

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE CONSTANTINE 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

N° d'ordre :

N° de série :

Mémoire
Présenté pour l'obtention
Du Diplôme de Master
En Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Micro-organismes

Par :
BADER Romeila
&
HARROUDJ Ryma

Thème :
**Production de Chitinases par des Actinomycètes d'origine
rhizosphérique et clinique**

Soutenue le : 25 juin 2014

Membres du jury :

Président :	Mr. Necib Y.	Professeur	U. Constantine 1
Rapporteur :	Mr. Boulahrouf A.	Professeur	U. Constantine 1
Co-Rapporteur :	Mr. Merouane F.	Doctorant	U. Constantine 1
Examineur :	Mr. Benkahoul M.	M.A	U. Constantine 1

Année universitaire: 2013 - 2014

Remerciements

Ce travail a été réalisé, au Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine 1.

*Nous remercions en premier lieu Monsieur le Professeur **Boulaïrouf A.** pour sa contribution scientifique et technique sans laquelle il n'aurait pas été possible d'atteindre les objectifs de ce mémoire de manière satisfaisante, ainsi que pour ses qualités humaines si précieuses, pour sa gentillesse, sa dévotion, et sa grande générosité, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*Nous tenons à remercier tout particulièrement Mr. **Merouane F.** pour tous ses précieux conseils, et ses encouragements. Nous tenons aussi à lui témoigner toute notre reconnaissance pour toute l'aide qu'il nous a apporté tout au long de notre stage.*

*Nos remerciements vont également à Madame **Benkahoul M.** d'avoir participé au jury ainsi que Monsieur le Professeur **Necib Y.** d'avoir accepté de le présider.*

Un grand merci à nos familles respectives pour leur soutien et leur affection sans retenue au cours de nos longues années d'études.

Sans oublier l'ensemble des personnes qu'on a croisées au L.G.M.A. qui en ont fait un lieu peu banal à nos yeux, nos collègues et amis(es), ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

01

Revue Bibliographique

- 1. **Chitinases : Généralités**03
- 2. **Chitinases et microorganisme**04
- 3. **Propriétés basiques des chitinases bactériennes**05
- 4. **Actinomycètes, producteurs de chitinase**05
- 5. **La chitine, substrat de la chitinase**08
- 6. **Biodégradation de la chitine**09
- 7. **Applications potentielles de la chitinase**10

Matériel & Méthodes

- 1. **Microorganismes**13
- 2. **Mise en évidence de l'activité chitinolytique**13
- 3. **Préparation de la chitine colloïdale**14
- 4. **Optimisation des conditions de culture pour la production de chitinase**14
 - 4.1. Effet du temps d'incubation14
 - 4.2. Effet du pH15
 - 4.3. Effet de la température15

5. Dosage de l'activité chitinolytique	15
6. Mesure de la biomasse	16
7. Extraction et purification partielle de l'enzyme	16
8. Test d'activité antifongique	17

Résultats & Discussion

1. Mise en évidence de l'activité chitinolytique sur milieu solide	18
2. Optimisation des conditions de cultures pour la production de chitinases corrélée à la biomasse sur milieu liquide	20
2.1. Effet du temps d'incubation	20
2.2. Détermination des optimums de pH et de température	21
3. Extraction et purification partielle de l'enzyme	23
4. Test d'activité antifongique	24

Conclusion & Perspectives

.....27

Références bibliographiques

.....28

Annexes

.....39

Liste des tableaux

Tableau 1. Les Chitinases produites par différentes espèces d'actinomycètes	07
Tableau 2. Les souches actinomycètes sélectionnées pour la mise en évidence de l'activité chitinolytique.....	13
Tableau 3. Effet du pH et de la température sur le diamètre des zones d'hydrolyse	18
Tableau 4. Concentration de l'extrait enzymatique.....	24
Tableau 5. Activité antifongique de l'extrait enzymatique concentré de la souche GF 44b	24

Liste des figures

Figure 1.	Structure de la chitine.....	08
Figure 2.	Enzymes impliquées dans l'hydrolyse de la chitine et du chitosane.....	10
Figure 3.	Mise en évidence de l'activité chitinolytique à pH 7, 30° C.....	19
Figure 4.	Dégradation de la chitine colloïdale par la souche GF 44b sur milieu CCA, à pH 9, 30°C.....	19
Figure 5.	Effet du temps d'incubation sur la production de chitinases et de biomasse.....	20
Figure 6.	Effet du pH sur la production de chitinases et de biomasse.....	22
Figure 7.	Effet de la température sur la production de chitinases et de biomasse.....	22
Figure 8.	Test d'activité antifongique.....	25

Liste des abréviations

CaCO₃: Carbonate de calcium

CCA: Colloïdal - Chitin - Agar

CIP: Collection de l'institut Pasteur

CMC : Carboxy méthyl cellulose

CYS: Chitin - Yeast extract - Salts

DNS : 3,5- acide dinitrosalicyclique

DO : Densité optique

FeSO₄ : Sulfate de fer

GlcNAc : N-acetyl glucosamine

HCl : Acide chlorhydrique

ISP : International Streptomyces Project

K₂HPO₄: Phosphate dipotassique

KH₂PO₄ : phosphate monopotassique

kDa : kilodalton

MgSO₄: Sulfate de magnésium

MnCl₂ : Chlorure de manganèse

PDA : Potato - Dextrose - Agar

rpm: rotation par minute

U/mL/Min : Unité enzymatique /millilitre /minute

μmol : Micromole

mM : Millimolaire

INTRODUCTION

Aujourd'hui, avec l'utilisation massive des produits phytosanitaires dans les jardins et les champs, il existe un réel risque de contamination chimique des cultures, des sols et des nappes phréatiques, ainsi que la destruction des insectes et des microorganismes bénéfiques pour l'agriculture. La réduction de la pollution environnementale causée par les antifongiques et les pesticides chimiques a conduit à de nouvelles perspectives sur le système de contrôle de l'environnement et sa mise à niveau.

Un des nouveaux moyens de lutte contre les maladies des végétaux, notamment celles causées par des champignons, et qui n'ont pas d'effets indésirables, est l'utilisation des méthodes de lutte biologique. Contrairement aux molécules synthétiques, les matières microbiologiques qui sont moins toxiques, sont plus efficaces, facilement biodégradables et peu allergènes. En outre, ces dernières ne sont pas accumulées dans les produits alimentaires et sont également peu coûteuses et appropriées pour une utilisation à l'échelle industrielle [75].

Dans la nature, divers microorganismes présentent des capacités différentes de biodégradation des molécules organiques, aussi variées que récalcitrantes et cela en produisant différentes enzymes hydrolytiques spécifiques aux différents substrats. Parmi ces microorganismes, on trouve les Actinobactéries qui semblent être d'excellentes productrices de substances aux propriétés intéressantes. Ces bactéries Gram positifs forment un grand groupe de procaryotes, les plus importants dans la nature [44]. Elles sont rencontrées dans tous les écosystèmes : sols polaires, sols désertiques, sols contaminés, sols cultivés, sols forestiers, débris végétaux ainsi que dans les eaux.

Continuellement de nouveaux métabolites à différentes activités biologiques sont isolés des actinomycètes, notamment les enzymes, qui après les antibiotiques sont les produits les plus importants des actinomycètes [51].

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle central dans le monde vivant. Elles sont des macromolécules qui reconnaissent spécifiquement certaines molécules et accélèrent les réactions de transformation de ces molécules [70]. La chitinase fait partie des enzymes produites par les actinomycètes qui hydrolysent la chitine au niveau de la liaison glucosidique β (1-4) Nacétylglucosamine.

Récemment, les chitinases ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leur application possible dans le contrôle biologique des organismes contenant de la chitine et aussi pour l'exploitation des matières naturelles chitineuses [66].

Les chitinases sont actuellement largement utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes en raison de leur aptitude à dégrader la paroi cellulaire fongique.

Chez les champignons la chitine constitue 22 à 44% des parois cellulaires des hyphes mycéliens [59]. En outre, la capacité de la chitinase à hydrolyser la chitine, la rend très utile pour la production de divers produits tels que les facteurs de croissance et les protéines unicellulaire [22].

Vu l'importance des chitinases, des souches actinomycétales d'origine rhizosphérique et clinique ont été sélectionnées dans ce travail, afin de tester leur capacité à dégrader la chitine.

Les objectifs de cette étude sont :

- de sélectionner la meilleure souche productrice sur milieu solide de chitinase ;
- d'optimiser la production de chitinase par la souche sélectionnée ;
- d'extraire l'enzyme afin d'effectuer un test d'activité antifongique.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les chitinases : *Généralités*

Les enzymes chitinolytiques impliquées dans les processus de dégradation de la chitine sont nombreuses. Parmi elles, les chitinases.

Les chitinases sont des glycosides hydrolases, qui assurent la rupture des liaisons β -1,4 glycosidiques qui lient les carbones C₁ et C₄ de deux résidus N-acétylglucosamine consécutifs. Nous distinguons, généralement, deux catégories de chitinases : les endo et les exo. Les premières, également nommées poly [1,4-(N-acétyl- β -D glucosaminide)] glycanohydrolases (EC 3.2.1.14) hydrolysent les liaisons internes des microfibrilles de chitine pour libérer des fragments de chitobiose, chitotriose et chitotétraose composés respectivement de deux, trois ou quatre unités N-acétylglucosamine. Les secondes, nommées exochitinases ou β -N-acétylhexosaminidases (EC 3.2.1.52), participent à la dégradation complète des fragments de chitine. Parmi ces exochitinases, les chitobiosidases libèrent des diacétylchitobioses à partir des extrémités non-réductrices de la chitine [38] et les β -D-acétylglucosaminidases hydrolysent ces diacétylchitobioses en monomères de N-acétylglucosamine [15].

Si la production de chitine est une propriété de certaines cellules animales et fongiques, les chitinases sont des enzymes que nous retrouvons chez l'ensemble des organismes vivants qu'ils soient procaryotes, eucaryotes ou de type viral. Les chitinases ont été regroupées en cinq classes qui constituent deux familles distinctes de glycosides hydrolases, en fonction de différents facteurs, parmi lesquels leur séquence N-terminale, leur localisation et leurs propriétés biochimiques [31, 67]. Les chitinases appartenant à la famille 18 rassemblent plus de 180 enzymes présentes chez les eucaryotes, les procaryotes et les virus, et réparties au sein des classes III et V. La famille 19 regroupe plus de 130 composés essentiellement d'origine végétale et formant les classes I, II et IV [30].

Le rôle des chitinases varie en fonction des organismes qui les produisent. Elles peuvent participer aux processus de nutrition, de croissance ou bien de défense. Les chitinases sont également impliquées dans certains mécanismes de pathogénicité.

