Gawekn K., *et al.* (1979). Principes de l'analyse enzymatique. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17.
- Bertrand, J.C. et Mille, G., 1989. Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. In: Bianchi, M., Marty, D., Bertrand, J.C., Caumette, P. et Gauthier, M.J. (Eds.), Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. Masson (Paris), Chapitre 13, pp. 343-385.
- Bhattacharyya, B. C., & Banerjee, R. (2002). Enzyme engineering and technology. Oxford University Press.
- **Bilal M., Adeel M., Rasheed T., YupingZ., Hafiz M.N. et Iqbal C., 2019.** Contaminants émergents très préoccupants et leur biodégradation assistée par des enzymes. Environnement international, 124: 336-353.
 - Biotechnology, 32(4), 66.

- Bireche .Y et Berregui F., 2014. Effet de la salinité sur l'activité des bactéries hydrocarbonoplaste. Master Académique. Spécialiste microbiologie appliquée. Filière :Biologie. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 64p.
- Bogan B.W., Lamar R.T., Burgos W.D. et Tien M. (1999). Extent of humification of anthracene, fluoranthene and benzo (a) pyrene by *Phanerochaete chrysosporium* during growth in PAH-contaminated soils. *Lett. in Appl. Microbiol.* 28: 250-254.
- Boopathy, R. (2000). Factors Limiting Bioremediation Technologies. *Bioresource Technology*, 74(1), 63-67. Available at: <https://goo.gl/eQhPh7>.
- Boudershem Amel. Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures, 2011, p12.

C

- Casazza, A. A., Converti, A., & Asfora Sarubbo, L. (2020). Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. *Energies*, 13(18), 4664.
- Chaplin, M. F., & Bucke, C. (1990). *Enzyme technology*. Cambridge University Press.
 - Colombano, S.A.Saada , V.Guerin ,P ,(2010) :Rapport Final de Quelles techniques pour quels traitements _ Analyse couts –bénéfices, BRGM 58609-FR.
- Crueger, W., & Crueger, A. (2005). *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology* (2nd ed.). Panima Publishing.
 - Cydzik-Kwiatkowska, A., & Zielińska, M. (2016). Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World Journal of Microbiology and Da Silva, S., Gonçalves, I., Gomes de Almeida, F. C., Padilha da Rocha e Silva, N. M.,*

D

- Dalev P.G. (1994). Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresour. Technol.*, 48; 265–267.
- DaSilva, E. J. (2004). *Biotechnology and the developing world*. United Nations University Press.
- Demain, A. L., & Solomon, N. A. (1986). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology.
 - Drouin M. (2005). Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître Des sciences (MSc.). Canada.

E

- El Fantroussi S, Agathos SN. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*.2005;8:268-275. Available at: <https://goo.gl/y6kLsc>.
- Evans, J., & Furlong, J. C. (2003). *Environmental biotechnology: Theory and application*. Wiley-Blackwell.

F

- **FengS., NgoH.H., Guo W.S., ChangB.W.,Nguyen D.D.,chengD., Varjani S., ZhongfongL. et Yi Liu G., 2021.** Rôles et applications des enzymes pour l'élimination des polluants résistants dans le traitement des eaux usées. *Technologie des bioressources*, 125-278 p.
 - Fickers P., Destain J. & Thonart P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : Principales caractéristiques et application. *Biotechnol.Agron. Soc. Environ*.12: 119-130.
 - Fulekar Mh. 2009. Bioremediation of fenvalerate by *Pseudomonas aeruginosa* in a scale up bioreactor. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(6): 4900-4905.

G

- Geraldine S., MalaJ., Satoru T. (2009). *Perspectives on Lipase Enzyme Technology* .Pp 147.
- Gianfreda, L., Rao, M. A., & Piotrowska-Długosz, A. (2020). Enzyme-based strategies for remediation of contaminated environments. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 14, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.01.002>
 - Girard M.C., WALTER C., REMY J. C., BERTHLIN J. ET MOREL.J.I., 2005.Sol et environnement. Edition DUNOD. Paris.529.
- Glazer, A. N., & Nikaido, H. (2007). *Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology* (2nd ed.). Cambridge University Press.
- Glick, B. R., Pasternak, J. J., & Patten, C. L. (2010). *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA* (4th ed.). ASM Press.
 - Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 59; 15–32.
 - Gupta R., Gupta N et Rathi P. (2004). Bacterial lipases: an over view of production, purification and biochemical properties.*Appl Microbiol Biotechnol*.64, 763–781.

