



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**Département :** Microbiologie

**قسم :** الميكروبيولوجيا.

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Écologie et environnement

**Spécialité :** Écologie microbienne

Intitulé :

---

**Le rôle des bactéries du genre *Nocardiosis* dans la production des enzymes**

---

**Présenté et soutenu par :** BOUANAKA Soumia

**Le :** 27/09/2020

FANTAZI Ikram

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** KITOUNI Mahmoud (Prof - UFM Constantine).

**Rapporteur :** OULMI Lamia (MCB - UFM Constantine).

**Examineurs :** ZERMAN Feriel (MAA- UFM Constantine).

**Année universitaire  
2019 - 2020**

## **REMERCIEMENTS**

*Nous remercions très vivement Mr. KITOUNI Mahmoud qui nous a fait l'honneur d'examiner et de présider notre jury.*

*Nos remerciements s'adressent également à Mme. ZERMAN Feriel d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier notre chère encadreur Mme. OULMI Lamia pour avoir accepté la responsabilité de ce travail malgré ses nombreuses obligations, pour ses précieux conseils, sa confiance et son aide durant toute la période du travail.*

*Un grand remerciement pour tous nos enseignants pour leurs contributions dans notre cursus universitaire, dans le département de Microbiologie, Université des Frères Mentouri*

*Constantine*

*1.*

## **Dédicaces**

### **À mes chers parents**

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma  
Considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction  
Merci pour tout le soutien et l'amour que vous m'avez apporté tout au long mes étude.*

### **À mon cher frère et ma chère sœur**

#### **Ahmed et Inès**

*Comme preuve de mon amour fraternel, de ma profonde affection et de ma gratitude, je  
vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.*

*À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.*

*À ma très chère cousine **Hanane** un grand merci à vous pour toute l'attention que vous  
m'avez accordée à le temps où j'avais besoin de soutien.*

*Je remercie ma très cher amis **Boutheina** de tout le soutien et l'amour que vous m'avez  
apporté. Je te souhaite une belle vie.*

*Pour ma très chère amis **Sara** un grand merci pour votre fidélité. Je te souhaite une  
belle vie.*

*À tous ceux qui me sont chers et qui m'aiment.*

**Soumia**

## ***Dédicace***

*A mes très chers parents,*

*qui m'ont transmis le désir d'apprendre et m'ont toujours accompagné tout au long de mes études avec leur amour, leurs encouragements, en hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti pour moi. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis. Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude.*

*Veillez trouver dans ce travail le fruit de toutes vos espérances et vos*

*Sacrifices.*

*Je dédie ce mémoire à mes très chers frères*

*A toute ma famille*

*A mes amies, mes enseignants, et camarades de classe du collège, du lycée et de l'école Chajarat el dur.*

*Je dédie affectueusement ce travail et j'adresse à tous un grand merci pour tout*

***Ikram***

## **Résumé**

*Nocardiopsis* est un genre bactérien appartenant au phylum des actinobactéries. Décrit par Meyer en 1976, il est le genre type de la famille Nocardiopsaceae. Les membres de ce genre sont aérobies, catalase positive, à coloration de Gram positive et non acido-alcolo-résistants. Ubiquitaire, ils sont omniprésents dans plusieurs environnements terrestres et aquatiques avec des espèces pouvant s'adapter aux milieux les plus extrêmes. Les bactéries de ce genre sélectionnent une importance biotechnologique à cause de leur grande variété de métabolites bioactifs principalement les antibiotiques et les enzymes. Ces derniers agissent sur différentes molécules naturelles tels que la cellulose, l'amidon, le xylane, la kératine...

Les enzymes d'origine microbiennes sont utilisées dans de nombreuses applications très diverses, industries agroalimentaire, textiles, papeterie, pharmaceutique, chimie fine, cosmétique, et même dans la valorisation des déchets et le recyclage par bioconversion des ressources renouvelables. Reconnus comme technologie écologique, elle est très rentable et sans danger.

### **Mots clés :**

*Nocardiopsis*, actinobactéries, enzyme, molécules bioactif.

## **Abstract**

*Nocardiopsis* is a bacterial genus belonging to Actinobacteria phylum. Described by Meyer in 1972, it's the type genus of the Nocardiopsaceae family. Members of this genus are aerobic, catalase positive with Gram positive staining and non-acid alcohol resistant. Ubiquitous, they are omnipresent in several terrestrial and aquatic environments with species that can adapt to the most extreme environments. Bacteria of this genus have a biotechnological importance because of their great variety of bioactive metabolites mainly antibiotics and enzymes. These biomolecules act on different natural molecules such as cellulose, starch, xylan, keratin... Microbial enzymes are used in a wide variety of applications, agro-food industries, textile, papermaking, pharmaceutical, fine chemicals, cosmetics, waste recovery and recycling by bioconversion of renewable resources, recognized as ecological technology, it's very profitable and safe.

## **Key words :**

*Nocardiopsis*, actinobacteria, enzymes, bioactive molecules.

## المخلص

*Nocardiosis* هو نوع من البكتيريا ينتمي الى شعبة الأكتينوبكتيريا. صنف من طرف Meyer في عام 1976، كنوع ممثل لعائلة Nocardiosaceae. أفراد هذا النوع هم بكتيريا هوائية, منتجة لإنزيم الكتالاز, ايجابية ال Gram وغير مقاومة للكحول و الأحماض. تتواجد في العديد من المناطق الارضية: البيئات الترابية منها والمائية، مع وجود أنواع قادرة على التكيف في الأوساط القاسية. لبكتيريا هذا النوع أهمية بيوتكنولوجية راجعة إلى التنوع الكبير لمواد الأيض التي تفرزها وذات النشاط البيولوجي، خاصة المضادات الحيوية والإنزيمات. هذه الأخيرة قادرة على تحليل مختلف الجزيئات الطبيعية مثل السليلوز، النشاء، الكيراتين...

الإنزيمات ذات الأصل الميكروبي لها عدة استعمالات منها الصناعات الزراعية، صناعة الاقمشة، صناعة الورق، الصناعة الصيدلانية ومستحضرات التجميل. كما تستعمل في استعادة النفايات والرسكلة عن طريق التحويل البيولوجي للمصادر المتجددة. استعمال الانزيمات في مختلف الصناعات تقنية ايكولوجية معروفة، مربحة جدا ودون أضرار.

الكلمات المفتاحية:

*Nocardiosis*, الأكتينوبكتيريا, الإنزيمات, الجزيئات الطبيعية.

## Liste des abréviations

**G** : guanine

**ASW** : artificial sea water

**C** : cytosine

**CMC** : carboxymethyl cellulose

**PHAs** : polyhydroxyalcanoates

**CMA** : milieu complexe agar

**TSA** : tripticase-soja-agar

**ISP** : International *Streptomyces* project

**NaCl** : chlorure de sodium

**DAP** : diaminopimélique acide

**PHB** : polyhydroxybutyrate

**UFC** : unité formant colonies

**rpm** : rotation par minute

**AIA** : acide indole acétique

**AS** : acide salicylique

**PHB**: polyhydroxybutyrate

**PHAs** : polyhydroxyalcanoate

## List des tableaux

**Tableau 1 :** distribution de quelques espèces de genre *Nocardioopsis*.....11

## Liste des figures

**Figure1 :** caractéristiques morphologiques de *N.dassonvillei* (a) colonies sur gélose nutritives, (b) image sous microscope photonique des spores, (c) image au microscope électronique à balayage (MEB) du mycélium et (d) image MEB des spores.....5

**Figure 2 :** Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre la majorité des espèces de *Nocardioopsis*.....6

**Figure3 :** (a) culture sur gélose au sang d'une souche du genre *Nocardioopsis*, (b) culture sur milieu ISP2 d'une souche du genre *Nocardioopsis*.....7

**Figure 4 :** (a) mycélium aérien de l'espèce *Nocardioopsis algeriensis* (b) micromorphologie de *Nocardioopsis sinuspersici* sous microscope électronique.....8

**Figure 5 :** observation microscopique des mycéliums de quelques souches appartenant au genre *Nocardioopsis* après coloration de Gram.....8

**Figure 6 :** les chimiotypes présents chez le genre *Nocardioopsis*, principalement la forme DL de l'acide diaminopimélique (DAP), l'absence de glycine et des sucres caractéristiques.....10

**Figure 7 :** structure des isomères de l'acide diaminopimélique.....10

**Figure 8 :** la structure de l'enzyme  $\alpha$  amylase, en rouge le domaine A en bleu le domaine B en vert le domaine C.....16

**Figure 9 :** la structure de l'enzyme protéase « protéase à cystéine.....17

**Figure 10 :** La structure en 3D de l'enzyme kératinase.....19

**Figure 11 :** observation sous microscope électronique de la morphologie de la paille de riz avant (a) et après (b) les changements structuraux pendant huit jours d'incubation au *Nocardioopsis.sp* (KNU).....20

**Figure 12 :** la structure de xylinase de la famille 10.....23

**Figure 13 :** la structure de PHB dans le cytoplasme de la cellule.....24

## Table des matières

### REMERCIEMENTS

Résumé

Liste des abréviations.....	I
List des tableaux .....	II
Liste des figures .....	II
Introduction.....	1

### La souche bactérienne

1. Des généralités sur les actinomycètes .....	3
2. Le genre <i>Nocardiopsis</i> .....	5
2.1 La définition du genre .....	5
2.2 La taxonomie du genre <i>Nocardiopsis</i> .....	5
2.3 Les caractéristiques de la souche bactérienne .....	7
2.3.1 Les caractéristiques culturaux.....	7
2.3.2 Les caractéristiques morphologiques.....	7
2.3.3 Les caractéristiques physiologiques.....	9
2.3.4 Les caractéristiques biochimiques .....	9
2.4 L'écologie et la distribution des bactéries de genre <i>Nocardiopsis</i> .....	10
2.5 La pathogénécité des bactéries du genre <i>Nocardiopsis</i> .....	12

### L'activité enzymatique

1. Des généralités sur les enzymes .....	14
1.1 La définition d'une enzyme .....	14
1.2 Les enzymes d'origines microbiennes .....	14
2. L'activité enzymatique des bactéries du genre <i>Nocardiopsis</i> .....	14
3. Les enzymes produites par les bactéries du genre <i>Nocardiopsis</i> et leurs applications	15
3.1 L'amylase.....	16

3.1.1	Définition .....	16
3.1.2	Applications de l'enzyme .....	16
3.2	La protéase .....	17
3.2.1	Définition .....	17
3.2.2	Applications de l'enzyme .....	17
3.3	La kératinase .....	18
3.3.1	Définition .....	18
3.3.2	Applications de l'enzyme .....	19
3.4	La chitinase .....	19
3.4.1	Définition .....	19
3.4.2	Applications de l'enzyme .....	20
3.5	La cellulase.....	20
3.5.1	Définition .....	20
3.5.2	Applications de l'enzyme .....	21
3.6	L'inulinase.....	21
3.6.1	Définition .....	21
3.6.2	Applications de l'enzyme .....	21
3.7	La xylanase.....	22
3.7.1	Définition .....	22
3.7.2	Applications de l'enzyme .....	22
3.8	La polyhydroxybutyrate (PHB) dépolymérase .....	23
3.9	La $\beta$ -1,3-glucanase .....	24
4.	L'importance biotechnique.....	24
4.1	L'importance biotechnique des bactéries actinomycétales .....	24
4.2	L'importance biotechnique des bactéries du genre <i>Nocardiopsis</i> .....	25
4.2.1	La production de biosurfactants.....	25
4.2.2	L'utilisation de <i>Nocardiopsis</i> dans la bioremédiation .....	25