2. Chitinases et microorganismes

Les chitinases sont présentes chez de nombreux microorganismes eux-mêmes dépourvus de chitine, mais pour lesquels la chitine constitue une source de nutriments. Ainsi, les bactéries chitinolytiques marines, d'eau douce ou du sol produisent des chitinases qui participent à la biodégradation et au recyclage des chitines produites annuellement dans leur écosystème respectif. Les chitinases bactériennes sont également impliquées dans des processus digestifs [15, 67]. En effet, les bactéries du genre *Streptomyces* produisent des enzymes chitinolytiques qui, en modifiant la composition des structures chitineuses, favorisent leur adhésion au substrat et la pénétration de leur hôte au niveau des lésions formées sur l'exosquelette des Arthropodes [12, 78]. Certaines chitinases bactériennes facilitent également la dégradation de la chitine du puparium de certains insectes, favorisant ainsi l'émergence des adultes [37]. Les chitinases produites par les bactéries de la microflore intestinale de nombreux animaux (poissons, oiseaux, ...) facilitent les processus de digestion des aliments composés de chitine.

Des gènes de chitinase ont également été identifiés dans le génome du baculovirus *Autographa californica*, inféodé aux arthropodes [29]. Chez ce baculovirus, les chitinases jouent un rôle crucial dans les processus d'infection virale, plus particulièrement lors des phases de pénétration du virus dans l'organisme attaqué [86, 76]. Cette chitinase virale entraîne même une liquéfaction des tissus du lépidoptère *Trichoplusia ni* infecté [29].

De nombreux protozoaires et métazoaires parasites des tractus digestifs présentent la capacité de synthétiser des chitinases. Parmi ces parasites, nous trouvons des filaires, des amibes, des trypanosomes, des plasmodiums [34]. Chacun de ces microorganismes utilise la chitine et les chitinases différemment et spécifiquement selon le stade de son développement [79]. Les chitinases produites par les procaryotes facilitent les processus de colonisation de leurs insectes hôtes qui leur servent de vecteurs.

3. Propriétés basiques des chitinases bactériennes

À travers les années, plusieurs espèces bactériennes chitinolytiques ont été sélectionnées pour leurs diverses applications. [1, 2, 14].

La taille des chitinases varie largement, elle est comprise entre 20 et 90 kDa selon leur origine. Entre 20 et 60 kDa pour les chitinases bactériennes et végétales, et entre 40 et 85 kDa pour celles des insectes.

Les chitinases bactériennes sont actives dans un large intervalle de température et de pH. Par exemple, les endochitinases de *Streptomyces violaceusniger* [80] et la chitinase thermostable de *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 [87] ont des températures optimales d'action de 28°C et de ~80°C respectivement. Cette dernière enzyme est active à un pH optimum compris entre 8,0 et 10,0 [87], alors que la chitinase isolée de *Stenotrophomonas maltophilia* C3 a un pH optimum compris entre 4,5 et 5,0 [93].

Cette capacité d'action optimale des chitinases bactériennes dans un large spectre de température et de pH, permet leur utilisation dans diverses applications sous différentes conditions.

4. Actinomycètes, producteurs de chitinases

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes appartenant à l'ordre des *Actinomycétales*. Cet ordre regroupe des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en "guanine + cytosine" relativement élevé dans leur ADN (G + C > 55%) et dont la majorité forme un véritable mycélium ramifié (**Bergey Manuel, 1994**). Les actinomycètes sont des eubactéries chimio-organotrophes, hétérotrophes, aérobies strictes ou microaérophiles, dont plusieurs produisent des spores non mobiles ou parfois mobiles. Ces microorganismes présentent un cycle de développement cellulaire asexué similaire à celui des champignons imparfaits [50]. Ils sont universellement répandus. Nous les trouvons dans différentes niches écologiques telles que : sols, air, fumier, composts, foin, débris végétaux, résidus fibreux de cannes à sucre, pollen des plantes, sédiments marins, lacs, rivières, mers et océans, glaciers, déserts, sols pollués, lacs alcalins, milieux salins [27, 44, 45].

Ces microorganismes produisent une pléthore de molécules ayant de nombreuses applications dans divers domaines et de ce fait, présentant un fort intérêt pour les industriels (antibactériens, antifongiques, insecticides, herbicides, antiparasites, acaricides, antivirales, anti tumoraux, antimitotiques, anti allergénique, protéases alcalines, glucose isomérase, vitamines ...) [9]. Par ailleurs, les actinomycètes ont un rôle écologique. Ils possèdent la capacité de dégrader des molécules complexes non dégradées par les champignons ou les autres bactéries telles que la cellulose, la lignine, et la chitine, contribuant ainsi à la fertilisation des sols.

Les actinomycètes Chitinolytiques sont courants dans la nature où ils jouent un rôle important dans la dégradation de la chitine, deuxième polymère naturel en abondance après la cellulose [10]. La Chitinolyse est une caractéristique très courante chez les Streptomycètes isolées du sol, alors que très peu d'études sont rapportés sur les chitinases des autres genres d'actinomycètes dits rares [28, 24].

En 1995, **Mitsutomi et al.**, rapportent la purification de deux nouvelles chitinases, C1 et C2 à partir de la souche *Streptomyces griseus* HUT 6037. Le poids moléculaire des deux enzymes est de 27 kDa avec une température optimale d'action de 55°C. C'est la première étude qui décrit la capacité des chitinases à hydrolyser les liaisons β -glucosaminidiques en des unités plus simples de N-acétylchitosane [56].

L'agent de biocontrôle antifongique *Streptomyces lydicus* WYEC108 est capable non seulement, de détruire les oospores de *Pythium ultimum*, mais aussi les parois cellulaires des hyphes fongiques [91]. Pour la souche WYEC108 l'addition de chitine extraite à partir des parois cellulaires fongiques dans le milieu de culture peut induire une production de grandes quantités de chitinases, alors qu'en absence de chitine, la production d'enzymes est négligeable. La chitinase produite par *Streptomyces lydicus* WYEC108 est aussi induite par la chitine colloïdale, le N-acetylglucosamine et les chitooligosaccharides. Par contre la synthèse de chitinase est réprimée par des fortes teneurs en glucose et carboxyméthyl cellulose (CMC) [53].

Hoster et al. [32], isolent la chitinase IS à partir de la souche *Streptomyces griseus* MG3, cette enzyme montre une activité très élevée dans un large intervalle de pH, incluant les pH acides et alcalins. Cette propriété en plus de sa capacité à inhiber la croissance des champignons phytopathogènes la rend très utile pour une application comme agent de lutte biologique.

El-Sayed et al., ont identifiés deux chitinases A et B, purifiées à partir du surnageant d'une culture de *Streptomyces albocinaceus* S-22. Ces dernières montrent un important potentiel antifongique qui se traduit par une lyse cellulaire. Elles ont un poids moléculaire de 43 et 45 kDa, et sont actives à un optimum de température et pH de 40°C et 6 respectivement [20].

L'endochitinase isolée par **Shekhar et al.** [80], à partir de *Streptomyces violaceusniger* XL-2 est une protéine de 28,25 kDa, cette enzyme montre une activité de biocontrôle contre les mycètes cellulolytiques comme *Phanerochaete chrysosporium*, seulement en présence de chitine comme source de carbone dans le milieu de culture. Actuellement, des travaux portent sur l'isolement du gène de l'endochitinase de *S. violaceusniger* XL-2 pour être cloné dans un vecteur adéquat afin d'optimiser la production de cette enzyme. Plusieurs gènes codant pour les chitinases ont été clonés à partir de *Streptomyces* sp. Ces dernières ont plusieurs applications dans divers domaines [7, 23, 57].

Tableau 1. Chitinases produites par différentes espèces d'actinomycètes.

Actinomycètes	Substrat	Source	Activité chitinase (U/mL)	Références
<i>Streptomyces lydicus</i>	Chitine colloïdale	Rhizosphère de la plante <i>Linum usitatissimum</i>	2,26	Brinda et al., 1997 [10].
<i>Streptomyces</i> sp	Chitine colloïdale	Sol	2,98	Gomes et al., 2000 [24].
<i>Streptomyces griseus</i>	Chitine colloïdale	Culture stock	-	Ohno et al., 1996 [66].
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Chitine colloïdale	Feuilles, tiges, et les racines des plantes	0,0833 (mU/mL)	Taechowisan et al., 2003 [85].
<i>Streptomyces diasitapiticus</i>	Chitine colloïdale	Insecte : <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> (Larve et adulte)	2,3	Crawford et al., 1993 [16].
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Chitine colloïdale	Filtrat de culture	1,13	Tsujibo et al., 1993 [87].

5. La chitine, *substrat de la chitinase*

Avec au moins 10 gigatonnes synthétisées et dégradées chaque année dans la biosphère [60], la chitine est le second polysaccharide le plus représenté dans la nature après la cellulose. Elle fut isolée et décrite pour la première fois en 1823 par Odier à partir de cuticules d'insecte [18].

Absente du règne végétal, elle est une structure de soutien chez les champignons et les animaux. Chez les champignons où elle constitue 22 à 44% des parois cellulaires des hyphes mycéliens, la chitine est associée à des glycoprotéines [59, 74]. La synthèse de chitine est un processus ancestral de la cellule animale [38], c'est pourquoi le règne animal est le principal producteur de chitine. Nous la trouvons chez les cnidaires, les brachiopodes, les pogonophores, les annélides. Elle est aussi présente à des teneurs variables (de quelques traces à 75%) dans les téguments de nombreux invertébrés tels les mollusques ou les nématodes. Ce polymère occupe une place majeure chez les arthropodes. Son association avec des protéines et des minéraux lui confère des propriétés de résistance et de flexibilité. Par sclérotisation ou minéralisation, ces complexes chitino-protéiques sont à l'origine de la mise en place des éléments exosquelettiques (cuticule, proctodeum, stomodeum, trachées) et de la membrane péritrophique des arthropodes. La coloration des cuticules provient en partie de la conjugaison de chitine avec des caroténoïdes [59].

La chitine est un homopolysaccharide composé d'unités N-acétyl- β -D-glucosamine liées entre elles par des liaisons glycosidiques (1 \rightarrow 4). Sa structure est similaire à celle de la cellulose, mais diffère par la présence des groupements N-acétylés sur les carbones C2 des glucoses (**Figure 1**). La synthèse de la chitine implique de nombreuses enzymes. La phosphorylation et l'action d'isomérases permettent de transformer le D-glucose en D-fructose-6-phosphate qui, sous l'effet de transaminase, conduit à l'obtention de glucosamine.

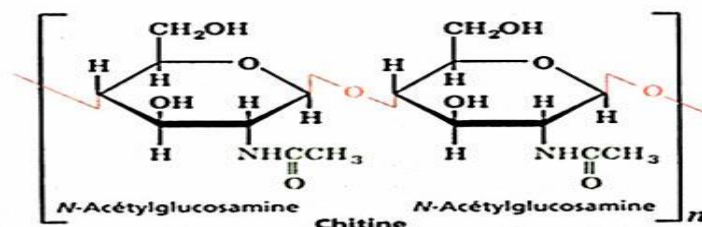


Figure 1. Structure de la chitine

Cette molécule est ensuite transacétylée pour donner des unités N-acétyl-glucosamine phosphatées, dont l'association est réalisée par des chitines synthases à partir de l'uridinediphosphate- N-acétylglucosamine.