H

- Haritash A.K. et Kaushik C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. 169: 1–15.
- Hasan F., Ali Shah A. & Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 235251.
- Headon, D., & Walsh, G. (1994). The industrial production of enzymes.
- Hongwei, Y., Zhanpeng, J., & Shaoqi, S. (2004). Anaerobic biodegradability of aliphatic compounds and their quantitative structure biodegradability relationship. *Science of the total Environment*, 322(1-3), 209-219.

J

- Janaki T. (2017). Enzymes From Actinomycetes. *International Journal of Chem Tech Researc*.10(2): 176-182.
- Jarrar, H. (2011). Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles. école nationale supérieure de chimie de montpelier.
- Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., & El Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: Involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. *Bioremediation and Biodegradation*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1139/er-2013-0001>

K

- Kumar A, Bisht BS, Joshi VD, Dhewa T (2011) Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. *Int J Environ Sci* 1(6):1079–1093.
- Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G. (2008a). Purification of extracellular acid protease and analysis offermentation metabolites by Synergistessp. Utilizing protein aceoussolid waste from tanneries. *Bioresour. Technol.*, 99; 2364–2372.
- Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C. (2008b). Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res.J.Microbiol.*, 3(12); 661–672.

L

- Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O. (2001). Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.
- Lo H.F., Lin L.L., Chen H.L., Hsu H.H., Chang C.T. (2001). Enzymatic properties of a SDS resistant *Bacillus* sp. TS-23 Alpha-amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. (36):743-750.

M

- Madhavi GN, Mohini DD. Review paper on parameters affecting bioremediation. International Journal of Life Science and Pharma Research. 2012;2:77-80. Available at: <https://goo.gl/tBP2C6>.
- Malhotra, R., Noorwez, S. M., & Satyanarayana, T. (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. Letters in Applied Microbiology, 31(5), 378-384.
- Mamo G., Gessesse A., (1999). Purification and characterization of two raw-starch digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus*. Enzyme and Microbial Technology. (25): 433-438.
- Mani D, Sharma B, Kumar C, Pathak N, Balak S (2012) Phytoremediation potential of *Helianthus annuus* L. in sewage irrigated Indo-Gangetic alluvial soils. Int J Phytoremediation 14:235–246.
- Martin, M.T., Plou, F.J., Alcalde, M., & Ballesteros, A. (2003). Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 21(4-6), 299-308.
- Mounier, J. (2013). Caractérisation fonctionnelle de gènes de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* lors du développement de biofilms sur composés organiques hydrophobes ; Thèse présentée à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour - UPPA Ecole doctorale des sciences exactes et leurs applications.
- Mukhtar S., Ahmad Zaheer., Dalaq Aiysha., Kauser Abdulla Malik., and Samina Mehnaz. (2017). Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. Journal of Proteomics & Bioinformatics. Vol, 10: 316-319

N

- Nait Abdelkader, S., & Djenad, M. (2015). Essai de remédiation d'un sol pollué aux hydrocarbures par biostimulation cas des stations-service (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Najjar A. (2010). Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive.
- Nielson J.E., Borchert T.V et Vriend G. (2001). The determinant of α -amylase pH activity profiles. Protein Engineering. Oxford University Press. 14(7), p: 505-512.
- Novo Nordisk. (1997). Novo Nordisk Annual Report 1996 : .Enzyme Business.31 page.

O

- Obayori S.O. et Salam L.B. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: role of plasmids. *Sci Res Ess.* 5(25):4093–4106.
- **Ouali M.S., 2017.** Cours de procédés unitaires biologiques et traitement des eaux. Ingénierat en chimie industrielle option : Génie de l'Environnement. Edition : 2.10.4334.