4.2.3	La production d'osmorégulateurs ou de solutés compatibles.....	25
4.2.4	La production des antibiotiques.....	26
4.2.5	L'utilisation dans le domaine agronomique.....	26

### **Les méthodes de recherches des nouvelles enzymes d'origine microbiennes**

1.	La recherche de l'enzyme $\alpha$ amylase.....	28
1.1	Caractéristiques de l'enzyme .....	28
1.2	Choix du site et isolement de la souche bactérienne.....	28
1.3	Culture des cellules .....	29
1.4	Production de l'enzyme.....	29
1.5	Purification de l'enzyme.....	29
2.	La recherche de l'enzyme protéase .....	30
2.1	Caractéristiques de l'enzyme .....	30
2.2	Choix du site et isolement de la souche bactérienne.....	30
2.3	Culture des cellules .....	31
2.4	Production de l'enzyme.....	31
2.5	Purification de l'enzyme.....	31
3.	La recherche de l'enzyme inulinase .....	31
3.1	Caractéristiques de l'enzyme .....	31
3.2	Choix du site d'isolement.....	32
3.3	La production de l'enzyme.....	32
3.4	La purification de l'enzyme.....	32
4.	La recherche de l'enzyme cellulase et xylanase.....	33
4.1	Caractéristiques de l'enzyme .....	33
4.2	Choix du site et isolement.....	33
4.3	Culture des cellules .....	34
4.4	Production de l'enzyme.....	34
5.	La recherche de l'enzyme kératinase .....	34

5.1	Caractéristiques de l'enzyme .....	34
5.2	Choix du site et isolement de la souche bactérienne.....	35
5.3	Culture des cellules .....	36
5.4	Production de l'enzyme.....	36
6.	La recherche de l'enzyme PHB dépolymérase.....	36
6.1	Particularité de l'enzyme.....	36
6.2	Choix du site et l'isolement des microorganismes.....	36
6.3	Culture des cellules .....	36
6.4	Production d'enzyme .....	37
	<b>Conclusion</b> .....	<b>38</b>
	<b>Références bibliographique</b> .....	<b>40</b>
	<b>Annexe</b>	

# **Introduction**

## Introduction

Les actinobactéries sont des microorganismes procaryotes ayant un pourcentage de guanine cytosine élevé généralement compris entre 60 et 75 %. Les bactériologistes les considèrent comme des bactéries tandis que les mycologistes les considèrent comme des champignons, mais ce problème est résolu et ils sont définitivement classés parmi les bactéries (Oulmi, 2014). La pluralité des espèces sont immobiles, hétérotrophes, mais certaines sont chimio-autotrophes, aérobies mésophiles et poussent de façon optimale. Elles synthétisent les antibiotiques et les autres molécules bioactives. Elles sont des producteurs d'une variété d'enzymes extracellulaires hydrolytiques qui participent à la dégradation et le recyclage des biopolymères naturels (Bennur *et al.*, 2014). Elles constituent en général 10 à 20% du total de la microflore tellurique (Bouras, 2005).

Les membres du genre *Nocardiopsis* ont été isolées de différents sites, elles appartiennent au phylum *Actinobacteria*, classe *Actinobacteria*, ordre *Actinomycetales*, et famille *Nocardiopsaceae* (Bennur *et al.*, 2014). Ils produisent une variété de composés bioactifs comme les agents antimicrobiens, substances anticancéreuse, les toxines les immunomodulateurs, et les enzymes extracellulaires (Bennur *et al.*, 2015).

Les enzymes sont importantes dans les applications biotechnologiques, telles que l'industrie alimentaire, la fermentation, les industries du textiles, du papier, les détergents et les denrées alimentaires (Harir, 2018).

L'objectif principal de notre travail consiste à étudier l'activité enzymatique du genre *Nocardiopsis*.

Notre travail est structuré en trois chapitres ;

Le premier chapitre, présente les bactéries du genre *Nocardiopsis*. Il aborde des généralités sur les actinomycètes, la définition du genre *Nocardiopsis*, les caractéristiques, la taxonomie, l'écologie et la distribution du genre.

Le deuxième chapitre, traite l'activité enzymatique et les enzymes produites par les bactéries du genre *Nocardiopsis*, l'importance des actinomycètes et l'activité anticrobieuse du genre *Nocardiopsis*.

Le troisième chapitre, expose les méthodes de recherche de nouvelles enzymes secrétées par les bactéries du genre *Nocardiopsis*, leurs caractéristiques, le choix du site

d'isolement des microorganismes, la culture des cellules, la production et la purification  
des enzymes.

**Généralité sur le genre**  
***Nocardiosis***

## 1. Des généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes ou les actinobactéries sont des bactéries à coloration de Gram positive, leur dénomination « Actinomycètes », provient de deux substantifs grecs « *aktino, mycetes* » qui signifie « champignons à rayons » ou champignons rayonnant. Les actinomycètes se situent dans l'ordre des *Actinomycetales*, dont le coefficient de Chargaff (G+C %) est supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75 %. Les bactériologistes les considèrent comme des bactéries tandis que les mycologistes les considèrent comme des champignons (Oulmi, 2014). Aujourd'hui, ce problème est résolu et ils sont définitivement classés parmi les bactéries. Leurs propriétés chimiques, physiologiques immunologiques, les regroupent parmi les procaryotes, leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine ou de l'acide diaminopimélique, la membrane nucléaire est absente, elles possèdent des organites flagellaires ressemblant à ceux des bactéries et aussi leur cytologie. Le diamètre de leurs hyphes est très petit, ces caractères confirment leur classification parmi les bactéries (Ouargli, 2018).

Les actinobactéries sont classées dans 55 Familles. L'ordre des *Actinomycetales* regroupe à lui seul presque 45 familles et près de 290 genres (Boudjellal, 2012). Une grande difficulté de leurs classification existe, elle est généralement basée sur les caractères morphologiques et la couleur du mycélium aérien et végétatif (Ameur, 2014).

La croissance des actinomycètes est lente, elles nécessitent un temps de génération moyen de deux à trois heures, plus lent que celle des autres bactéries. Les actinobactéries se développent en formant des filaments ramifiés (0.5 à 1.0 µm de diamètre), leur croissance sur un substrat solide comme la gélose donne un réseau ramifié d'hyphes qui se développe à la surface et à l'intérieur du substrat dans le but de former un mycélium végétatif (Ouargli, 2018).

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre dans la plupart des niches écologiques. La grande majorité est d'origine tellurique. Ces microorganismes sont aptes à coloniser de nombreux biotopes tels que air, composts, fourrages, eaux, grains de céréales, systèmes d'air climatisé, poussière de maison, résidus fibreux de canne à sucre, pollen des plantes et autres substrats (Boudjellal, 2012). Les actinomycètes colonisent fréquemment les substrats insolubles tels que le charbon par pénétration mécanique de la matrice (Oulmi, 2014).

Dans le sol, la majorité des actinobactéries sont saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus. Les actinobactéries du sol sont surtout présentes en surface, mais on peut les retrouver aussi à plus de dix mètres de profondeur. Elles produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur caractéristique des sols, plusieurs genres sont présents dans le sol tel que les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* ... le genre *Streptomyces* représente de 80 à 90% du total des actinobactéries mycéliennes (Saker, 2015). Ainsi, ces types des bactéries ont été également isolés à partir de nombreux environnements aquatiques tels que les eaux de mer, des océans, des sédiments marins, des eaux douces et des eaux issues de marécages salés (Saker, 2015). Plusieurs espèces appartenant aux genres *Streptomyces*, *Nocardiosis*, etc., produisent la géosmine qui donne à la terre une odeur de moisi (terreux) et à l'eau des réservoirs un goût et une odeur désagréable (Bouras, 2005).

La pluralité des actinobactéries préfèrent un pH neutre ou peu alcalin et sont mésophiles et non halophiles. Une proportion relativement faible peut être thermophile, psychrophile, halophile, acidophile ou alcalophile. Différentes actinobactéries ont été isolées à partir d'écosystèmes présentant des conditions de température, de pression, de teneur en sel et /ou de pH hostiles c'est à dire les sols polaires gelés, les sols désertiques chauds et secs, le pétrole brut, les sols hautement contaminés par des métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés (Saker, 2015).

Certaines actinobactéries causent des pathogénicités pour l'homme, l'animal, ou encore les plantes. D'autre part, certaines sont des symbiotes de plantes en les offrant plusieurs avantages comme la fixation de l'azote par le genre *Frankia* (Saker, 2015).

Généralement, le type trophique des actinomycètes est l'hétérotrophie, en utilisant une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris les biopolymères complexes (chitine, cellulose, lignine) (Hocinat, 2018), mais plusieurs espèces sont aptes à se développer d'une façon chimio-autotrophique. Certaines ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés, et sont sensibles aux lysozymes et aux agents antibactériens (Oulmi, 2014).

Dans le domaine de la biotechnologie des microorganismes, les actinobactéries ont une grande importance, ceci est dû à leur capacité de produire un nombre important des substances naturelles et utilisables dans différents domaines. Aujourd'hui, les

actinobactéries sont impliqués dans la recherche de nouveaux composants essentiels à la découverte de médicaments à large spectre d'activité biologique, tels que les antibiotiques antibactériens et antifongiques, ainsi les différents produits bioactifs comme les enzymes qui ont été utilisées dans les processus biotechnologiques (Boudjelal, 2012).

## 2. Le genre *Nocardiopsis*

### 2.1 La définition du genre

En 1976, le genre *Nocardiopsis* a été décrit pour la première fois par Meyer. À ce jour, le genre contient 44 espèces validées (Saker, 2015). Il comprend des actinobactéries aérobies, catalase positive à coloration de Gram positive, non acido-résistants, ayant la capacité de former des spores asexuées figure1 (b) et (d) avec une teneur en pourcentage en guanine et cytosine (G+C) supérieur à 55% (Li *et al.*, 2013).

*No.car.di.op'sis.* est un mot latin formé par la composition de deux mots «*Nocardia*» genre des actinomycetes et «*opsis*» apparence. Donc le mot *Nocardiopsis* est un nom féminin qui signifie un organisme qui a une apparence des *Nocardia* (Hozzein et Trujillo, 2012).

Le genre *Nocardiopsis* est le genre-type de la famille des *Nocardiopsaceae*. Les bactéries de ce genre possèdent un mycélium nocardioforme figure1 (c) avec une longue chaîne de spores sur les parties aériennes (Hatem Ibrahim *et al.*, 2018).

Selon plusieurs études, un grand nombre d'espèce a été signalé à divers endroits terrestres et aquatiques comme les habitats salins et hyper salins : les marais, les sols désertiques et les environnements marins (Bennur *et al.*, 2015).

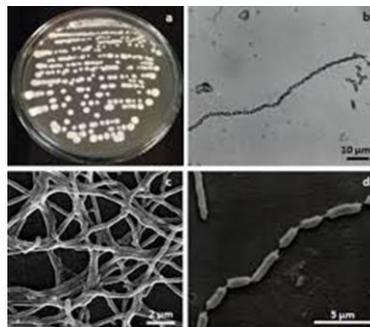


Figure2 : caractéristiques morphologiques de *N.dassonvillei* (a) colonies sur gélose nutritives, (b) image sous microscope photonique des spores, (c) image au microscope électronique à balayage (MEB) du mycélium et (d) image MEB des spores (Bennur *et al.*, 2015).