Contrairement à la cellulose, dont une seule forme cristalline est décrite en conditions naturelles, la chitine est une substance polymorphe présentant trois formes cristallines. L' α -chitine constituée de chaînes antiparallèles est la forme la plus stable et la plus abondante [55]. Nous la trouvons chez les arthropodes et les champignons. La β -chitine, constituée de chaînes parallèles [8], a été décrite chez certains céphalopodes, des annélides polychètes, des pogonophores et quelques protozoaires. Enfin la γ -chitine, mal connue, qui serait constituée de l'assemblage de deux macromolécules parallèles et une antiparallèle, n'est rapportée que dans les téguments des nymphes d'un coléoptère (*Ptinus*) [73] et dans l'estomac d'un calmar (*Loligo*) [74].

Les polymères de chitine forment des microfibrilles qui sont stabilisées par des liaisons hydrogènes formées entre les groupes amines et carboxyles. L'arrangement des microfibrilles d' α -chitine confère des propriétés de rigidité et de résistance mécanique alors que les microfibrilles de chitine de type β confèrent des propriétés de flexibilité. Ces propriétés influencent la répartition des différentes formes de chitine dans les structures cuticulaires. Ainsi, la forme α est principalement présente au niveau des cuticules, alors que la forme β est davantage localisée au niveau des membranes péritrophiques des arthropodes [41, 68]. Enfin, des formes non cristallines et transitoires de la chitine ont été mises en évidence chez les champignons.

6. Biodégradation de la chitine

Les Actinomycètes sont connus pour produire plusieurs types de chitinases pour hydrolyser la diversité des chitines trouvés dans la nature. **Gooday** [26] a indiqué que les chitines peuvent varier selon l'agencement des brins de N- acétylglucosamine , le degré de désacétylation , et la présence d'éléments de structure réticulés , tels que les protéines et les glucanes . Certaines chitinases sont spécialisés dans l'hydrolyse de certains types de chitine et d'autres sont impliquées dans la dégradation de toutes les formes de chitines [3]. L'agencement des brins de N- acétylglucosamine semble être un des facteurs qui affectent la dégradation de la chitine.

La configuration antiparallèle α de la chitine est la plus serrée. Cette structure est la plus communément trouvée chez les organismes [26].

Les produits finaux de l'hydrolyse de la chitine, par exemple, le N-acétylglucosamine, le glucosamine, et le chitobiose, sont connus pour induire la synthèse de la chitinase [58]. Ce mécanisme d'induction a été mis en évidence par les travaux menés sur *Streptomyces olivaceoviridis*. Ce dernier produit une protéine de type lectine qui se lie spécifiquement à la chitine qui induit la production de chitinase [77]. Une cellule peut également déterminer le degré de désacétylation des quantités relatives du glucosamine et de la N-acétylglucosamine libéré lors de la dégradation de la chitine (**Figure 2**)

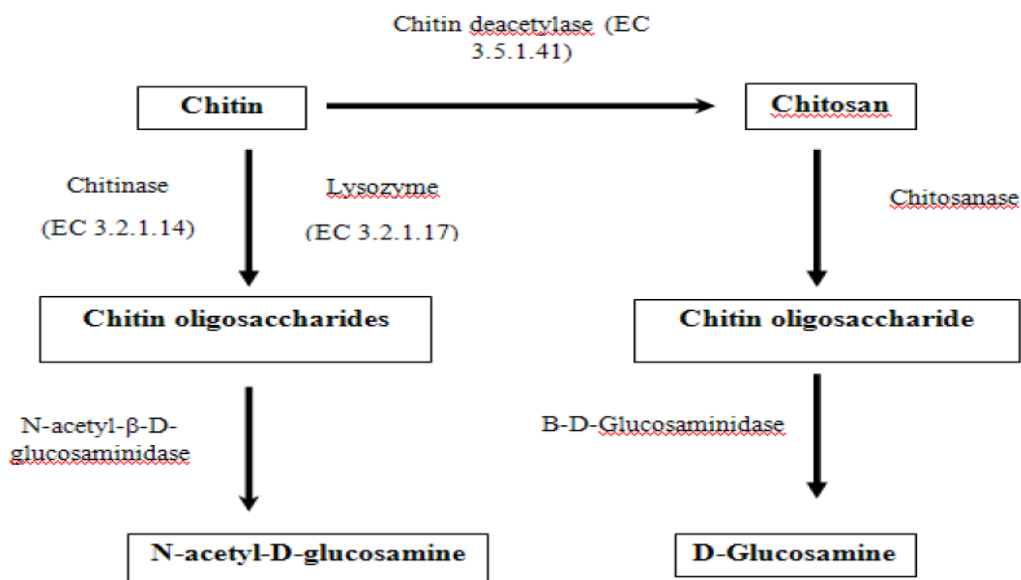


Figure 2. Enzymes impliquées dans l'hydrolyse de la chitine et du chitosane

7. Applications potentielles des chitinases

L'une des applications les plus importantes des chitinases est la protection contre les champignons pathogènes. Comme la chitine est l'un des constituants majeur des parois fongiques, ainsi elles sont sensibles aux différentes enzymes chitinolytiques. Aussi, les chitinases ont été identifiées comme des protéines responsables de pathogénicité, produites par les plantes « PR proteins ». Certains organismes producteurs de chitinases sont utilisés en agriculture comme agent de lutte biologique contre plusieurs champignons phytopathogènes [1, 32, 80]. Il a été démontré que les activités inhibitrices de *Bacillus amyloliquefaciens* V656 sur la croissance fongique, accroît en même temps que la croissance cellulaire avec un maximum lorsque la croissance des cellules atteint un pic à 24 h d'incubation [89].

Dans un autre exemple, la bactérie *Burkholderia gladioli* CHB101 produit une chitinase de la famille 19, qui inhibe plusieurs champignons pathogènes [81]. *Aeromonas caviae* contrôle l'infection par *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* chez le cotonnier et *Sclerotium rolfsii* chez les céréales par production de chitinases [35].

Les plantes de riz transgéniques ayant le gène *chiC* de *Streptomyces griseus* codant pour une chitinase, montrent une forte résistance face à la maladie « pyriculariose » provoqué par *Magnaporthe grisea* [36]. Quatre-vingt-dix pour cent des plantes exprimant le gène *ChiC* présentent une résistance plus élevée que les plantes non transgénique [5].

Les Chitinases bactériennes ont également un potentiel insecticide lorsqu'elles sont couplées avec d'autres protéines appropriées, telle que la protéine « Cry » [5, 6, 69]. Récemment, un grand nombre de gènes hétérologues de chitinases isolés à partir de différentes bactéries ont été clonés chez *Bacillus thuringiensis* dans l'intérêt d'augmenter l'activité insecticide des bactéries entomopathogènes. A cet égard, **Lertcanawanichakul et al.**, ont cloné des gènes de chitinases provenant de *Aeromonas hydrophyla* et *Bacillus circulans* No.4.1 dans le plasmide pHY300PLK, et désignés comme pHYA2 et pHYB43 respectivement. Ces plasmides sont introduits dans différentes souches de *B. thuringiensis* par électroporation [48].

Bacillus thuringiensis subsp. *aizawai* hébergeant le plasmide pHYB43 montre 15 fois plus d'activité chitinolytique que celle hébergeant pHYA2 en plus *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* hébergeant pHYB43 montre une plus grande toxicité pour les larves de *Lymantria dispar* que la souche sauvage de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* ou ces clones hébergeant pHYA2 [48].

Barboza - Corona et al., ont pu transformer *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD- 73 avec un gène homologue de l'endochitinase *ChiA74* à partir de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae*. Cette bactérie recombinante peut exprimer des quantités plus élevées de chitinases que *B. thuringiensis* transformée avec des gènes hétérologues de chitinases, ceci étend les applications biotechnologiques de *B. thuringiensis* pour une utilisation non seulement dans la lutte biologique contre les parasites et les champignons, mais aussi comme un producteur de chitoooligosaccharides [69].

Aussi, des chitinases isolées à partir de *Serratia marcescens* se sont montrés efficaces dans la lutte biologique. Par exemple, en 1976, **Lysenko** a constaté que les chitinases de *Serratia marcescens* étaient efficaces contre les larves de la teigne de cire, *Galleria mellonella* [52].

Une autre application majeure des chitinases basée sur leurs propriétés de dissolution des parois cellulaires chitineuses, est l'accélération de la génération de protoplastes. Elle contribue indirectement dans l'amélioration et le développement de nouvelles souches qui sont économiquement viables pour une utilisation industrielle.

La chitinase exprimée par *Burkholderia gladioli* CHB101 a été rapportée pour son activité à former des protoplastes contre les mycéliums fongiques [81]. La Chitinase de *Streptomyces* a montré qu'elle peut générer des protoplastes d'*Aspergillus oryzae* et *Fusarium solani* [83]. En outre, un complexe enzymatique isolé à partir de *Bacillus circulans* WL-12 avec une grande activité chitinolytique est efficace dans la génération de protoplastes à partir de *Phaffia rhodozyme* [89].

Les organismes producteurs de chitinases sont également utilisés dans le procédé de bioconversion pour traiter les déchets des crustacés et aussi pour obtenir des produits à valeur ajoutée à partir de ces derniers [11, 42, 72].

MATERIEL ET METHODES

1. Microorganismes

Huit souches d'actinomycètes ont été sélectionnées pour la mise en évidence de leur éventuelle activité chitinolytique. Quatre d'entre elles appartiennent à une collection d'actinomycètes d'origine rhizosphérique, les quatre autres à une collection d'origine clinique. Ces souches ont été isolées et identifiées respectivement par Aouar lamia [4], et Zerizer habiba [92] (**Tableau 2**).

Tableau 2. Les souches actinomycètes sélectionnées pour la mise en évidence de l'activité chitinolytique.

Sol rhizosphérique [4]	Prélèvements cliniques [92]
Lac1 (<i>Streptomyce sgriseus</i>)	GF 03 (<i>Nonomuraea reseola</i>)
Lac3 (<i>Streptomyces rochei</i>)	GF 44b (<i>Kribbella</i> sp)
Vic8 (<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>)	GF 44c (<i>Micromonospora aurantiaca</i>)
Pru16 (<i>Streptomyces champavatii</i>)	GF 40 (<i>Streptomyces</i> sp)

Les souches sont repiquées sur milieu ISP₂ (**Annexe 1**), et incubées à 30°C pendant 7 jours.

2. Mise en évidence de l'activité chitinolytique

La mise en évidence de l'activité chitinolytique consiste à ensemencer les souches actinomycétales par simple strie sur un milieu minimum gélosé additionné de chitine colloïdale [milieu CCA (g/L) : K₂HPO₄, 0,7; KH₂PO₄, 0,3; MgSO₄.5H₂O, 0,5; FeSO₄.7H₂O, 0,01; ZnSO₄, 0,001; MnCl₂, 0,001; chitine colloïdale, 20; Agar, 20].

Après 8 jours d'incubation, la production de chitinase extracellulaire se traduit par l'apparition de zones claires autour des colonies. Le diamètre des zones d'hydrolyse est mesuré pour chaque souche.