P

- Palmer, T., & Bonner, P. (2007). *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry* (2nd ed.). Woodhead Publishing.
- Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V. T., Singh D. et Mohan R. (2000). *Advances In. Microbial amylases. Biotechnology. Appl. Biochem.* (31), pp.135-152.
- Pandey, A. (2006). *Enzyme technology.* Springer.
- Patel R., Dodia M., Singh S.P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp: Production and optimization. *Proc.Biochem.*, 40; 3569– 3575.
- Pelmont J. (1995). *Enzymes: catalyseurs du monde vivant.* Presse Universitaire de Grenoble. pp.7; 621; 652–654.
- Pierre F. (2000). *Livre le grain de blé : Composition et utilisation.* Edition Quae. Pp123,
- Purnomo, A. S., Kamei, I., & Kondo, R. (2011). Degradation of chlorinated phenols by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biodegradation*, 22(2), 265–274. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9414-1>

R

- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 62; 597–635.
- Rehm, H. J., & Reed, G. (2001). *Biotechnology: Environmental Processes* (Vol. 11). Wiley-VCH.

S

- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. (2005b). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc.Biochem.*, 40; 2689–2694.
- Sasson A, (1967)-Recherche ecophysiologique sur la flore bactérienne du sol des régions arides du Maroc, RABAT ,1967,p277.

- **Sawadogo B., 2018.** Traitement des eaux usées industrielles par des procédés membranaires sous climat sahélien: cas des eaux usées de brasserie au Burkina Faso. Thèse de doctorat en génie de procédés. Université Montpellier; Institut international d'ingénierie de l'eau et de l'environnement. France. 196p.
- Scragg, A. H. (2005). *Biotechnology for sustainable development*. John Wiley & Sons.
 - Sharma, S., 2012. Bioremediation: features, strategies and applications. *Asian J. Pharm. Life Sci.* 2231, 4423.
 - Sikkema, J., de Bont, J.A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201–222.
- Singh, H., & Ward, O. P. (Eds.). (2004). *Biodegradation and bioremediation*. Berlin, Germany: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-05746-3>
 - Soltani M, (2004). Distribution lipidique et voies métabolique chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique.284.
 - Suarez Beltrán, R. M. (2013). Guía de métodos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos.
 - Sumantha A., Larroche C., Pandey A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol.Biotechnol.*, 244; 211–220.

T

- Terrat,S,(2001), Nouveaux design de sondes pour biopuces AND fonctionnelles et caractérisation des capacités de biodégradation des communautés bactériennes de sol pollués par des hydrocarbures, Thèse de doctorat, université Blaise Pascal, Ecole doctorale des sciène de vie et de la sante, p41.
 - Tolan J-S. (1996). Pulp and paper. In: Godfrey T,West S., editors. *Industrial enzymology*, 2nd ed. New York: Stockton Press, pp.327-38.
 - Traitement biologique des sols pollués : recherche et innovation,<http://www.ademe.fr>.
- Trevan, M. D. (1980). *Immobilized enzymes: An introduction and applications in biotechnology*. John Wiley & Sons.

V

- Van Der Maarel MJ, Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. et Dijkhuizen L. (2002). Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family.*Biotechnol*; 94, pp.137-55.

➤ Vidali, M. (2001). Bioremediation: An overview. *Pure Applied Chemistry*, 73:1163-1172.

Y

➤ Yihan L., Fyping L., Guanqun C., Crystal L., Snyder J., Sunyu L., Jianling W., Jing X., (2010). High-level expression, purification and characterization of a recombinant medium temperature α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Lett.* (32):119–124.

➤ Young L.Y. et Cerniglia C.E. (1995). *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley, New York, pp: 77–125.

Z

➤ Zhanpeng, J., HONGWEI, Y., LI XIN, S., SHAOQI, S. (2002). Integrated assessment for aerobic biodegradability of organic substances. *Chemosphere P 48* 133-138.

➤ **Zhuo R. et Fan F., 2021.** Un aperçu complet de l'application des champignons de la pourriture blanche et de leurs enzymes lignocellulolytiques dans l'élimination des polluants organiques. *Science de l'environnement total*.