### 2.2 La taxonomie du genre *Nocardiopsis*

Le genre *Nocardiopsis* appartient au Phylum *Actinobacteria*, La Classe *Actinobacteria*, la Sous-Classe *Actinobacteridae* et l'ordre *Actinomycetales*, la famille *Nocardiopsaceae*. Cette dernière a été créée par Rainey et ses collaborateurs en 1996. Après une année, cette famille a été combinée avec les *Streptosporangiaceae* et *Thermonosporaceae*, dans le sous ordre des *Streptosporangineae* de l'ordre des *Actinomycetales*. La famille *Nocardiopsaceae* contenait uniquement le genre-type *Nocardiopsis*, plus tard, les chercheurs ont découvert quatre nouveaux genres appartenant à cette famille et sont : *Thermobifida*, *Streptomonospora*, *Haloactinospira*, *Marinactinospira*. L'arbre phylogénétique de la figure 2 montrant les relations phylogénétiques entre les espèces de *Nocardiopsis* (Boudjelal, 2012).

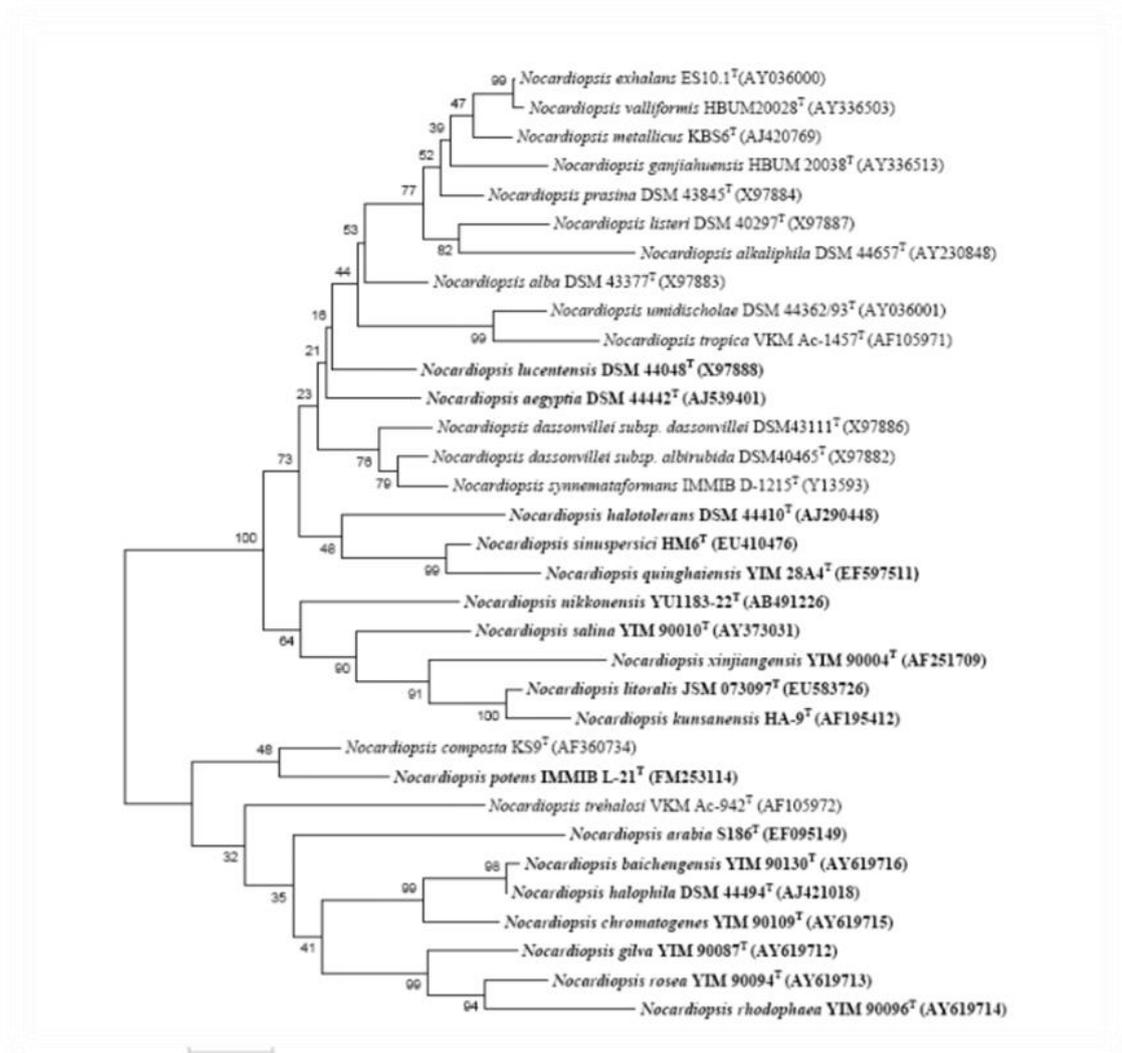


Figure 2 : Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre la majorité des espèces de *Nocardiopsis* (Boudjelal, 2012).

## 2.3 Les caractéristiques de la souche bactérienne

### 2.3.1 Les caractéristiques culturaux

La culture des souches bactériennes du genre *Nocardiopsis* nécessite certains milieux, principalement le milieu complexe agar (CMA), trypticase-soja agar (TSA), sels inorganique-amidon-agar (ISP4) et extrait de levure-extrait de malt-agar (ISP2) préconisés par l'International *Streptomyces* Project (ISP) (Boudjelal, 2012 ; Ouargli, 2018), certaine espèce halophile ont besoins d'un pourcentage de sel de NaCl (10%) pour les cultivée. Après une période d'incubation de 12 jours à 30 °C, Les bactéries se développent de façon très abondante sur milieux CMA et TSA pour l'ensemble des souches, un développement modérée sur milieu ISP2 et faible sur milieu ISP4 (Boudjelal, 2012).

### 2.3.2 Les caractéristiques morphologiques

Les caractères morphologiques des actinomycètes sont énoncés dans les Bergey's Manual des années 1989, 1994 et 2010. Ces caractères permettent d'avoir une différenciation entre les groupes d'actinomycètes. Ils sont divisés en macromorphologiques et micromorphologiques (Boudjelal, 2012).

#### Les caractéristiques macromorphologiques

Généralement, les souches du genre *Nocardiopsis* se développent sur un milieu gélosé en forment des colonies compactée d'aspect corné avec des bords incrustés et filamenteux, comme illustrés dans la figure 3 (Oulmi, 2014). Ces colonies sont circulaires, rugueuses, sèches, grossièrement plissées, minces et plates, de couleur blanche (Zerizer, 2014). Les mycéliums aériens sont mieux produits et abondants, de couleur blanchâtre à blanc-beige. Le mycélium de substrat possède des colorations différentes, peuvent-être crème, jaune claire, jaune-olive, brun ou gris. Les pigments solubles sont totalement absents (Oulmi, 2014 ; Boudjelal, 2012).

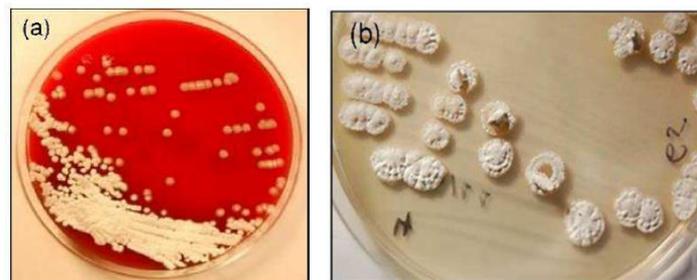


Figure 3 : (a) culture sur gélose au sang d'une souche du genre *Nocardiopsis*, (b) culture sur milieu ISP2 d'une souche du genre *Nocardiopsis* (Oulmi, 2014).

### Les caractéristiques micromorphologiques

l'observation de quelques hyphes aériens sous un microscope optique montre la présence d'un long mycélium de substrat, bien développé, et très ramifié, avec des branches irrégulières, arrangées comme des palissades et qui se fragmentent avec l'âge de la culture en éléments sous forme de bacilles et coccobacilles non mobiles (Zerizer, 2014). Alors que le mycélium aérien est long et modérément ramifié (Oulmi, 2014).

Le mycélium forme des chaînes d'arthrospores longues, droites ou flexibles (contenant 10 à 20 spores par chaîne) irrégulièrement courbées (Zerizer, 2014). Le mycélium aérien se fragmentant de manière anarchique en chaînes de spores figure 4 souvent en "zig-zag" (Boudjelal, 2012). En effet, le mycélium donne de longs segments qui par la suite se subdivisent en petites spores en forme de bacilles allongés de différentes longueurs ( $0,3-0,5 \times 1,0-2,0 \mu\text{m}$ ). Les spores sont lisses et immobiles (Oulmi, 2014). Les figures 4 et 5 ci-dessous montrent, à titre d'exemple, la micromorphologie de deux souches du genre *Nocardiopsis*.

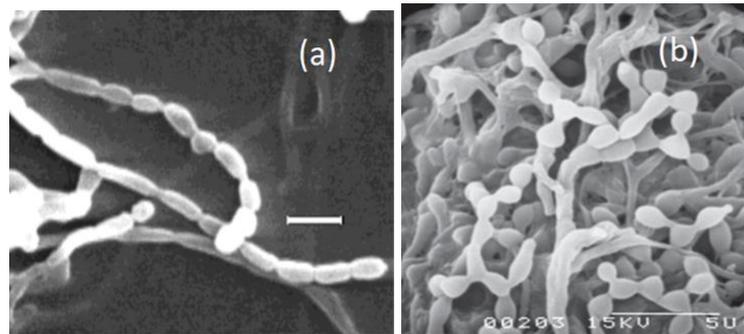


Figure 4 : (a) mycélium aérien de l'espèce *Nocardiopsis algeriensis* (Bouras *et al.*, 2015), (b) micromorphologie de *Nocardiopsis sinuspersici* sous microscope électronique (Saker, 2015).

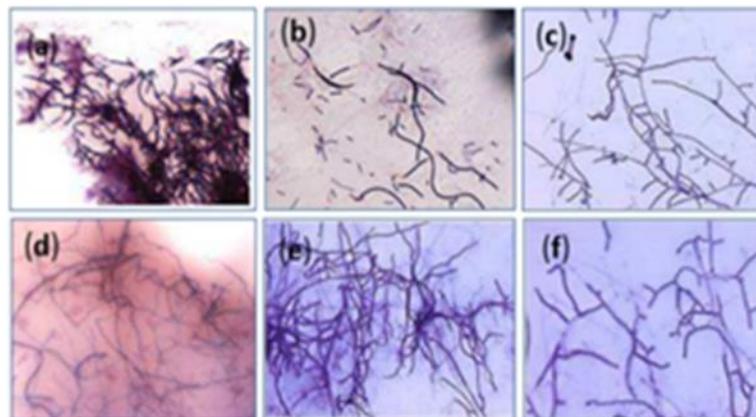


Figure 5 : observation microscopique des mycéliums de quelques souches appartenant au genre *Nocardiopsis* après coloration de Gram (Oulmi, 2014).

### 2.3.3 Les caractéristiques physiologiques

L'étude physiologique des actinobactéries consiste à faire des tests de dégradation de différents composés, des tests de résistance aux différents agents chimiques, la tolérance au pH, à la température et à la salinité, etc. (Saker, 2015)

La physiologie des souches bactériennes du genre *Nocardiopsis* montre que ces dernières présentent des différentes exigences de températures, d'alcalinité et de salinité pour leur développement (Oulmi, 2014).