Afin de sélectionner les souches les plus performantes. La mise en évidence est d'abord réalisée sur un milieu CCA ajusté à trois différents pH (5, 7 et 9). Après incubation à 30°C pendant 8 jours, les souches présentant les plus grands diamètres d'hydrolyse sont retenues pour refaire le test aux mêmes conditions, mais avec une incubation à des températures différentes (20 à 50°C). Les souches qui montrent les plus grands diamètres d'hydrolyse, en fonction du pH et de la température sont sélectionnées pour la suite.

3. Préparation de la chitine colloïdale

La préparation de la chitine colloïdale a été réalisée selon le protocole modifié de **Hsu et Lockwood [33]**. Pour cela des morceaux de carapaces de crabes préalablement lavés à l'eau distillée sont broyés manuellement à l'aide d'un mortier et d'un pilon pendant 10 minutes. La poudre obtenue est tamisée afin d'éliminer les plus grands morceaux.

Afin de dissoudre les composés calciques contenue dans la carapace, vingt grammes de cette poudre sont traités avec 150 mL d' HCl concentré (~12M) dans un bécher en verre de 1L. L'acide chlorhydrique est additionné lentement, avec agitation continue pendant 60 minutes sous hotte chimique et à température ambiante (25° C).

Le mélange de chitine-HCl est ensuite passé à travers huit couches de gaze afin d'enlever les gros morceaux non dissous. Le filtrat limpide obtenu (~100 ml) est ensuite versé dans deux litres d'eau distillée froide pour permettre la précipitation de la chitine colloïdale ; Le tout est mis à 4° C dans des conditions statiques afin de faciliter la précipitation de la chitine colloïdale. Après 12h, le surplus d'eau est aspiré et le précipité est passé à travers deux couches de papiers Whatman N°3. Le filtrat retenu dans le papier est ensuite abondamment lavé avec de l'eau distillée (~5L) jusqu'à neutralisation du pH (pH~7). La chitine colloïdale ainsi obtenue est séchée, pour éliminer le maximum d'humidité, puis stérilisée et conservée à 4°C.

4. Optimisation des conditions de culture pour la production de chitinase

Une suspension sporale de la souche actinomycétale sélectionnée est préparée à partir d'une culture sur milieu ISP₂. 10 mL d'eau physiologique sont versés aseptiquement sur la boîte et les spores sont raclées à l'aide d'une anse platine. Cette suspension est ensuite prélevée dans un tube à essai stérile et la $DO_{\lambda=620}$ est ajustée à 0,1, ce qui correspond à une suspension de 10^7 spores/mL.

Le milieu de culture préconisé pour la production de chitinase en milieu liquide, est le milieu CYS (g/L): [chitine colloïdale, 5,0; Extrait de levure, 0,5; K_2HPO_4 , 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0; et $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 ; pH7] [62].

4.1. Effet du temps d'incubation

Afin de déterminer la période d'incubation optimale pour la production de chitinase, un Erlenmeyer de 250mL contenant 50mL de milieu CYS est inoculé par 1mL de suspension

sporale, puis incubé dans un agitateur rotatif à 140 rpm à 30°C pendant environ dix jours. Chaque 24 heures, 2 mL de culture sont prélevés et centrifugés à 7000 rpm pendant 15 min, le surnageant est utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique, alors que le culot sert à évaluer la biomasse. Le milieu de production stérile, non inoculé est utilisé comme blanc pour le dosage de la chitinase.

Le jour d'incubation présentant le pic de l'activité enzymatique est sélectionné pour le reste des fermentations.

4.2. Effet du pH

Pour observer l'effet du pH sur la production de chitinase, 50 mL de milieu CYS sont préparés à différents pH (5, 6, 7, 8, 9). Les milieux sont par la suite inoculés par 1 mL de suspension sporale et incubés à 30°C avec une agitation de 140 rpm. L'activité enzymatique ainsi que la biomasse sont mesurées, au jour optimal d'incubation précédemment sélectionné. La valeur de pH donnant l'activité enzymatique la plus élevée est utilisée pour tous les autres tests.

4.3. Effet de la température

La température optimale pour l'activité chitinolytique est déterminée en effectuant la même procédure décrite ci-dessus. Des Erlenmeyer contenant 50 mL de milieu CYS, ajustés au pH optimum d'activité, sont inoculés et incubés sous agitation à différentes températures (25 à 50°C).

5. Dosage de l'activité chitinolytique

L'activité enzymatique de la chitinase a été déterminée en utilisant la méthode de dosage des sucres réducteurs par DNS [54]. Le mélange réactionnel est composé de 1 mL d'extrait enzymatique brut ainsi que 1 mL de chitine colloïdale à 2% dans un tampon d'acétate de sodium (50mM, pH 5,0) (**Annexe 2**). Le mélange est incubé dans un bain marie agitateur pendant 30 min à 50°C. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 15 min, 1 mL du surnageant sont prélevés et ajoutés à 3 mL de réactif DNS (**Annexe 2**) afin de stopper la réaction. Le tout est porté au bain marie à 100 °C pendant 5 min puis refroidis dans de la glace. La DO est mesurée au spectrophotomètre (Shimatzu UV-120-02) à 540 nm.

La quantité de sucres réducteurs libérés est calculée en fonction de la courbe étalon du D-Glucosamine hydrochloride utilisé comme référence (**Annexe 3**).

Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme capable de libérer 1 μmol de GlcNAc par mL en 1min, dans ces conditions.

6. Mesure de la biomasse

La mesure du poids sec de la biomasse est effectuée pour déterminer la concentration cellulaire des actinomycètes au cours des fermentations. 2,0 mL de bouillon de culture sont prélevés et centrifugés à 7000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot restant est dissous dans 1,0 mL d'eau distillée. Le mélange est ensuite versé dans un support de filtration monté sur une membrane d'acétate de cellulose. La taille des pores de la membrane utilisée est de 0,2 μm . Après filtration, la membrane contenant les cellules bactériennes est séchée à température ambiante pendant 3 jours. La membrane est pesée chaque jusqu'à stabilisation du poids. La différence de poids est calculée puis exprimée en poids sec (mg/mL).

7. Extraction et purification partielle de l'enzyme

Après avoir évalué l'effet du temps d'incubation, du pH, et de la température, la souche actinomycétale est cultivée dans 200mL de milieu CYS avec les conditions optimale pour la production de chitinase.

Après fermentation, l'extrait protéique brut extracellulaire est recueilli par centrifugation à 7000 rpm pendant 15 minutes puis filtré en utilisant des membranes de 0,45 μm .

Une purification en une seule étape est réalisée selon la méthode proposée par **Nawani et Kapadnis [63]**. Le filtrat de culture (200 mL) est soumis à une précipitation avec du sulfate d'ammonium dans un intervalle de 50-80% de saturation (**Annexe 3**). Ce processus est réalisé à 4°C afin de maintenir l'activité biologique de la chitinase. La solution est doucement agitée et laissée pendant 4 heures à 4°C jusqu'à ce que tout le sulfate d'ammonium soit complètement dissous. Le précipité ainsi obtenu est recueilli par centrifugation à 10.000 g pendant 20 min. Le culot est ensuite dissous dans 10 mM d'acétate de sodium, pH 5,0 (**Annexe 2**).

L'échantillon de protéine est dialysé à 4°C contre 20 mM de tampon acétate de sodium (pH 5,0) (**Annexe 2**), pendant au moins 12 heures. Le tampon doit être renouvelé tous les 4 heures. Après cette étape, une concentration sur membrane est réalisée (Centricon millipore, seuil de rétention : 10 kDa). L'activité chitinolytique du culot et du surnageant est mesurée après chaque étape.

8. Test d'activité antifongique

Des disques stériles de papier Whatman N°3 de 6 mm de diamètre reçoivent 50 µL d'extrait enzymatique. Les témoins négatifs reçoivent 50 µL d'extrait enzymatique dénaturé par chauffage à 100°C pendant 5 min. Après séchage sous courant d'air chaud les disques sont déposés sur les boîtes de Pétri contenant du milieu PDA préalablementensemencé par les différents champignons tests par pique centrale. Les boîtes sont ensuite incubés 30° C. La lecture des résultats est réalisée après 4 jours d'incubation. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif.

Les champignons utilisés pour ce test proviennent du laboratoire de « Génie Microbiologique et Applications », Université Constantine 1. (*Aspergillus niger* CIP 1431, *Trichophyton rubrum* CIP 2043.92, et *Fusarium oxysporum* CIP 625.72).

RESULTATS

ET DISCUSSION

1. Mise en évidence de l'activité chitinolytique sur milieu solide

L'hydrolyse de la chitine se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

Après ensemencement des souches, sur un milieu minimum contenant la chitine comme seule source de carbone et d'énergie, et incubation de 8 jours à 30°C, nous avons observé la croissance de toutes les souches sur ce milieu, en particulier celles appartenant au genre *Streptomyces* (Lac1, Lac3, et Pru16) (**Figure 3**)

À pH 5, aucune zone claire n'apparait autour des colonies.

À pH 7, l'apparition d'un halo clair est détecté autour des colonies de 5 souches (GF 44b, GF 44c, GF 40, Vic8 et Pru16) sur les 8 testées.

Alors qu'à un pH basique de 9, les zones claires apparaissent autour des colonies de 6 souches (GF 44b, GF 44c, Lac 1, Lac 3, Vic8 et Pru16). À ce pH, les plus grands diamètres mesurés sont ceux des souches GF 44b et Pru16. Ces deux souches ont été sélectionnées pour évaluer l'effet de la température sur la production enzymatique au pH optimum.

Les deux souches GF44b et Pru16 sont ensemencées sur un milieu CCA, à pH 9 et incubées à 20, 30, 40 et 50°C. Les plus grands diamètres d'hydrolyse mesurés sont observés pour les deux souches à une température de 30°C. Aucune croissance des souches n'a été notée à des températures de 40° et 50°C (**Tableau 3**).

Tableau 3. Effet du pH et de la température sur le diamètre des zones d'hydrolyse.

		Isolats rhizosphériques				Isolats cliniques			
		Lac1	Lac3	Vic8	Pru16	GF44b	GF44c	40	03
pH	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	++	++	++	++	+	-
	9	++	+	++	+++	+++	+	-	-
Température °C	20	/	/	/	+	-	/	/	/
	30	/	/	/	+++	+++	/	/	/
	40	/	/	/	abs	abs	/	/	/
	50	/	/	/	abs	abs	/	/	/

(-) : pas de zone d'hydrolyse (+) : < 3mm (++) : ≥3 et <6 mm (+++) : ≥ 6mm abs : absence de croissance

Les souches GF 44b et Pru16 présentent de manière qualitative le meilleur rendement de production de chitinases sur milieu solide (**Figure 4**). Seule la souche GF44b appartenant au genre *Kribbella*, considérée comme un des genres rares d'actinomycètes, a été sélectionnée pour la suite de ce travail.