Les souches peuvent croître sur des milieux de culture dont la concentration en NaCl varie de 7 à 15%, et presque aucune ne croît à 0%. Certaines d'entre elles peuvent supporter jusqu'à 20% (ou plus) avec un optimum de croissance à 10%. Elles peuvent être définies comme des microorganismes halotolérants ou halophiles modérés (Boudjelal, 2012). Pour la température, il existe des espèces thermotolérantes qui se développent à 30 et 35 °C et à 37 °C, et certaines thermophiles sont aptes de croître à 42 °C et à 45 °C (Boudjelal, 2012 ; Oulmi, 2014).

Ainsi un intervalle de pH permettant le développement des souches alcalotolérantes ou alcalophiles est de 7 à 9 et (pH optimum est de 7) ou de 8 à 12. (Boudjelal, 2012 ; Oulmi, 2014).

Les bactéries de ce genre possèdent une sensibilité aux lysozymes et une forte exigence de présence de l'oxygène pour la majorité des souches. (Oulmi, 2014).

### 2.3.4 Les caractéristiques biochimiques

La paroi cellulaire du genre *Nocardiopsis* est de type IIIC : DL (mésodiaminopimélique DAP, la figure 7 représente la structure de l'acide diaminopimélique. Elle est caractérisée par l'absence de glycine et d'acides mycoliques. Les phospholipides membranaires sont de type PIII, caractérisés par la présence de la phosphatidylcholine. Dans l'hydrolysate cellulaire, du glucose et du ribose ont été détectés ; les sucres caractéristiques comme l'arabinose, le madurose, la xylose ou le rhamnose sont absents. Le type cellulaire en acides gras correspond au type 3d (dominance d'acides gras à chaînes ramifiées en C16 et C17 iso/antéiso et d'acides gras à chaînes ramifiées et méthylées), ce type est caractéristique du genre *Nocardiopsis*. Les ménaquinones est de type MK10 avec un degré variable de saturation dans la chaîne latérale, ainsi que le taux de G+C est compris entre 64 et 69 %. (Boudjelal, 2012 ;

Saker, 2015). La figure 6 ci-dessous montre quelques caractéristiques biochimiques rencontrées chez les actinobactéries notamment le genre *Nocardiopsis*.

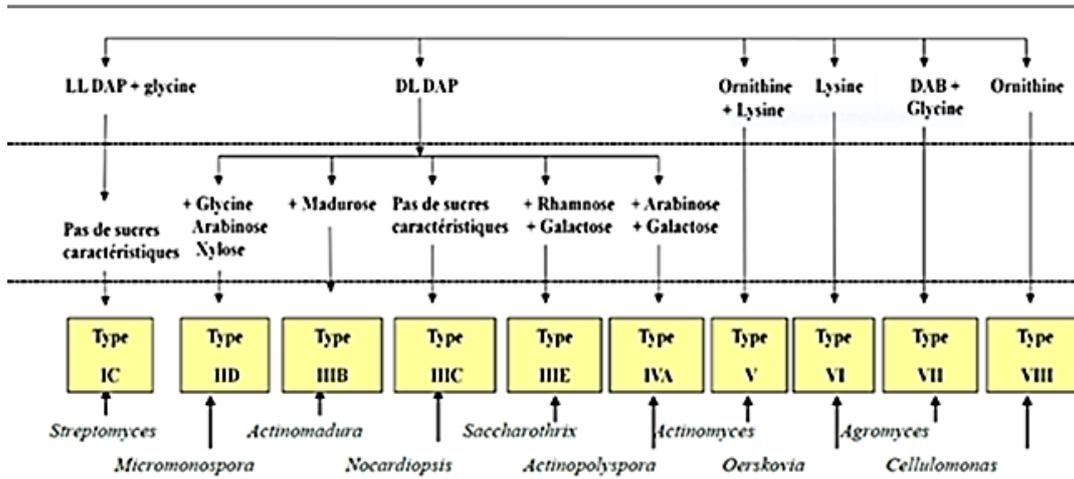


Figure 6 : les chimiotypes présents chez le genre *Nocardiopsis*, principalement la forme DL de l'acide diaminopimélique (DAP), l'absence de glycine et des sucres caractéristiques (Saker, 2015).

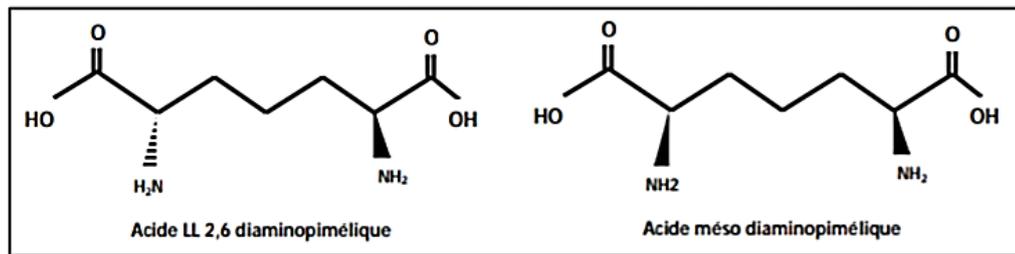


Figure 7 : structure des isomères de l'acide diaminopimélique (Zerizer, 2014).

#### 2.4 L'écologie et la distribution des bactéries de genre *Nocardiopsis*

Le genre *Nocardiopsis* est écologiquement universel, il a été détecté dans plusieurs environnements. Différentes espèces du genre *Nocardiopsis* ont également été trouvées dans un glacier antarctique, des sédiments marins, la rhizosphère végétale, les intestins des animaux, les mers salées, les prélèvements cliniques, les déchets ménagers, les graines fermentés, les ruches et le miel d'abeilles domestiques, l'eau et la matière organique en décomposition (Zerizer, 2014).

Selon le Bergey's manual, les espèces de *Nocardiopsis* comme la plupart des autres actinomycètes sont généralement associées aux sols (Dolak et al., 1980, 1981 ; Mikami et al., 1982 ; Mishra et al., 1987 ; Wang et al., 1999 ; Xu et al., 1998). Il y a plusieurs rapports sur la présence de la bactérie sur des sites terrestres avec d'autres actinomycètes. Zitouni et ses collègues ont isolé 86 souches prélevées des échantillons de sol de Sahara Algérien, 54 souches sont du genre *Nocardiopsis* (Zitouni

*et al.*, 2005). Hozzein *et al.* ont isolée des espèces de *Nocardiopsis* à partir d'échantillon de sol désertique d'Égypte (Hozzein et Goodfellow, 2008).

Plusieurs études sur la diversité des actinomycètes en milieu aquatique ont abouti à l'isolement de certaines espèces de *Nocardiopsis*. Ces bactéries ont été isolées d'une grande variété d'habitats comme les sédiments de mer, de bassins, de lac alcalin, d'anémone de mer, d'éponge de mer ... (Zerizer, 2014). La souche bactérienne *Nocardiopsis antarcticus* a été isolée d'un glacier antarctique à un horizon de 85 m de profondeur et elle est nommée selon leur origine (Kroppenstedt *et al.*, 2017).

Le genre *Nocardiopsis* est fréquemment isolé à partir d'autres endroits. Les espèces *Nocardiopsis yanglingensis*, *Nocardiopsis compostus* sont isolées successivement de composte et de l'atmosphère d'une installation de compostage (Bennur *et al.*, 2015 ; Kroppenstedt *et al.*, 2017). Le tableau ci-dessous représente quelques espèces bactériennes du genre *Nocardiopsis*, leurs habitats naturels et les conditions optimales d'isolement.

Tableau 1 : distribution de quelques espèces de genre *Nocardiopsis* (Benneur *et al.*, 2015).

<i>Nocardiopsis sp.</i> emplacement.	Les conditions optimales.	Détails de la nomenclature et autres fonctionnalités.
<i>N. halophila</i> sol salin ; Irak.	NaCl : 20% ; température : 30 ° C.	<i>halophila</i> : aimer le sel.
<i>N. xinjiangensis</i> sol salin ; Xinjiang, Chine.	NaCl : 10% ; pH : 7,2 ; température : 28 ° C.	<i>xinjiangensis</i> : concernant le site d'isolement (Xinjiang).
<i>N. algeriensis</i> , sol désertique d'Algérie.	NaCl : 0–5% ; pH : 7–10 ; température : 25–35 ° C.	<i>Algeriensis</i> : référence à l'Algérie (pays d'isolement).
<i>N. nikkonensis</i> ; sol de compost, Japon.	NaCl : 0–10% ; pH : 6-11 ; température : 30 °C.	<i>nikkonensis</i> : concernant le site d'isolement (Nikko, Japon).

<i>N. arabia</i> sol de dunes de sable, Egypte.	NaCl : 5% ; pH : 7,8 ; température : 28-30 ° C.	<i>arabia</i> : concernant l'Arabie.
<i>N. aegyptia</i> ; sédiments marins, Egypt.	NaCl : 5% ; température : 10 ° C.	<i>aegyptia</i> : d'Egypte Dégrade le poly (3- hydroxybutyrate).
<i>N. flavescens</i> sédiments marins, Chin.	NaCl : 0–3% ; pH : 7,2–7,5 ; température : 35 ° C.	<i>flavescens</i> : devenant jaune doré.
<i>N. yanglingensis</i> ; sol de compost, Chine.	NaCl : 5% ; pH : 7,5 ; température : 25–45 ° C.	<i>yanglingensis</i> : concernant le site d'isolement.
<i>N. compostus</i> ; air d'une installation de compostage en Allemagne.	NaCl : 15% ; pH : 6,5–9,5 ; température : > 10– 50° C	<i>compostus</i> : provenant du compost.

### 2.5 La pathogénéicité des bactéries du genre *Nocardiopsis*

Comme la plupart des actinomycètes pathogènes, les espèces de ce genre sont opportunistes plutôt que des agents pathogènes envahissants. Différentes souches de ce genre ont été isolées à partir du matériel clinique humain ou animal (Goodellow, 1998 ; Schaal et Beaman, 1984). Le premier cas de mycétome causé par *N. dassonvillei* a été publié par Sindhuphak *et al.*, (1985), qui ont isolé à plusieurs reprises des souches de *N. dassonvillei* à partir des nodules d'une jambe d'un homme âgé de 39 ans. Ajello *et al.*, 1987 ont confirmé la présence de *N. dassonvillei* dans les cas des actinomycétomes (Hozzein et Trujillo, 2012).

L'espèce *Nocardiopsis dassonvillei* (l'espèce type du genre *Nocardiopsis*) est impliquée dans différentes infections humaines comme les infections broncho-pulmonaires (Bernatchez et lebreux, 1991 ; Gughani *et al.*, 1998 ; Mordarska *et al.*, 1998).

Ainsi Liegard et Landrieu (1911) ont isolé des souches correspondant à la description de Brocq-Rousseau (1904) à partir d'un cas de conjonctivite oculaire où ils l'ont nommé *Nocardia dassonvillei*, qui devient plus tard *Nocardiopsis dassonvillei*. Elle a aussi été isolée à partir d'échantillons sanguins (Beau *et al.*, 1999).

L'isolement de l'espèce *Nocardiopsis dassonvillei* a été effectué à partir d'un prélèvement d'un site normalement stérile. Tandis que l'espèce *N. alba* a été isolée à partir de quatre types d'échantillons qui sont crachat, trachéal, ponction articulaire et pus, l'origine du pus n'est pas connue, donc il est difficile de savoir s'il est de suppuration superficielle ou de collection profonde. Les espèces *N. coralliicola* et *N. tropica* ont été isolées à partir des crachats de deux patients, par contre *N. ganjiahuensis* a été isolée à partir d'un liquide pleural (Oulmi, 2014).