2. Optimisation des conditions de cultures pour la production de chitinases corrélée à la biomasse sur milieu liquide

2.1. Effet du temps d'incubation (**Figure 5**)

La souche GF44b a été ensemencée dans 50 mL de milieu CYS à pH 7, et incubée 10 jours à 30°C sous agitation continue. Un prélèvement de 2 mL est effectué chaque 24h afin d'estimer l'activité chitinolytique.

À J_0 , l'activité chitinolytique est de 0,0065U/mL, ceci s'explique par la présence de sucres libre réducteurs dans le milieu de culture, en effet l'extrait de levure contenu dans le milieu est très riche en glucanes, en plus des glutamates et des vitamines. La souche va donc préférentiellement commencer à utiliser ces sucres avant de commencer à dégrader la chitine.

La production de chitinases n'est initiée qu'après 24h d'incubation. Entre le 1^{er} et le 6^{ème} jour, l'activité chitinolytique augmente progressivement jusqu'à atteindre une valeur de 0,0259 U/mL et à partir du 6^{ème} jour, nous observons une augmentation exponentielle de l'activité pour atteindre son maximum à J_8 : 0,0407U/mL.

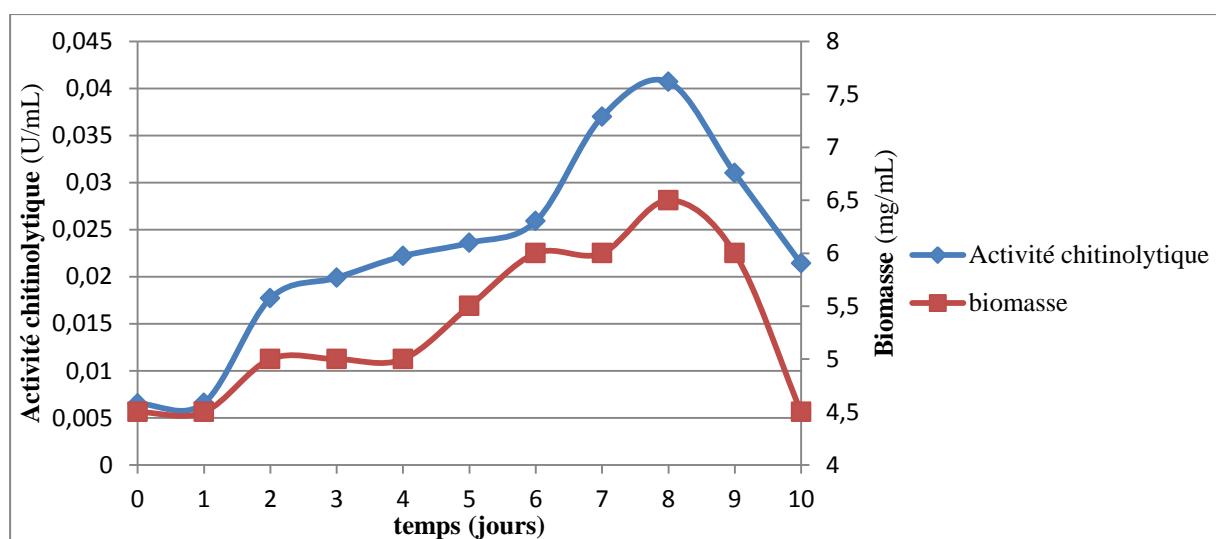


Figure 5. Effet du temps d'incubation sur la production de chitinases et de biomasse.

Nous notons deux phases de croissance bien distinctes. À l'inoculation, le poids sec de la souche est de 4,5mg/mL. Une augmentation de la biomasse est notée après 24h d'incubation et se stabilise jusqu'à J₄ (5,0 mg/mL). Cette croissance s'explique par l'utilisation des sucres libres déjà présents dans le milieu par la souche. À la même période, une augmentation relative de la production de la chitinases est notée. A partir du 4^{ème} jour, la souche commence à utiliser les sucres issus de l'hydrolyse de la chitine par l'enzyme et entre en phase exponentielle de croissance jusqu'à atteindre son maximum (6,5 mg/mL) au 8^{ème} jour. Durant cette phase la biomasse est en corrélation avec la production de chitinases (0,0407U/mL).

Après le 8^{ème} jour, l'épuisement de la chitine du milieu entraîne une régression de l'activité chitinolytique et de la biomasse. La souche entre alors en phase de déclin.

Subramanian et al., ont également noté un maximum de production de chitinases de la souche *Streptomyces sp.* CDB₂₀ après 8 jours d'incubation [84], alors que **Nawani et Kapadnis** ont rapporté que la production de chitinases par *streptomyces sp.* Nk 1057 atteint son maximum après 5 jours [63]. D'autre part, **Joo** a trouvé un maximum de production chez *Streptomyces halstedii* après 72 heures d'incubation. Tandis que le maximum de production de *microspora sp.*V2 est à 48h selon **Nawani et al.**, [64].

Le temps d'incubation pour une production optimale de chitinases varie d'une souche à l'autre selon la spécificité métabolique de chacune d'elles. Plusieurs autres facteurs entrent en jeu tel que la taille de l'inoculum, la composition et le volume du milieu de fermentation.

2.2 Détermination des optimums de pH et de température

L'influence du pH et de la température sur la production des chitinases par la souche GF44b après une fermentation de 8 jours, à 30°C sous agitation continue, est représentée dans les **figures 6 et 7**.

L'activité chitinolytique varie en fonction du pH du milieu. La plus grande activité a été enregistrée dans le milieu de culture ajusté à un pH 9 (0,078U/mL), tandis que la température optimale pour l'activité chitinolytique est de 30°C (0,081U/mL).

Ainsi contrairement à notre souche, le pH et la température optimums pour la production de chitinases de la souche *Microbispora sp* V2, est de 7 et 40°C respectivement [64].

Aussi, **Taechowisan et al.**, rapportent que l'activité chitinolytique chez la souche *Streptomyces aureofaciens* est optimale à un pH compris entre 6,5 et 7 et une température de 30-40°C [85].

Le maximum de production de chitinases par une culture de 60h de la souche *Streptomyces* spANU 6277 est obtenu à un pH de 6 et une température de 35°C, Ceci a été déterminé sur milieu CYS additionné de 1% de chitine [62].

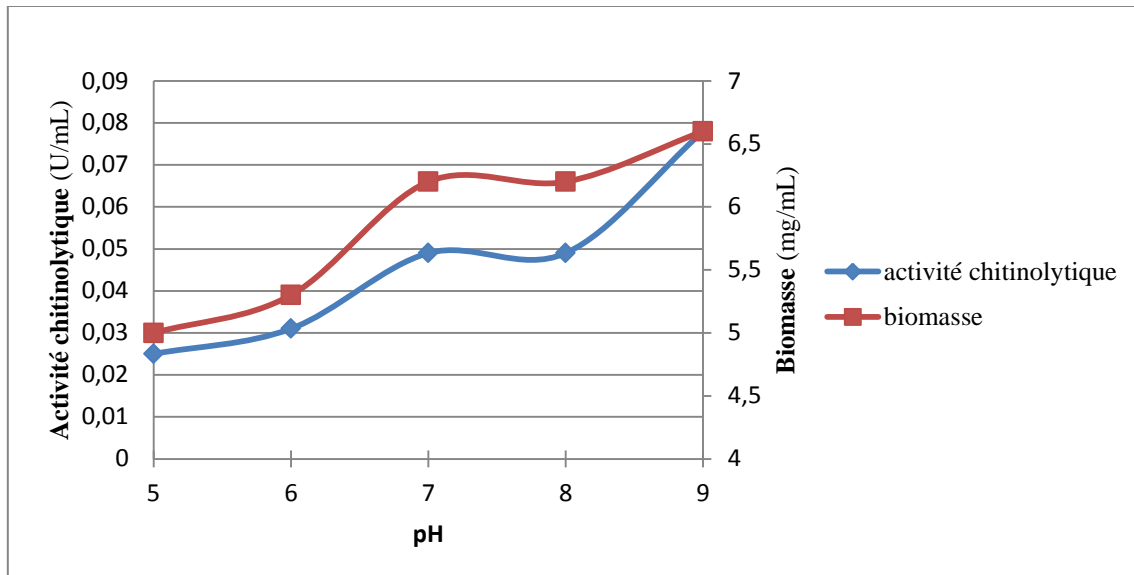


Figure 6. Effet du pH sur la production de chitinases et de biomasse.

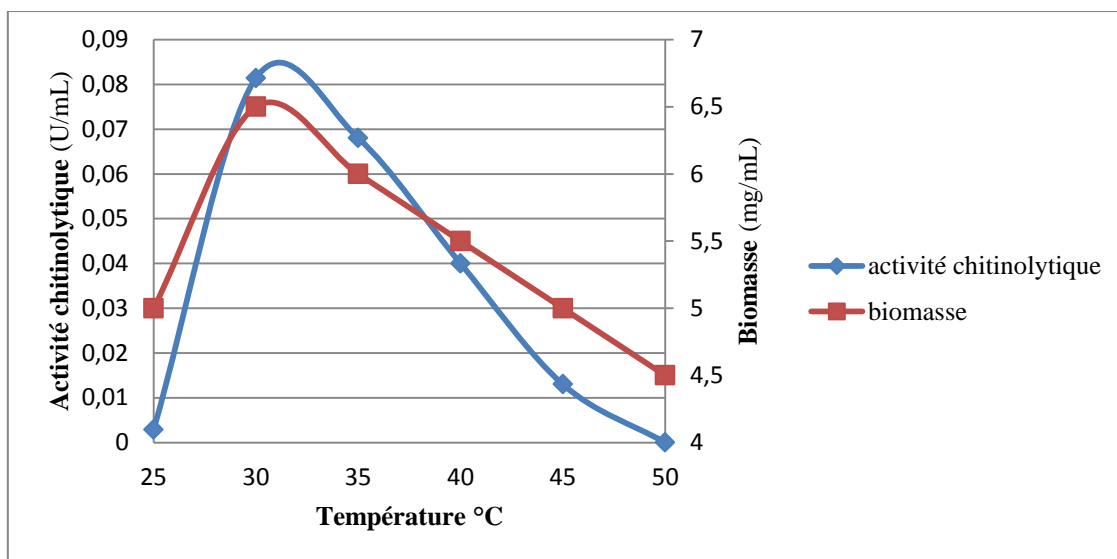


Figure 7. Effet de la température sur la production de chitinases et de biomasse.

Pour la souche *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520, le pH optimal pour l'activité chitinolytique est compris entre 8,0 et 10,0 [87], ce résultat est comparable à celui obtenu pour la souche GF 44b qui montre un optimum de production à un pH 9. Cependant, aucune étude jusqu'à présent ne rapporte la production de chitinases par une souche appartenant au

genre *Kribbella* ceci s'explique par le fait que ce genre n'a été découvert qu'en 1999, il comporte 16 espèces citées dans le **Bergey's manual 2013**.