Par ailleurs, l'isolement de trois espèces appartenant au genre *Nocardiopsis* qu'ils sont *N. alba*, *N. coralliicola* et *N. tropica*, a été effectué à partir des crachats de trois patients différent (Oulmi, 2014).

Bien que le pouvoir pathogène de *Nocardiopsis synnemataformans* isolé du crachat d'un patient greffé de rein n'ait pu être vérifié, cette espèce est considérée comme un pathogène potentiel (Hozzein et Trujillo, 2012).

# **L'activité enzymatique du genre *Nocardiopsis***

## **1. Des généralités sur les enzymes**

### **1.1 La définition d'une enzyme**

Une enzyme est une protéine qui synthétise sous forme de composé intra- et extracellulaire. Les enzymes ont la capacité d'augmenter la vitesse de réaction avec une spécificité élevée, en catalysant les réactions biochimiques. Les enzymes sont des molécules de haut poids moléculaire constituées de chaînes d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques (Ray *et Rosell*, 2017).

Les enzymes ont une classification qui se base sur le type de réaction qu'elles catalysent et le substrat sur lequel elles agissent. (Ray *et Rosell*, 2017).

### **1.2 Les enzymes d'origines microbiennes**

Les microorganismes, notamment les bactéries et comme tous les cellules vivantes sont des producteurs des enzymes, qui sont de nature hydrolysante, oxydante, réductrice ou encore métabolique, cependant la quantité d'enzymes produites diffère selon les espèces et les souches bactériennes (Ray *et Rosell*, 2017).

Les enzymes d'origines microbiennes ont plusieurs avantages que les autres enzymes qui ont une origine végétale ou animale, en raison d'un coût de production inférieure par rapport aux autres, d'une production à grande échelle, de meilleures possibilités de manipulation génétique, d'un développement rapide de culture, d'une utilisation moindre de matériel... (Ray *et Rosell*, 2017).

## **2. L'activité enzymatique des bactéries du genre *Nocardiopsis***

Les actinobactéries sont des producteurs prolifiques d'une grande variété de métabolites secondaires bioactifs agissant principalement comme antiviraux, antifongiques, anti-trypanosomiens, antileishmaniaux, antibactériens, cytotoxiques, antioxydants et anti-inflammatoires. Les métabolites secondaires pharmaceutiquement actifs dérivés des actinobactéries représentent environ 70% des composés d'origine naturelle actuellement utilisés en clinique. Le genre *Nocardiopsis* est l'un des genres le plus importants sur le plan pharmaceutique et biotechnologique qui attirent la recherche sur les produits naturels, principalement pour sa capacité à produire une grande variété de métabolites (Hatem Ibrahim *et al.*, 2018). Les bactéries de ce genre pourraient produire une grande variété des classes chimiques de composés ayant diverses activités biologiques. Les métabolites secondaires sont principalement des polycétides, des

peptides cycliques, des macrolides, des dicétopipérazines... et les dérivés de phénoxazine, qui sont responsables d'un large éventail d'effets pharmacologiques et biologiques, principalement comme antibactérien, antifongique, anticancéreux, antitumoral, cytotoxique, immunomodulateur (Hatem Ibrahim *et al.*, 2018).

L'organisme de la bactérie sécrète également une gamme de nouvelles enzymes extracellulaires qui ont été examinées récemment (Bennur *et al.*, 2015).

### **3. Les enzymes produites par les bactéries du genre *Nocardiopsis* et leurs applications**

Les enzymes sont des molécules bioactives qui jouent un rôle important dans la dégradation de la biomasse végétales et animales. Elles sont très utilisées dans l'industrie alimentaire et en biologie moléculaire (Harir, 2018).

Il existe une réelle demande au niveau industriel pour des enzymes d'origine microbienne pour améliorer certains procédés de fabrication. Les domaines d'application enzymatiques sont très divers : les industries alimentaires et textiles (en boulangerie et décoloration des jeans), la papeterie (procédé de blanchiment de la pâte à papier), la dépollution (attaque des substances phénoliques). Quelques espèces peuvent dégrader ou transformer certaines toxines produites par des champignons toxigènes (mycotoxines) et réduire leur teneur dans les produits alimentaire (Ouargli, 2018).

Les principales espèces du genre *Nocardiopsis*, productrices des enzymes, ont été isolées à partir d'une grande variété de niches écologiques. Ces espèces constituent une source potentielle d'enzymes extracellulaires diverses et nouvelles. Certaines de ces enzymes sont capables de s'adapter au froid, thermotolérantes, thermoalklotolérantes et alcalotolérantes, etc. très souvent, elles sont considérées comme destructrices des protéines et nommées extremozymes (Bennur *et al.*, 2015).

Un grand nombre d'enzymes, agissent sur différentes molécules naturelles tels que la cellulose, la chitine, les  $\beta$ -1,3-glucanes, l'inuline, l'amidon, le xylane, la kératine, et le polyhydroxybutyrate (PHB) (Bennur *et al.*, 2015 ; Saker, 2015).

### 3.1 L'amylase

#### 3.1.1 Définition

Les microorganismes élaborent un large éventail d'amylases, intracellulaires et/ou extracellulaires. Ces derniers ont été utilisés dans l'hydrolyse de l'amidon et du cellulose dans l'environnement. Aussi elles permettent à la cellule d'absorber et utiliser des produits hydrolytiques. En même temps, ces enzymes extracellulaires présentent une importance commerciale pour aider à la dégradation de l'amidon dans divers processus industriels. L' $\alpha$ -amylase est l'une des types d'amylases, responsables de l'hydrolyse de la liaison glycosurique  $\alpha$ -(1, 4) des polysaccharides (Oussadi, 2018).

Les  $\alpha$  amylases sont des enzymes ubiquitaires provenant à partir de trois sources ; animale, végétale et microbiennes. Les amylases provenant à partir des végétaux et des bactéries ont été utilisées pendant des siècles comme des additifs alimentaires. A ce jour l'amylase microbienne est très utilisée principalement pour des applications industrielles en raison de sa rentabilité et de sa cohérence, du temps et de l'espace utilisé pendant la production et la facilité d'optimisation... D'une autre part, ces enzymes ont été caractérisé par un cœur structural conservé qui est organisé en trois domaines A, B, C, la figure 8 ci-dessous montre la structure de l' $\alpha$  amylase (Oussadi, 2018).

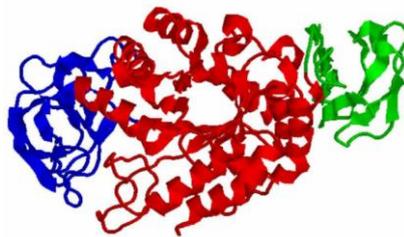


Figure 8 : la structure de l'enzyme  $\alpha$  amylase, en rouge le domaine A en bleu le domaine B en vert le domines C (Oussadi, 2018).

#### 3.1.2 Applications de l'enzyme

En biotechnologie, notamment dans la production d'hydrolysats d'amidon en sirops à haute teneur en fructose qui est très utilisé comme édulcorants dans les boissons gazeuses. Ainsi ces enzymes sont impliqués majoritairement dans l'industrie de la boulangerie. Pour éviter le rassissement du pain et d'autres produits de boulangerie et aussi pour l'amélioration du volume, la saveur, la texture et la durée de conservation.

Les amylases ont aussi un rôle essentiel dans la formulation des détergents enzymatiques. Dans le domaine pharmaceutique, les amylases sont utilisées comme des agents anti inflammatoire et comme aide digestif pour éviter les dyspepsies et la fermentation intestinales (Oussadi, 2018).

## 3.2 La protéase

### 3.2.1 Définition

Les protéases ce sont des enzymes ubiquitaires, elles peuvent être d'origine végétale (papaine et bromeline), animale (chymosine, pepsine, trypsine et chymotrypsine) ou microbienne. Ces enzymes sont des catalysent des protéines en scindant la liaison peptidique avec différents degrés de spécificités. La majorité des protéases commercialisées et produites à l'échelle industrielle sont d'origine microbienne en raison de leurs propriétés physicochimiques comme : la stabilité vis-à-vis la température, le pH et certains détergents. Généralement ces protéases (d'origine microbienne) ont moins de coproduits amères lors de l'hydrolyse des protéines alimentaires, comparées à celles d'origine animale, d'où leur utilisation dans l'industrie alimentaire. Les protéases sont classées selon plusieurs critères majeurs tout en basant sur la localisation cellulaire, la nature du site catalytique, et selon leur besoin en ATP, la figure 9 ci-dessous représente la structure d'un type d'enzyme de protéase (Habbeche, 2014).

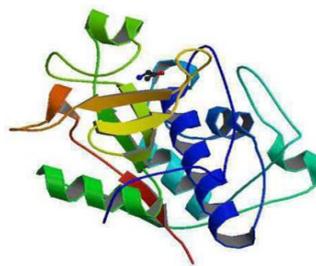


Figure 9 : la structure de l'enzyme protéase « protéase à cystéine » (Habbeche, 2014).

### 3.2.2 Applications de l'enzyme

Généralement les protéases sont largement utilisées dans les différents domaines d'industries biotechnologiques, comme la production de détergents où ils sont utilisés pour lave-vaisselle automatique à cause de leur propriétés nettoyantes croissantes et une grande stabilité face aux oxydants facilitent l'élimination des taches comme l'herbe, le

sang, l'œuf et la sueur... Ces enzymes sont très répandues dans le domaine d'industrie agroalimentaire pour la régulation de la pression sanguine, elles sont introduites aussi dans la formulation des produits alimentaires pour les nourrissons, dans des produits thérapeutiques spécifiques des régimes alimentaires et dans la fortification des jus de fruit et des boissons non alcoolisées (Habbeche, 2014).

Ainsi, certaines protéases sont utilisées aussi dans la transformation des aliments et des produits pharmaceutiques, dans la fabrication du fromage, et les réactifs dans les traitements de cuir et de déchets, traitement des caillots de sang. Cet enzyme sécrété par plusieurs bactéries actinomycétale y compris *Nocardioopsis sp*, *Saccharomonospora halophila*, *Nocardioopsis halotolerans*, et autre (Boudjelal, 2012 ; Ouargli, 2018).

### 3.3 La kératinase

#### 3.3.1 Définition

Les kératinases nommées aussi enzymes kératinolytiques représentent l'un des plus importants groupes d'enzymes protéolytiques qui ont un grand intérêt industriel et des applications dans différents secteurs, ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser les kératines efficacement que d'autres protéases (Habbeche, 2014).

Ces enzymes attaquent principalement les ponts disulfures du substrat non soluble par clivage de ces derniers, la figure 10 représente la structure en 3D de l'enzyme kératinase. Les kératinases, sont des enzymes qui dégradent facilement la kératine des plumes, de laine et des cheveux ainsi que d'autres protéines avec un haut degré de spécificité. Généralement ces enzymes sont principalement sécrétées par des champignons et par des bactéries (Habbeche, 2014).



Figure 10 : La structure en 3D de l'enzyme kératinase (Habbeche, 2014).