Les souches de *Kribbella* sont des aérobies strictes, elles se développent à un pH neutre à alcalin. Les espèces *Kribbella catacumbae*, *Kribbella koreensis* et *Kribbella sancticallisti* poussent à un pH optimal de 10 [46, 88]. Le genre *Kribbella* est largement distribué dans l'écosystème tellurique surtout dans les sols de différentes origines incluant les milieux acides et les sites pollués. (Ding *et al.*, Genbank accession no AFJ938352 ; Zheng et Huang, Genbank accession no EU697199) [13, 47]. Leur température optimale de croissance varie d'une espèce à une autre, mais tous les organismes de ce genre poussent bien entre 25 et 30°C. La température de croissance la plus élevée et la plus basse sont 45°C (*Kribbella swartbergensis* [21]) et 8°C (*Kribbella ginsengisoli* [17]) respectivement.

3. Extraction et purification partielle

La purification partielle des chitinases extracellulaires produites par GF 44b a été réalisée par une précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une dialyse et d'une concentration sur membrane. L'activité chitinolytique est mesurée après chaque étape. (Tableau 4).

La précipitation au sulfate d'ammonium a été choisie pour sa facilité de réalisation en plus d'être une méthode qui ne dénature pas les enzymes. Selon Gomes *et al.*, [25], une saturation en sulfate d'ammonium de 50-80%, est l'intervalle le plus favorable pour la précipitation des chitinases à partir d'un extrait enzymatique brut.

Le culot formé durant la précipitation, est immédiatement soumis à une dialyse afin de prévenir l'inhibition de l'enzyme par les sels d'ammonium [82]. A ce stade, l'activité chitinolytique de l'extrait dialysé est de 0.061U/mL. La concentration sur membrane (Centricon, 10 Kda) a permis d'éliminer le maximum de tampon et de concentrer l'extrait jusqu'à vingt fois. Cependant en raison du faible volume de l'extrait enzymatique concentré, l'activité n'a pu être mesurée.

Tableau 4. Concentration de l'extrait enzymatique.

	Volume	Activité enzymatique (U/mL)
Extrait brut	200mL	0,027
Après précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}$ (50-80%) + dialyse	2mL	0,061
Après Concentration	300 μ L	ND

ND : non disponible

4. Test d'activité antifongique

L'extrait enzymatique concentré de la souche GF 44b est testée pour évaluer son activité antifongique. Après quatre jours d'incubation à 30°C, une zone d'inhibition est notée à la périphérie des disques contenant l'enzyme contre les trois champignons tests (**Figure 8**) dont le diamètre de lyse est variable d'un mycète à l'autre (**Tableau 5**). Aucune inhibition cependant n'est détectée autour des témoins négatifs contenant l'enzyme dénaturée. Ainsi nous constatons que les champignons sont inhibés par l'action de la chitinase.

Tableau 5. Activité antifongique de l'extrait enzymatique concentré de la souche GF 44b.

	<i>Aspergillus niger</i> CIP 1431	<i>Trichophyton rubrum</i> CIP 2043.92	<i>Fusarium oxysporum</i> CIP 625.72
Témoin Négatif	-	-	-
Témoin positif (Terbinafine chlorydrate, 25mg/mL)	+	+	+
Extrait enzymatique concentré (X20)	+	+	+

(-) absence d'inhibition (+) présence d'inhibition

D'autres études menées sur l'activité antifongique des chitinases ont été rapportées. Les chitinases isolées à partir de la souche *Streptomyces griseus* montre une activité antifongique contre : *Aspergillus sp.*, *Phycomyces blakesleeanus*, et *Trichoderma reesei* [90]. **Hoster et al.**, ont rapporté une activité antifongique de ces mêmes chitinases contre *Aspegillus nodulans* et des phytopathogènes tel que *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Gulgnardia bidwellii* et *Sclerotia sclerotiorum* [32].

D'autre part, **Kim et al.**, ont déterminé l'activité antifongique d'une chitinase purifiée à partir de *Streptomyces* sp.M-20 contre *Botrytis cinerea* [43].

Elad et al., et **crawford et al.**, suggèrent que la dégradation de la paroi cellulaire par l'enzyme, est le mécanisme principale impliqué dans le contrôle biologique des champignons phytopathogènes [19, 16].

Concernant le genre *Kribbella*, seule la souche *Kribbella antibiotica* a été rapporté comme ayant une activité antifongique [49].

L'activité antifongique des chitinases extraites à partir de la souche GF44b, contre plusieurs genres de champignons, montre que cette souche peut être utilisée comme un agent de biocontrôle contre plusieurs maladies.

CONCLUSION

ET PERSPECTIVES

L'étude a visé de sélectionner la souche qui montre la meilleure activité chitinolytique parmi les huit du départ provenant de deux sources différentes (échantillons cliniques et rhizos phériques).

L'optimisation des conditions de cultures de la souche GF44b pour la production de chitinases nous a permis de trouver que l'activité chitinolytique atteint une valeur maximale après 8 jours d'incubation (0,0407U/mL). La comparaison entre les cinétiques de production enzymatique et la croissance bactérienne montre qu'elles sont corrélées.

Le pH et la température influent sur la production enzymatique de la souche GF44b. Cette étude a permis de déterminer une production maximale à un pH 9, et à une température de 30°C.

Afin d'extraire l'enzyme extracellulaire, une fermentation dans les conditions optimales a été réalisée, l'extrait enzymatique ainsi obtenue après précipitation au sulfate d'ammonium (50-80%) et dialyse, est concentré et soumis à un test d'activité antifongique contre 3 champignons tests (*Aspergillus niger* CIP 1431, *Trichophyton rubrum* CIP 2043.92, et *Fusarium oxysporum* CIP 625.72). La chitinase se montre active sur tous les champignons test et inhibe leur croissance.

Cette chitinase extracellulaire extraite à partir de la souche GF 44b, présente un intérêt important pour poursuivre les recherches sur cette enzyme, une purification et un séquençage sont nécessaires pour une meilleure caractérisation. Surtout qu'aucune étude jusqu'à présent ne rapporte la production de chitinases par une souche appartenant au genre *Kribbella* ; genre auquel la souche GF44b appartient.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Ajit N.S., Verma R. et Shanmugam V. (2006).** Extracellular chitinases of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* sp. *dianthi* causing carnation wilt. *Curr. Microbiol.* **52**:310-316.
- [2]. **Akagi K., Watanabe J., Hara M., Kezuka Y., Chikaishi E., Yamaguchi T. et al., (2006).** Identification of the substrate interaction region of the chitin binding domain of *Streptomyces griseus* Chitinase C. *J. Biochem.***139**: 483-493.
- [3]. **Amy L., Svitil-Sinead M., Moore J.A. et Kirchman D.L (1997).** Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Appl. Envir. Microbiol.* **63(2)**:408-413.
- [4]. **Aouar L., Lerat S., Ouffroukh .A, Boulahrouf .A et Beaulieu C. (2012).** Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Can. J. Plant. Pathol.* **34 (2)**: 165-176.
- [5]. **Barboza-Corona J.E., Contreras J.C., Velazquez-Robledo R., Bautista-Justo M., Gomez-Ramirez M., Cruz-Camarillo R. et Ibarra J. E. (1999).** Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* **21**: 1125-1129.
- [6]. **Barboza-Corona J. E., Nieto-Mazzocco E., Velazquez-Robledo R., Salcedo-Hernandez R., Bautista M., et al. (2003).** Cloning, sequencing, and expression of the chitinases gene *ChiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1023-1029.
- [7]. **Blaak H., Schnellmann J., Walter S., Henrissat B. et Schrempf H. (1993).** Characteristics of an exochitinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases. *Eur. J. Biochem.* **214**: 659-669.

- [8]. **Blackwell J. (1969)**. Structure of beta-chitin or parallel chain systems of poly- β -(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine. *Biopolymers*. **7**: 281-298.
- [9]. **Bouras N. (2005)**. Régulation de la production d'antibiotiques dithiolopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. PhDThesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, France. p:91-103.
- [10]. **Brinda M. et Crawford D.L. (1997)**. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microbial. Tech.* **20**:489-493.
- [11]. **Carroad P.A. et Tom R.A. (1978)**. Bioconversion of shell fish waste process conception and selection of microorganisms. *J. Food. Sci.* **43**:1158-1161.
- [12]. **Charpentier M. et Percheron F. (1983)**. The chitin-degrading enzyme system of a *Streptomyces* species. *Int. J. Biochem.* **15**: 289-292.
- [13]. **Cho M.H., Whang K.S., Han S.M. et Baek H.J. (2006)**. Ecological characteristics of actinomycetes from mercury and chrome polluted soil. *Korean. J. Environ. Biol.* **24**: 38-45.
- [14]. **Clarke P.H. et Tracey M.V. (1956)**. The occurrence of chitinase insome bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **14**: 188-196.
- [15]. **Cohen-Kupiec R. et Chet I. (1998)**. The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opinion. Biotech.* **9**: 270-277.
- [16]. **Crawford D.L., Lynch J.M., Whipps J.M. et Ousley M.A. (1993)**. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3899-3905.
- [17]. **Cui Y.S., Lee J.S., Lee S.T. et Im W.T. (2010)**. *Kribbella ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 364-368.

- [18]. **Desbrières J. (2002)**. Chitine et chitosane. *L'actualité chimique*. **11-12**: 39-44.
- [19]. **Elad Y., Chet I. et Henis Y. (1982)**. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* **28**:719-725.
- [20]. **El-Sayed E.S.A., Ezzat S.M., Ghaly M.F., Mansour M. et El-Bohey M.A. (2000)**. Purification and characterization of two chitinases from *Streptomyces albovinaceus* S-22. *World. J. Microbiol. Biotechnol.***16**:87-89.
- [21]. **Everest G.J. et Meyers P.R. (2008)**. *Kribbella hippodromi* sp. nov., isolated from soil from a racecourse in South Africa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 443-446.
- [22]. **Felse P.A. et Panda T. (2000)**. Production of microbial chitinases: a revisit. *Bioprocess Engineering*. **23**: 127-134.
- [23]. **Fujii T. et Miyashita K. (1993)**. Multiple domain structure in a chitinase gene (*ChiC*) of *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 677-686.
- [24]. **Gomes R.C., Alviano C.S., Linhares L.F. et Coelho R.R. (2000)**. Chitinolytic Activity of Actinomycetes from a Cerrado Soil and their Potential in Biocontrol. *Appl. Microbiol.* **3**: 146-150.
- [25]. **Gomes R.C., Alviano C.S., Ulhoa C.J., Linhares L.F. et Coelho R.R. (2001)**. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Appl. Microbiol.* **90**:653-661.
- [26]. **Gooday G.W. (1990)**. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation*. **1**: 177-190.
- [27]. **Goodfellow M. et Williams S.T. (1983)**. Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**:189-216.

- [28]. **Gupta R., Saxena R.K., Chaturvedi P. et Viridi M. (1995).** Chitinase production by *Streptomyces virificans*: Its potential in fungal cell wall lysis. *Appl. Bacteriol.* **87**:378-383.
- [29]. **Hawtin R.E., Arnold K., Ayres M.D., Zanotto P.M., Howard S.C., Gooday G.W. et al., (1995).** Identification and preliminary characterization of achitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology.* **212**: 673-685.
- [30]. **Henrissat B. (1999).** Classification of chitinases modules. *In: Chitin and chitinases.* Ed. Birkhauser Verlag, Basel, Berlin. p:213-218.
- [31]. **Henrissat B. et Davies G.J. (2000).** Glycoside hydrolases and glycosyl transferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant. Physiol.* **124**: 1515-1519.
- [32]. **Hoster F., Schmitz J.E. et Daniel R. (2005).** Enrichment of chitinolytic microorganisms: Isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 434-442.
- [33]. **Hsu S.C. et Lockwood J.L. (1975).** Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* **29**: 422-426.
- [34]. **Huber M., Cabib E. et Miller L.H. (1991).** Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 2807-2810.
- [35]. **Inbar J. et Chet I. (1991).** Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in biological control of soil borne plant pathogen by this bacterium. *Soil. Biol. Biochem.* **23**: 973-978.
- [36]. **Itoh Y., Takahashi K., Takizawa H., Nikaidou N., Tanaka H., Nishihashi H., et al. (2003).** Family 19 chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 847-855.

- [37]. **Iverson K., Bromel M., Anderson A.W. et Freeman T. (1984).** Bacterial symbionts in the sugar beet root maggot *Tetanops myopaeformis* (von Röder). *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 22-27.
- [38]. **Jeuniaux C. (1963).** Chitine et chitinolyse. Ed. Masson & Cie, Paris. p:311-321.
- [39]. **Johnson E.A., Villa T.G., Lewis M.J. et Phaff H.J. (1979).** Lysis of cell wall of yeast *Phaffia rhodozyme* by a lytic complex from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Appl. Biochem.* **1**: 272-282.
- [40]. **Joo J.G. (2005).** Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnol. Lett.* **27**: 1483-1486.
- [41]. **Kennington W. (1976).** Adaption of insect peritrophic membranes to form cocoon fabrics. *In: The Insect Integument.* Ed. Elsevier Science, Amsterdam. p:52-55.
- [42]. **Keyhani N.O. et Roseman S. (1999).** Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta.* **(14)73**: 108-122.
- [43]. **Kim K.J., Yang Y.J., et Kim J.G. (2003).** Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *J. Biochem. Molecular. Biol.* **36**: 185-189.
- [44]. **Lacey J. (1997).** Actinomycetes in composts. *ann. agric. environ. med.* **4**: 113-121.
- [45]. **Lechevalier M.P. et Lechevalier H.A. (1981).** Introduction to the order actinomycetales. *In: The prokaryotes, Vol.2.* Ed. Springer-Verlag, Berlin. p:1915-1922.
- [46]. **Lee S.D., Lee D.W. et Kim J.S. (2008).** *Nocardioides hwasunensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 278-281.
- [47]. **Leigh M.B., Pellizari V.H., Uhlik O., Sutka R., Rodrigues J., Ostrom N.E. et al., (2007).** Biphenyl utilizing bacteria and their functional genes in a pine root zone contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs). *ISME J.* **1**: 134-148.

- [48]. **Lertcanawanichakul M., Wiwat C., Bhumiratana A. et Dean D.H. (2004).** Expression of chitinase encoding genes in *Bacillus thuringiensis* and toxicity of engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* toward *Lymantria dispar* larvae. *Curr. Microbiol.* **48**: 175-181.
- [49]. **Li W.J., Wang D., Zhang Y.Q., Schumann P., Stackebrandt E., Xu L.H. et Jiang C.L. (2004).** *Kribbella antibiotica* sp. nov., a novel nocardioform actinomycete strain isolated from soil in Yunnan, China. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**: 160-165.
- [50]. **Locci R. et Sharples G.P. (1984).** Morphology. *In: The biology of Actinomycetes.* Ed. Academic Press, London., UK, p:165-199.
- [51]. **Lopes A., Coelho R.R., Meirelles M.N.I., Branquinha M.H. et Vermelho A.B. (1999).** Extracellular serine proteinases isolated from *streptomyces alboniger*. Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Men. Instoswaldo. cruz,* Rio de janeiro. **94**:763-770.
- [52]. **Lysenko O. (1976).** Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity in insects. *J. Invert. Pathol.* **27**: 385-386.
- [53]. **Mahadevan B. et Crawford D.L. (1997).** Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microbiol. Technol.* **20**: 489-493.
- [54]. **Miller G.L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical. chem.* **31**: 426-428.
- [55]. **Minke R. et Blackwell J. (1978).** The structure of alpha-chitin. *J. Mol. Biol.* **120**:167-181.
- [56]. **Mitsutomi M., Hata T. et Kuwahara T. (1995).** Purification and characterization of novel chitinases from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J. Ferment. Bioeng.* **80**:153-158.

- [57]. **Miyashita K., Fujii T. et Sawada Y. (1991).** Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2065-2072.
- [58]. **Montgomery M. T. et Kirchman D. L. (1994).** Induction of chitin binding proteins during the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Appl. Envir. Microbiol.* **60**:4284-4288.
- [59]. **Muzzarelli R. (1977).** Chitin Pergamon Press, Oxford. p:75-76.
- [60]. **Muzzarelli R. (1999).** Native, industrial and fossil chitins. **In:** Chitin and Chitinases. Ed. BirkhauserVerlag, Basel, Berlin. p:321-326.
- [61]. **Narayana K.J.P., Prabhakar P., Vijayalakshmi M., Vekateswarlu Y. et Krishna P.S.J. (2007).** Biological activity of phenylpropionic acid from a terrestrial *Streptomyces*. *Polish. J. Microbiol.* **56**: 191-197.
- [62]. **Narayana K.J.P. et Vijayalakshmi M. (2009).** Chitinase production by *streptomyces* sp. ANU 6277. *Braz. J. Microbiol.* **40**: 725-733.
- [63]. **Nawani N.N. et Kapadnis B.P. (2001).** One step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 803-808.
- [64]. **Nawani N.N., Kapadnis B.P., Das A.D., Rao A.S. et Mahajan S.K. (2002).** Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 965-975.
- [65]. **Nawani N.N. et Kapadnis B.P. (2004).** Production dynamics and characterization of chitinolytic system of *Streptomyces* sp. NK 1057, a well equipped chitin degrader. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 487-494.
- [66]. **Ohno N. et Morisson D. (1989).** Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. *J. oil. chem.* **264**: 4434-4441.

- [67]. **Patil R.S., Ghormade V. et Deshpande M.V. (2000).** Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enz. Microbial. Techn.* **26**: 473-483.
- [68]. **Peters W. (1992).** Peritrophic membranes. Ed. Springer-Verlag, Berlin. p:152-159.
- [69]. **Ragev A., Keller M., Strizhov N., Sneh B., Prudovsky E., Chet I., et al. (1996).** Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3581-3586.
- [70]. **Raisonnier A. (2003).** Révisions biochimie PCEM2. Polycopies. Université Paris-VI. p:73.
- [71]. **Ramirez-Reyes A., Escudero-Abarca B. I., Aguilar-Uscanga G., Hayward-Jones P.M. et Barboza-Corona J.E. (2004).** Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinases and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *J. Food. Sci.* **69**: 131-134.
- [72]. **Revah-Moiseev S. et Carroad P.A. (1981).** Conversion of enzymatic hydrolysate of shell fish waste chitin to SCP. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 1067-1078.
- [73]. **Rudall K.M. et Kenchington W. (1973).** The chitin system. *Biological Review.* **48**: 597-636.
- [74]. **Ruiz-Herrera J. et Martinez-Espinoza A.D. (1999).** Chitin biosynthesis and structural organization *in vivo*. In: Chitin and chitinases. Ed. Birkhäuser Verlag, Basel, Berlin. p:212-218.
- [75]. **Samimifar P., Dehnad A., Ebrahimi M.A., Khaniki B. et Tahmasebpour B. (2013).** Chitinase as the most important secondary metabolites of *Streptomyces*. *Ijsit.*, **2(6)**: 579-589.

- [76]. Saville G.P., Thomas C.J., Possee R.D. et King L.A. (2002). Partial redistribution of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chitinase in virus-infected cells accompanies mutation of the carboxy-terminal KDEL ER-retention motif. *J. Gen. Virol* **83**: 685-694.
- [77]. Schnellmann J., Zeltins A., Blaak H. et Schrempf H. (1994). The novel lectin-like protein CHB1 is encoded by a chitin-inducible *Streptomyces olivaceoviridis* gene and binds specifically to crystalline alpha-chitin of fungi and other organisms. *Molecular. Microbiol.* **13**:807-819.
- [78]. Schrempf H. (2001) Recognition and degradation of chitin by *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **79**: 285-289.
- [79]. Shahabuddin M. et Vinetz J.M. (1999). Chitinases of human parasites and their implications as antiparasitic targets. *EXS.* **87**: 223-34.
- [80]. Shekhar N., Bhattacharya D., Kumar D. et Gupta R.K. (2006). Biocontrol of wood rotting fungi using *Streptomyces violaceusniger* XL-2. *Can. J. Microbiol.* **52**: 805-808.
- [81]. Shimosaka M., Fukumori Y., Narita T., Zhang X.Y., Kodaira R., Nogawa M. et Okazaki M. (2001). The bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101 produces two different kinds of chitinases belonging to families 18 and 19 of the glycosyl hydrolases. *J. Biosci. Bioeng.* **91**: 103-105.
- [82]. Shuler M.L. et Kargi F. (2002). *Bioprocess Engineering- Basic Concept*. 2nd Edition. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. p:355.
- [83]. Skujins J.J., Potgeiter H.J. et Alexander M. (1965). Dissolution of fungal cell walls by *Streptomyces* chitinase and β -1,3-glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**: 358-364.

- [84]. **Subramanian K., Balaraman D., Uttara V., Sadaiappan B. et Manikkam S. (2012).** Evaluation of Chitinase producing and antimicrobial properties of *Streptomyces* isolated from shrimp shell disposable area. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. (S):861-864.
- [85]. **Taechowisan T., Peberdy J.F. et Lumyong S. (2003).** Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130, and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Annal. Microbiol.* **53**: 447-461.
- [86]. **Thomas C.J., Gooday G.W., King L.A. et Possee R.D. (2000).** Mutagenesis of the active site coding region of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus ChiA gene. *J. Gen. Viro.* **181**:1403-1411.
- [87]. **Tsujibo H., Minoura K., Miyamoto K., Endo H., Moriwaki M. et Inamori Y. (1993).** Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. And Environ. Microbiol.* **59**: 620-622.
- [88]. **Urzi C., De Leo F. et Schumann P. (2008).** *Kribbella catacumbae* sp. nov. and *Kribbella sancticallisti* sp. nov., isolated from whitish-grey patinas in the catacombs of S^t Callistus in Rome, Italy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 2090-2097.
- [89]. **Wang S.L., Shih I.L., Liang T.W. et Wang C.H. (2002).** Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a SCSP medium. *J. Agricul. Food. Chem.* **50**: 2241-2248.
- [90]. **Williams S.T., Goodfellow G., Wellington E.M., Sneath P.H. et Sackin M.J. (1983).** Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**:1743-1813.
- [91]. **Yuan W.M. et Crawford D.L. (1995).** Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Env. Microbiol.* **61**: 3119-3128.