Les kératinases sont également sécrétées par les espèces de *Nocardiopsis*, ce qui aiderait à utiliser la matière protéique dans la nature (Bennur *et al.*, 2014). La kératinase assure la dégradation de la plume de poulet et de volaille et généralement secrété par la souche *Nocardiopsis sp.SD5*, isolé des déchets des plumes dans Tamil Nadu, Inde (Harir, 2018). Cette activité kératinase a été détectée aussi chez l'espèce *Nocardiopsis halotolerans* (Saker, 2015). Ce qui permet l'utilisation des substrats kératinolytiques et par conséquence offrir un avantage supplémentaire à ces actinomycètes car la kératine est largement présente dans l'environnement (Bennur *et al.*, 2015).

### **3.3.2 Applications de l'enzyme**

Les kératinases d'origine microbiennes ont une grande importance, en raison de la multitude de leurs applications industrielles. Actuellement, le traitement de cuir où l'enzyme est utilisé pour le tannage de cuir qui diminue les coûts et en même temps améliore la qualité du produit final qui devient plus résistant à la déchirure et présente une teinte plus uniforme. Ainsi, dans le domaine d'industrie de détergents, où ces enzymes présentent une grande capacité de lier et hydrolyser les substrats solides, qui est une propriété importante des enzymes détergentes car elles ont la capacité d'agir sur des substrats protéiques attachés à des surfaces solides, ce qui les rend attirantes pour les additifs de nettoyage. Les protéases ont un grand éventail d'utilisation dans le traitement de déchets de plume, le traitement des rejets industriels, le traitement des films photographiques (Habbeche, 2014).

## **3.4 La chitinase**

### **3.4.1 Définition**

Les chitinases sont des glycosides hydrolases, qui assurent la rupture des liaisons  $\beta$ -1,4 glycosidiques qui lient les carbones C1 et C4 de deux résidus N-acétylglucosamine consécutifs, on distingue généralement deux catégories de chitinases : les endo et les exochitinases. Les chitinases sont des enzymes trouvées chez l'ensemble des organismes vivants soient procaryotes, eucaryotes ou de type viral. 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 où bien impliquées dans des mécanismes de pathogénicité (Saguez, 2007).

### 3.4.2 Applications de l'enzyme

Les chitinases sont souvent utilisées pour l'extraction d'oligomères de chitine qui sont des produits biomédicaux importants. *Nocardiopsis prasina* est l'espèce qui produit cette enzyme, cette dernière possède des propriétés spécifiques sous termes de thermostabilité, et également d'activité dans une large gamme de pH, qui la rend adaptée aux applications industrielles. Parmi ces applications la plus ingénieuse, est la production d'oligosaccharides de chitine. Ces derniers possèdent des activités anticoagulantes, anticholestéremiques, antimicrobiennes, anticancéreuses, cicatrisantes, antitumorales et antioxydantes qui les rendent brillantes pour les applications biomédicales (Ouargli, 2018).

## 3.5 La cellulase

### 3.5.1 Définition

Les cellulases se rapportent à un groupe d'enzymes qui agit ensemble, pour l'hydrolyse de la cellulose en sucres simples. C'est un système enzymatique complexe et l'un des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases (Leghlimi, 2013). Cependant, la cellulose est le polymère organique le plus abondant sur la terre. Il est composé d'unités de D-glucose liées par une liaison glycosidique  $\beta$  (1-u), la cellulase est une enzyme hydrolytique agissant sur ce polymère (Bennur *et al.*, 2014).

Anderson *et al* en 2012 ont identifié un nombre des séquences des enzymes responsable de la dégradation de la cellulose dans les génomes de certaines actinobactéries. Parmi les onze organismes évalués, huit dont *N. dassonvillei* (IMRU509) ont produit des cellulases. L'analyse des génomes de *N. dassonvillei* a montré la présence des séquences pour six cellulase différentes. D'autre point de vue, un autre isolat *Nocardiopsis sp* (KNu) isolé à partir d'un échantillon du sol Coréen a produit une variété de glucides y compris des cellulases, l'avicel, la callobi et la paille du riz. L'organisme bactérien produit la cellulase dans des conditions de croissance de température de 37 °C et de pH 6,5. Dans ce cas la paille du riz pouvait être convertie efficacement en hydrolysats sous l'effet de cette enzyme (Bennur *et al.*, 2014). La figure 11 ci-dessous montre les changements morphologiques de la paille du riz après huit jours d'incubation avec *Nocardiopsis.sp* (KNU) (Bennur *et al.*, 2014).

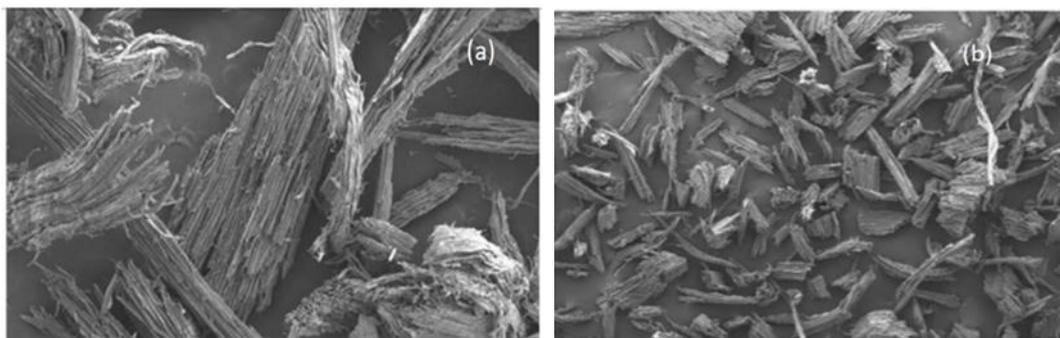


Figure 11 : observation sous microscope électronique de la morphologie de la paille du riz avant (a) et après (b) les changements structurels pendant huit jours d'incubation au *Nocardiopsis.sp* (KNU) (Ganech *et al.*, 2010).

### 3.5.2 Applications de l'enzyme

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale et ensuite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier. Actuellement, elle occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes. Les performances élevées atteintes leurs ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles, dans les industries de transformation de l'amidon, de brasserie, l'extraction du jus de fruits et légumes. L'une des applications potentielles des cellulases est la production d'éthanol-carburant à partir de la biomasse lignocellulosique (Leghlimi, 2013).

## 3.6 L'inulinase

### 3.6.1 Définition

L'inuline est une réserve de carbohydrate naturel, majoritairement observé dans les racines et les tubercules des plantes comme la chicorée, le topinambour ou l'artichaut. Ce polymère contient les chaines linéaires des molécules D-fructofuranose liées à  $\beta$  -2,1 qui se termine par des résidus de glucose. L'insulinase est l'enzyme qui hydrolyse l'inuline. L'hydrolyse de l'inuline entraine la formation des colorants et de sous-produits indésirables (Bennur *et al.*, 2014).

L'exoinulinase a été sécrétée à partir des espèces de *Nocardiopsis* isolées de sédiments marins en Chine. L'enzyme a été alcalotolérante sur une large gamme de pH 5 à 11 et thermostable à 60 °C (Bennur *et al.*, 2014).

### 3.6.2 Applications de l'enzyme

L'utilisation des inulinases est devenue populaire. Dans le domaine d'industrie sucrière, l'inulinase offre des perspectives intéressantes selon les besoins croissants de

la production de sirops purs et peut présenter une autre façon de produire les sirops dits à ultra haute teneur en fructose- glucose non pas à partir d'amidon, mais à partir d'inuline. Ainsi les inulinase ont été également utilisées dans la production de bioéthanol (Bennur *et al.*, 2014).

### 3.7 La xylanase

#### 3.7.1 Définition

Les xylanes sont des polysaccharides que la majorité contient des unités de  $\beta$ -D-xylose liés par liaison glycosidique (1  $\rightarrow$  4), la figure 12 représente la structure de xylanase de la famille 10. Ils sont ubiquitaires dans la nature (Bennur *et al.*, 2014). Cependant les xylanases sont des glycosidases qui catalysent les liaisons 1,4-D-xylosidiques dans les régions non substituées des chaînes de xylanes pour aboutir à la xylose. Ils sont secrétées par nombreux champignons (pathogènes et saprophytes), par des bactéries marines et telluriques ainsi que par les micro-organismes du rumen (protozoaires et bactéries) et les levures, on peut distinguer deux types de xylanase ; les endo et les exoxylanases (Haberra, 2014).

Les bactéries de la famille des Actinomycètes notamment les espèces du genre *Nocardiopsis* produisent la xylanase, catalysant les mal fonctions de ce biopolymère. L'espèce *N. dassonvillei* produit trois types de xylanase, ces enzymes sont nommées X-I, X-II et X-III ont été purifiés et caractérisés. Elles sont actives à pH 7 sauf l'enzyme X-III qui est active à pH 11 (Bennur *et al.*, 2014).

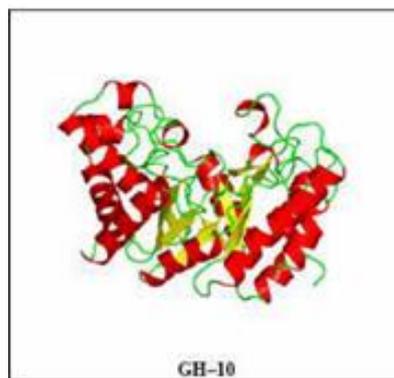


Figure 12 : la structure de xylanase de la famille 10 (Haberra, 2014).

#### 3.7.2 Applications de l'enzyme

Dans le domaine industriel cette enzyme est très utilisable particulièrement au Industrie de l'alimentation animale et ensilage pour faciliter la digestion de matières

premières riches en parois cellulaires (pailles, fourrages) qui sont partiellement digérés par les ruminants, au industrie de la panification où cette enzyme est utilisée comme un additif pour améliorer la qualité boulangère des farines. Il est connu que l'addition de xylanase a un effet antiraccissant donc elle provoque une meilleure rétention de l'eau. Ainsi à l'industrie des jus de fruits pour obtenir une meilleure clarification des jus à cause de l'hydrolyse du xylane des parois cellulaires des fruits... (Haberra, 2014).

### 3.8 La polyhydroxybutyrate (PHB) dépolymérase

Le polyhydroxybutyrate (PHB) est un thermoplastique polyester de la famille des polyhydroxyalcanoates (PHA)s. Les acides poly [3-hydroxybutyric] ou PHB sont une classe de composés de stockage de nourriture et d'énergie qui sont synthétisés dans le cytoplasme de nombreuses bactéries au cours d'une croissance déséquilibrée, la figure13 représente la structure de PHB dans le cytoplasme de la cellule. Ils ont un rôle écologique comme des alternatives aux plastiques dérivés du pétrole. Ces composés sont biodégradables dans des conditions aérobie et anaérobie, car certaines bactéries ont les capacités enzymatiques de décomposer ces polymères. Ghanem *et al* en 2005 ont isolé l'espèce *Nocardiopsis aegyptia* de sédiments marins en Egypte. Cette espèce a utilisé le 3- hydroxybutyrate (PHB) ou ses copolymères comme seule source de carbone en raison de sa capacité de produire des dépolymérase PHB extracellulaires. La propriété thermoplastique et la biodégradabilité du PHB les ont rendues très importantes au niveau industriel qui met en suite la nécessité aux micro-organismes capables de dégrader le PHB et ses copolymères dans les processus respectueux de l'environnement (Bennur *et al.*, 2014).

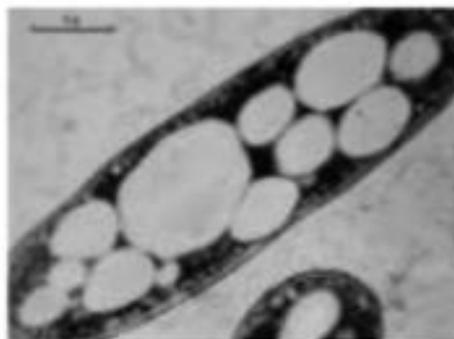


Figure 13 : la structure de PHB dans le cytoplasme de la cellule (Mathel, 2016).