- [92]. **Zerizer H., La Scolat B., Raoult D., Dalichaouche M. et Boulahrouf A. (2013).** Isolation and polyphasic characterization of aerobic actinomycetes genera and species rarely encountered in clinical specimens. *Afr J. Microbiol. Res.* **7(28)**:3681-3689.
- [93]. **Zhang Z., Yuen G.Y., Sarath G. et Penheiter A.R. (2001).** Chitinases from plant disease biocontrol agent *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopathology*. **91**: 204-211.

ANNEXES

ANNEXE : 01**Milieux de culture****Milieu ISP₂**

Extrait de levure	4g
Extrait de malte	10g
D-glucose	4g
Agar	20g
CaCO ₃	2g
Eau distillée stérile	1000mL

pH 7,3

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Pomme de terre	200g
Glucose	1g
Agar	20g
Eau distillée	1000mL

pH 7,0

Milieu CCA (Colloidal Chitin Agar)

Chitine	20g
K ₂ HPO ₄	0,7g
KH ₂ PO ₄	0,3g
MgSO ₄ . 5H ₂ O	0,5g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01g
ZnSO ₄	0,001g
MnCl ₂	0,001g
Agar	20g
Eau distillée	1000mL

pH 7, 3

Milieu CYS (chitin Yeast extract Salt)

Chitine	40mL
Extrait de levure	0,25g
K ₂ H _p O ₄	1g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0,5g
Fe SO ₄ .7H ₂ O	0,05g
Eau distillée	500mL

pH 7,0

ANNEXE : 02**Tampons et réactifs utilisés****Tampon acétate de sodium 0,02 M**

Acétate de sodium1,64g
 Acide acétique glacial1,14mL
 Eau distillée1000mL
 pH 5,0

Tampon acétate de Sodium 0,05 M

Acétate de sodium4,10g
 Acide acétique glacial2,85mL
 Eau distillée1000mL
 pH 5,0

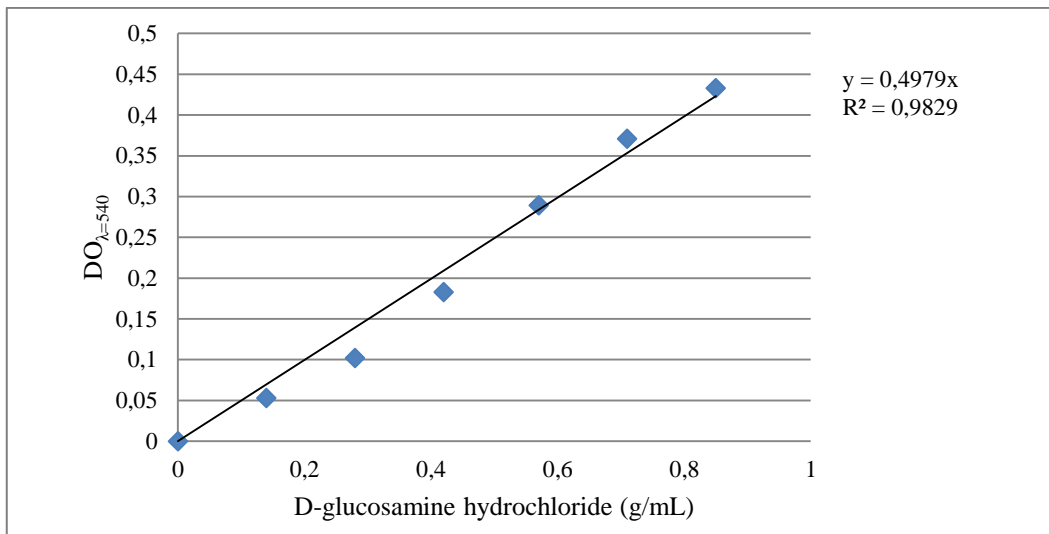
Tampon acétate de sodium 0,01 M

Acétate de sodium0,82g
 Acide acétique glacial0,57mL
 Eau distillée1000mL
 pH 5,0

Réactif DNS (Miller *et al.*, 1956)

NaOH1g
 Potassium Sodium Tartare18,2g
 3,5-Dinitrosalicylic Acid1g
 Phénol0,2g
 Sodium sulfite0,05g
 Eau distillée100mL

ANNEXE : 03



Courbe d'étalonnage du D-Glucosamine hydrochloride (215,64 g/mol)

Nomogramme de sulfate Ammonium (T°=4°C)

		Final Concentration of Ammonium Sulfate (% saturation)													
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90
		Grams of solid (NH ₄) ₂ SO ₄ to be added to 1 liter of solution.													
Initial Concentration of Ammonium Sulfate (% saturation)	0	114	144	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662
	20		29	59	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520
	25			30	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485
	30				30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449
	35					31	63	94	129	164	200	238	278	319	411
	40						31	63	97	132	168	205	245	285	375
	45							32	65	99	134	171	210	250	339
	50								33	66	101	137	176	214	302
	55									33	67	103	141	179	264
	60										34	69	105	143	227
	65											34	70	107	190
70												35	72	153	
75													36	115	
80														77	

Actinomycetes are bacteria known to produce a multitude of enzymes such as chitinases. Chitinase is recently used as one of the ways of biological fight. Their capacity to degrade the chitin allows them to be used as antifungal less toxic and less expensive than the phytosanitary products. It is massively used for the treatment of the fields of cultures against phytopathogenes Fungi.

The medium CCA, containing some colloidal chitin as the only source of carbon and energy was used to highlight and select the best actinomycetal strain producer of chitinase. The strain GF 44b belonging to the kind *Kribbella* was held for the continuation of the study.

The optimization of the conditions of culture on liquid medium allowed to determine a production of chitinase maximal by the strain GF44b (0,0407U/mL), after a period of incubation of 8 days, with an optimal pH of 9, and a temperature of 30°C.

After fermentation and extraction of the extracellular chitinase produced by GF 44b by precipitation in the sulfate of ammonium (50-80 %), the concentrated enzymatic extract was tested to estimate its activity on three Fungi tests (*Aspergillus Niger* CIP on 1431, *Trichophyton rubrum* CIP 2043.92, *Fusarium oxysporum* CIP 625.72).

The test of antifungal activity showed itself positive against all the fungi. A zone of inhibition was noted around disks containing the chitinase while no zone appears to the periphery of the negative witnesses containing the distorted enzyme. This shows that the inhibition is due to the action of chitinases against fungi.

This promising result allows to pursue the characterization of this enzyme, and to see its possible application as an agent of bio control in the agricultural and medical domain.

Keywords: Chitinases, Actinomycetes, *Kribbella*, antifungal activity, optimization.

بكتيريا الأكتينومييسات معروفة بإنتاج مجموعة متنوعة من الإنزيمات مثل الكيتيناز التي تستخدم مؤخرا كوسيلة للمكافحة البيولوجية، و قدرتها على تفكيك الكيتين تسمح باستخدامها لأنها أقل سمية وأقل تكلفة من المبيدات الاصطناعية، التي تستخدم على نطاق واسع لعلاج حقول المحاصيل ضد الفطريات الممرضة للنبات.

تم استخدام الوسط CCA الذي يحتوي على الكيتين الغروية كمصدر وحيد للكربون والطاقة لاختيار أفضل سلالة الأكتينومييسات المنتجة للكيتيناز. وقد تم اختيار السلالة GF 44b من جنس *Kribbella* لمواصلة الدراسة. تم دراسة الأوضاع المثلى للزرع في الوسط السائل لتحديد الطاقة الانتاجية القصوى للكيتيناز من طرف سلالة GF44b ، و التي بدت بعد 8 أيام، مع درجة الحموضة المثلى من 9، ودرجة حرارة 30°C .

بعد التخمير واستخراج الكيتيناز الخارج خلوية التي تنتجها GF 44B بعد الترسيب بسلفات الأمونيوم (50-80%). تم اختبار مستخلص الانزيم المركز لتقييم نشاطه على ثلاثة الفطريات (*Aspergillus Niger* CIP 1431 ، *Trichophyton rubrum* CIP 2043.92 ، *Fusarium oxysporum* CIP 625.72) حيث كان اختبار النشاط ضد كل الفطريات إيجابيا. ولوحظ وجود منطقة تثبيط حول الأقراص التي تحتوي على الكيتيناز مع عدم ظهور أي منطقة تثبيط في محيط الشواهد السلبية التي تحتوي على الانزيم المشوه . هذا يدل على أن التثبيط هو نتيجة لعمل الكيتيناز ضد الفطريات. هذه النتيجة الواعدة تسمح بإجراء المزيد من التوصيف لهذا الانزيم، و تطبيقه كعامل للمكافحة الحيوية في ميدان الزراعة والطب.

الكلمات المفتاحية : الأكتينومييسات, الكيتيناز , *Kribbella* , اختبار النشاط ضد الفطريات , المكافحة الحيوية.

Réalisé par : BADER Romeila et HARROUDJ Ryma

Thème :

Production de Chitinases par des Actinomycètes d'origine rhizosphérique et clinique.

Résumé :

Les actinomycètes sont des bactéries connues pour produire une multitude d'enzymes tels que les chitinases. Les chitinase sont récemment utilisées comme un des moyens de lutte biologique. Leur capacité à dégrader la chitine permet de les utilisées comme des anti-fongiques moins toxiques et moins couteux que les produits phytosanitaires, Massivement utilisés pour le traitement des champs de cultures contre les champignons phytopathogenes.

Le milieu CCA, contenant de la chitine colloïdale comme seul source de carbone et d'énergie a été utilisé afin de mettre en évidence et de sélectionner la meilleure souche actinomycétale productrice de chitinase. La souche GF 44b appartenant au genre *Kribbella* a été retenue pour la suite de l'étude.

L'optimisation des conditions de culture sur milieu liquide a permis de déterminer une production de chitinase maximale par la souche GF44b (0,0407U/mL), après un temps d'incubation de 8jours, avec un pH optimale de 9, et une température de 30°C.

Après fermentation et extraction de la chitinase extracellulaire produite par GF 44b par précipitation au sulfate d'ammonium (50-80%). L'extrait enzymatique concentré a été testé afin d'apprécier son activité sur trois champignons tests (*Aspergillus niger* CIP 1431, *Trichophyton rubrum* CIP 2043.92, *Fusarium oxysporum* CIP 625.72). Le test d'activité antifongique s'est révélé positif contre tous les champignons. Une zone d'inhibition a été notée autour des disques contenant la chitinase alors qu'aucune zone n'apparaît à la périphérie des témoins négatifs contenant l'enzyme dénaturée. Ceci montre que l'inhibition est due à l'action des chitinases sur les champignons. Ce résultat prometteur permet de poursuivre la caractérisation de cette enzyme, et voir son éventuelle application comme un agent de biocontrôle dans le domaine agricole et médical.

Mots clefs : Chitinases, Actinomycètes, *Kribbella*, Optimisation, Activité antifongique, lutte biologique.

Département de Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Constantine1