### 3.9 La $\beta$ -1,3-glucanase

Le  $\beta$ -1,3-glucane est un polymère du  $\beta$ -1,3-glucose lié, c'est le principal constituant des parois cellulaires botaniques et fongiques. Les enzymes  $\beta$ -1,3-glucanase sont bien caractérisés dans les plantes, les virus, et les bactéries. Elles sont classées en exo- $\beta$ -1,3-glucanases et endo- $\beta$ -1,3-glucanases, elles peuvent aussi jouer plusieurs rôles physiologiques. Chez les bactéries, la fonction métabolique a été rapportée pour ces dernières, elles hydrolysent les liaisons internes du  $\beta$ -1,3-glycosyl, elles peuvent également hydrolyser les liaisons mixtes des  $\beta$ -1,3-1,4-glucanes comme une lichénine (un glucane complexe), mais elles préfèrent les  $\beta$ -1,3-glucanes comme une laminarine. La laminarine est une oligomère de  $\beta$ -1-3-glucane (Asselin, 1993). Ces enzymes sont sécrétées par les espèces alcalophiles *Nocardiopsis sp* (Fibriansah *et al.*, 2007).

Cette vaste gamme d'enzymes extracellulaires équipe les membres de ce genre pour dégrader les polymères végétaux, animaux et fongiques complexes et acquérir leur nutrition (Bennur *et al.*, 2014).

## 4. L'importance biotechnique

### 4.1 L'importance biotechnique des bactéries actinomycétales

Les actinomycètes constituent une proportion importante de la microflore tellurique ( $10^4$ - $10^6$  UFC/ml). Au niveau du sol, elles participent dans la synthèse et la minéralisation de la matière organique, permettant ainsi une bonne nutrition pour les plantes. Elles produisent aussi des substances biologiquement actives telles les antibiotiques (60% à 75% sont utilisés en médecine et en agriculture), les vitamines et les enzymes (chitinases, des glucanases, des peroxydases et des glutaminases, etc). Certaines espèces ont la capacité de solubiliser le phosphore. D'autres sont également impliquées dans le contrôle phytopathologique, dans la production des composés antifongiques et d'acide indole acétique (AIA) qui est une auxine, cette dernière est une phytohormone, dans la production des sidérophores et dans la dégradation de la lignine (Ameur, 2014).

Certaines espèces actinomycétales sont capables de dégrader l'acide salicylique (AS) produit par les plantes et les bactéries. Elles sont très importantes dans la biodégradation des produits plastiques et des phénols considérés comme toxiques pour l'environnement marin (Ameur, 2014).

## **4.2 L'importance biotechnique des bactéries du genre *Nocardiopsis***

### **4.2.1 La production de biosurfactants**

Les biosurfactants sont divisés en composés à faible poids moléculaire tels que les glycolipides et les lipopeptides et en composés à haut poids moléculaire tels que les polysaccharides, les protéines, les lipopolysaccharides et les lipoprotéines. Ils sont sécrétés dans les bouillons de culture où ils restent adhérents à la surface des cellules microbiennes. Ils sont utilisés comme une alternative pour les produits chimiques tensioactifs et sont très utiles dans l'agriculture, l'alimentation, l'industrie des soins de santé et les cosmétiques. Ces produits sont sécrétés naturellement par des actinomycètes halophiles principalement les espèces de *Nocardiopsis* tel que *Nocardiopsis alba* MSA, *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08, *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 (Boudjelal, 2012).

### **4.2.2 L'utilisation de *Nocardiopsis* dans la bioremédiation**

Aujourd'hui, Les hydrocarbures de pétrole sont les principaux polluants de l'environnement qu'ils représentent l'une des problèmes majeurs du monde. Cependant il existe de nouvelles méthodes biotechnologiques pour la décontamination de l'environnement contre les différents résidus de substances toxiques. Généralement la biorestauration des sols contaminés et toxiques. Elle est basée sur l'activité de la microflore endémique avec l'introduction des actinomycètes capable de décontaminer les sols d'hydrocarbures pétroliers (hexane, benzène, naphtalène, pétrole brut). Les actinomycètes introduits sont *Nocardiopsis sp.* NCIM 5124, *Streptomyces streptomycini* 295H et *Streptomyces sp.* 278H (Boudjelal, 2012).

### **4.2.3 La production d'osmorégulateurs ou de solutés compatibles**

Les ectoines sont des composés de faible poids moléculaire, capables de protéger les enzymes, les membranes et le contenu cellulaire de la bactérie contre le stress causé par l'exposition aux concentrations élevées de sel, au chauffage, à la congélation ou à la dessiccation. L'intérêt que porte les chercheurs pour ces substances et leurs différentes applications en biotechnologie est de plus en plus important. Bien que l'ectoine soit généralement considérée comme un osmoprotecteur (soluté compatible), elle a également été signalée comme ayant un rôle essentiel dans la stabilisation des protéines et favorise le repliement de polypeptides dans des conditions dénaturantes. Elle est utilisée aussi comme un hydratant en cosmétique et en soins de la peau. Cette molécule est aussi employée comme protecteur des cellules saines lors de la

chimiothérapie. Généralement elle produit par certaines espèces d'actinomycètes halophiles comme *Nocardiopsis halophila*, *Streptomyces coelicolor* et *Actinopolyspora* (Boudjelal, 2012).

#### 4.2.4 La production des antibiotiques

Des travaux antérieurs sur les *Nocardiopsis* ont montré la production d'antibiotiques actifs contre les bactéries de paroi à Gram positif et les champignons mais très peu contre les bactéries de paroi à Gram négatif. Les *Nocardiopsis* sont connus pour être des producteurs d'une grande variété d'antimétabolites : herbicides, insecticides, antifongiques, antibactériens (phénazine, iodinine, 3-tréhalosamine, thiolactomycine, etc.) et antitumoraux... (Boudjelal, 2012), la bactérie *Nocardiopsis dassonvillei* est utilisée pour la production des antibiotiques de type phénazine, ainsi des autres souches de *Nocardiopsis* qui sont isolées à partir des sédiments marins, ont présentées une activité antibactérienne et antifongique, elles sont utilisées pour la production d'un antibiotique qui est le thiopeptide (Zerizer, 2014). Les espèces de *Nocardiopsis* majoritairement produisant des antibiotiques sont *N. dassonvillei*, *N. alba*, *N. mutabilis* et *N. syringae* (Zerizer, 2014).

Les espèces du genre *Nocardiopsis* présentent aussi une activité antifongique contre *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* et *A. niger* par comparaison à l'amphotéricine-B. Elle est active aussi vis-à-vis *Candida cruzi*, *C. tropicalis* et *C. albicans* par comparaison à la streptomycine, elle présente aussi une activité antimicrobienne contre *Escherichia Coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* (Ameur, 2014).

#### 4.2.5 L'utilisation dans le domaine agronomique

La lutte biologique est la lutte menée contre les agents responsables des maladies des plantes par les micro-organismes antagonistes (Harir, 2018). Les actinobactéries font partie du groupe de micro-organismes les plus utilisés. Ces derniers ont la capacité de dégrader les composés de la paroi cellulaire (comme la chitine) des champignons phytopathogènes (Allali *et al.*, 2019).

L'espèce *Bipolaris sorokiniana* est l'une des champignons phytopathogènes, les plus problématiques pour la culture de blé dur, elle peut infecter plusieurs organes de la plante comme les tiges, les feuilles, et les racines. La souche MB22 de *Nocardiopsis*

*dassonvillei* (du Sahara Algérien) a montré la plus forte activité de lutte biologique contre cette maladie et favorise la croissance des semis de blé. Les spores de l'espèce *Nocardiopsis dassonvillei* MB22 sont utilisées aussi dans le traitement biologique des semences. Elle ont entraîné la plus forte augmentation du poids sec, de la longueur des racines et des pousses des semis (Allali *et al.*, 2019).

Cette souche était positive pour la production d'acide indole 3-acétique, des sidérophores, de cyanure dihydrogène. Ainsi, elle montre une activité chitinolytique et la solubilisation de phosphate inorganique qui est un caractère commun pour les activités de promotion de la croissance des plantes et de la lutte biologique contre les agents phytopathogènes du sol (Allali *et al.*, 2019).

**Les méthodes de  
recherches des  
nouvelles enzymes  
d'origine microbiennes**

## **1. La recherche de l'enzyme $\alpha$ amylase**

Selon une étude publiée par Wei Zhang *et al.*, en 2007, les chercheurs ont pu purifier une enzyme,  $\alpha$ -amylase adaptée au froid d'une souche du genre *Nocardiopsis*. Il s'agit d'un premier rapport sur l'isolement et la caractérisation de l' $\alpha$  amylase adaptée au froid d'une espèce du genre *Nocardiopsis*.

### **1.1 Caractéristiques de l'enzyme**

L'activité élevée des enzymes actives au froid ou adaptatives à des températures basses offre des avantages économiques potentiels (Russell, 1998 ; Gerday *et al.*, 2000 ; Cavicchioli *et al.*, 2002). Elles sont essentielles dans certains domaines d'études scientifiques fondamentales et ont la capacité de résister à certaines conditions de réaction industrielle (Deming, 1998).

La température d'activité optimale de l'enzyme est de 35 °C, et l'activité diminuait considérablement à des températures supérieures à 45 °C. L'enzyme est stable entre un pH 5 et 10 et présente une activité maximale à pH 8,0. L'activité de l'enzyme est stimulée de manière significative en présence des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , et  $\text{Co}^{2+}$ . L'activité enzymatique est inhibée en présence des  $\text{Rb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  et de l'EDTA. Les hydrolysats d'amidon soluble par l'enzyme sont principalement le glucose, le maltose et le maltotriose.

### **1.2 Choix du site et isolement de la souche bactérienne**

Les microorganismes vivant dans des environnements extrêmes, ont développé des caractéristiques particulières qui leur permettent de prospérer dans de tels environnements (Takami *et al.*, 1997). La souche bactérienne a été isolée des sédiments de la mer profonde de Prydz Bay, en Antarctique (900 m de profondeur du site PN 5-6).

Le transfert de sédiments a été effectué dans des flacons stériles associé à une conservation aseptique à 4 °C. Le sédiment a été dilué avec de l'eau de mer artificielle (ASW) contenant des sels à des concentrations bien précises (annexe). L'isolement de la bactérie a été réalisé sur le milieu glycérol/asparagine (ISP5) (annexe) contenant 0.5% d'amidon et l'incubation à 10 °C pendant cinq jours. L'isolat peut croître à 0 °C, la température optimale est de 20 °C et la maximale pour sa croissance est de 37 °C.

L'isolat a été identifié comme une souche du genre *Nocardiopsis* sur la base de la morphologie, de l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S et des caractéristiques physiologiques et biochimiques. La séquence nucléotidique du gène de l'ARNr 16S a été déposée dans l'EMBL sous le numéro d'accès AM111064. La souche a été conservée à 4 °C en gélose incliné sur le milieu ISP2 (Pridham *et al.*, 1956), supplémenté avec 1% (poids / volume) d'amidon (Wei Zhang *et al.*, 2007). La culture de la souche *Nocardiopsis sp.* 7326 a été déposée dans la Collection de cultures marines de Chine (<http://www.mccc.org.cn>).

### **1.3 Culture des cellules**

Pour la production de la biomasse, les chercheurs ont utilisé le milieu (A) composé du milieu ISP-5 supplémenté avec 1% (poids / volume) d'amidon et ASW (pH 7,5). Dans un erlenmeyer contenant 50 ml du milieu (A) stérile, ils ont inoculé 2 ml d'une suspension sporale de 3,6 à 4,0 10<sup>8</sup> UFC/ml. La culture a duré 48 h sous agitation à 180 rpm.

### **1.4 Production de l'enzyme**

Pour une production optimale de l'enzyme, Wei Zhang *et al.*, ont utilisé le milieu (B) (annexe). 50 ml de la pré-culture ont été ajoutés à 500 ml de milieu (B) et ont été incubés à 20 °C pendant 120 h. Des échantillons (5 ml) ont été prélevés dans chacun des trois flacons répliqués à des intervalles de 12 h. Le surnageant acellulaire contenant l' $\alpha$ -amylase a été récolté par centrifugation à 4000 tr/min pendant 15 minutes à 4 °C et soumis à une purification et à une caractérisation.

### **1.5 Purification de l'enzyme**

L'amylase a été purifiée à 4 °C comme suit. Le surnageant acellulaire a été soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium et la protéine précipitant à 60% de saturation a été remise en suspension dans un tampon Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) et dialysée contre le même tampon pendant 18 h. La protéine pré-purifiée a été analysée par chromatographie échangeuse d'anions sur une colonne DEAE Sepharose CL-6B (5 x 30 cm) qui avait été pré-équilibrée avec 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0) contenant 5% de glycérol. La protéine a été éluée avec 20 mM de tampon Tris-HCl (pH 8,0) contenant 10 mM de CaCl<sub>2</sub> en un gradient linéaire compris entre 0 et 0,8 M de NaCl. Les fractions actives ont été appliquées à une colonne Sephadex G-75 (1 x 45 cm) et éluées avec un

tampon Tris-HCl 20 mM (pH 8,0). Enfin, la préparation enzymatique résultante a été dessalée et concentrée par dialyse et lyophilisation.

## **2. La recherche de l'enzyme protéase**

Selon une étude publiée en 2018 par Mohammadipanah et son équipe, les chercheurs ont pu purifier une enzyme, protéase alcaline de la souche *Nocardiopsis* sp. UTMC 1492.

### **2.1 Caractéristiques de l'enzyme**

Les protéases sont l'une des plus grands groupes d'enzymes industrielle. Elles représentent environ 60% du marché mondiale des enzymes. Les protéases microbiennes constituent environ 40% de la vente mondial des enzymes. Ces protéase sont secrétée naturellement dans le milieu extracellulaire ce qui facilite considérablement le traitement de l'enzyme. Vu la grande diversité écologique des espèces du genre *Nocardiopsis*, les protéases provenant de ces bactéries ont une grande diversité dans leurs caractéristiques enzymatiques.

La protéase de la souche *Nocardiopsis* sp. UTMC 1492 a une activité enzymatique optimale à la température 60 °C. Cette activité est totalement absente à des températures inférieures à 20 °C. Elle a une activité maximale à pH 9, par contre elle est complètement absente aux pH acide et basique de 5 et 12 respectivement.

### **2.2 Choix du site et isolement de la souche bactérienne**

La souche a été isolé à partir d'un échantillon de sol de Garmsar, Iran [longitude E 52°12,512 et latitude N 35°14.823]. L'échantillon a été prélevé à une profondeur de 10 m de la rhizosphère de *Salsola* sp. (Chenopodiaceae) dont le pH est de 8. Avant la mise en culture, l'échantillon a subit un prétraitement : un séchage à l'air à température ambiante pendant sept jours, puis un broyage et enfin un tamisage à travers un tamis de 2 mm.

Pour améliorer le taux de récupération des genres rares des actinomycètes et la réduction de croissance des bactéries du genre *Streptomyces* et autres, l'échantillon du sol a subit un deuxième séchage au four à 100°C pendant 60 min puis à 120°C pendant 10 min. L'échantillon du sol prétraité a été cultivé sur gélose à la caséine d'amidon supplémenté à 5 % de NaCl et a été incubé pendant 21 jours à 28 °C. L'isolat « UTMC

1492 » a été conservé à -70°C sous forme de suspension de glycérol à 20% et sous forme lyophilisées en ampoules.

L'amplification et l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S de l'isolat ont montré que la souche UTMC 1492 appartient au genre *Nocardiopsis* sp.

### **2.3 Culture des cellules**

La souche UTMC 1492 a été cultivée dans un milieu liquide glucose-extrait de levure-extrait de malt (GYM) et incubée à 28 °C sous agitation 220 rpm pendant 4 jours.

### **2.4 Production de l'enzyme**

La production de la protéase par la souche UTMC 1492 apparaît lors de sa croissance par la formation d'une zone claire de protéolyse sur des géloses au lait écrémé (voir annexe), pour améliorer le potentiel de production de l'enzyme sur un milieu liquide ; l'isolat a été inoculé dans 5 ml de bouillon du lait écrémé et incubé à 28 °C pendant trois jours.

### **2.5 Purification de l'enzyme**

La culture en bouillon a été centrifugée à 2800 mg pendant 20 min à 4°C. Le sulfate d'ammonium a été ajouté au surnageant afin d'aboutir à la saturation, puis centrifuger une deuxième fois à 9300 mg à 4 °C pendant 20 min. L'enzyme a été récupérée en remettant en suspension le culot de protéines dans le tri HCl et la suspension enzymatique ainsi récupérée a été dialysée.

## **3. La recherche de l'enzyme inulinase**

Selon une recherche publiée par Lu *et al.*, en 2013, les chercheurs ont pu purifier une enzyme, inulinase qui est alcalotolérante et thermostable d'une souche du genre *Nocardiopsis*.

### **3.1 Caractéristiques de l'enzyme**

Une classe d'enzymes industriellement importantes, les inulinases ont reçu beaucoup d'attention dans l'hydrolyse de l'inuline qui peut être utilisé dans une variété de produits comme le sirop de fructose, les inulo-oligosaccharides et le bioéthanol. Ces derniers sont très utilisés dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et

bioénergétiques. En outre l'hydrolyse acétique de l'inuline peut entraîner la formation des molécules indésirables et des sous-produits tels que le difructose anhydrides (Lu *et al.*, 2013).

Selon Lu *et al.* (2013), le pH optimal et la température optimale de l'enzyme sont de 8.0 et 60 °C respectivement. L'inulinase a été hautement active à un intervalle de pH de 5.0 à 11.0 et l'activité est retenue à plus de 81% après une incubation à 60 °C pendant une heure, ce qui indique sa nature alcalotolérante et thermostable.

### **3.2 Choix du site d'isolement**

La souche bactérienne a été isolée à partir des sédiments marins d'une baie de Jiaozhou en Chine. Le site est considéré comme un environnement extrême. Généralement les chercheurs explorent ce type d'environnement dans le but de trouver des microorganismes producteur de variétés de composants naturels à mécanismes spécialisés dans l'adaptation à ces écosystèmes (Ameur, 2014).

Dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml du milieu MHI (voire annexe), les cellules bactériennes sont misent en culture. Après 60 heures d'incubation à 37°C sous agitation, la culture a subi une centrifugation à 4 °C pendant 20 min et le surnageant a été utilisé comme une enzyme brute.

L'isolement de la souche bactérienne responsable de la dégradation de l'inuline nécessite un milieu de sel minéral qui est le milieu « MHI », ce milieu a été utilisé généralement pour l'isolement des actinomycètes dégradant l'inuline. Pour éviter la contamination fongique, ils ont ajouté le cycloheximide au milieu.

### **3.3 La production de l'enzyme**

La production de l'inulinase nécessite une source de carbone (glucose, fructose, galactose,...), une source d'azote (extrait de levure, peptone, urée, gélatine,...), un pH du milieu de 4 à 11, la température de 25 à 45°C, une concentration en NaCl 0-15% avec un temps d'incubation de 0 à 96 heures et sous agitation de 150 à 240 tr/min.

### **3.4 La purification de l'enzyme**

Le surnageant a été utilisé comme une enzyme brute, tandis que les biomasses ont été soniquées. La quantité des protéines a été estimée en utilisant le sérum albumine

des bovins comme standard. Afin d'obtenir un volume considérable de l'enzyme brute plusieurs erlenmeyers ont été inoculés de la même façon.

Au total 1000 ml de l'enzyme brute sont concentrée dans 200 ml par une cartouche de fibres creuse d'ultrafiltration avec une masse moléculaire de 10 kDa. Un volume de 200 ml du tampon Tris-HCl (50 mM) a été additionné et concentré à 200 ml. Cette étape a été répétée trois fois. Le surnagent a été lyophilisé puis récupéré dans du tampon Tri-HCl (50 mM). Le tout est dialysé contre le même tampon pendant la nuit.

#### **4. La recherche de l'enzyme cellulase et xylanase**

Selon une étude publiée par Ganesh *et al.*, Publiée en 2011, Les chercheurs ont pu isoler des enzymes cellulolytiques qui sont thermotolérantes et alcalotolérantes, d'une souche du genre *Nocardiopsis*.

##### **4.1 Caractéristiques de l'enzyme**

Les enzymes cellulolytiques (cellulases, et xylanases) produites par l'isolat *Nocardiopsis sp* KNU ont une température optimale de 40 °C et un pH 5.0. Ces enzymes ont une haute thermotolérance comme en témoigne l'activité de rétention 55-70 % à 80 °C et pH 5.0, de l'alcalotolérance par l'activité de rétention supérieure à 55 % à pH 10 et une température de 40 °C après une heure (Ganesh *et al.*, 2011).

Les cellulases sont des enzymes à grand intérêt. Elles sont chères, et une réduction significative du coût sera importante pour leur utilisation commerciale dans la préparation d'une matière première cellulosique (Ganesh *et al.*, 2011).

##### **4.2 Choix du site et isolement**

Pour l'isolement de la bactérie productrice de l'enzyme cellulase, l'échantillon du sol a été collecté de la forêt de l'université nationale de Kangwon en Corée du Sud (Ganesh *et al.*, 2011).

Deux grammes d'échantillons du sol ont été transférés dans 400 ml du milieu Dubos frais (voir annexe), le carboxymethyl cellulose (CMC) a été utilisé comme seule source de carbone dans des bouteilles scellées de 500 ml. Les cultures ont été incubées à 30 °C pendant sept jours.

Grâce au séquençage du gène ARNr 16S, l'isolat KNU a été assigné au genre *Nocardiopsis*.

### **4.3 Culture des cellules**

Le surnageant des cultures obtenu après centrifugation lors de la récolte de la biomasse cellulaire a été utilisé comme source d'enzymes extracellulaires. Les cellules récoltées ont été remises en suspension dans 0.1 mol/l de l'acide citrique de McIlvaine, 0.2 mol/l de tempon de phosphate, les conditions de culture optimales demandent un milieu de culture Dubos avec un pH 5.0 et une incubation à 37°C (Ganesh *et al.*, 2011).

### **4.4 Production de l'enzyme**

La production des enzymes cellulolytiques (endoglucanase, exoglucanase, xylanase et glucoamylase) nécessite la présence du carboxymethyl cellulose, cellobiose, la paille du riz comme source de carbone, le xylane, les petites bandes papier filtre de Whatman, la culture est réalisée à 37 °C pendant 8 jours en condition statique, centrifugé à 4000g pendant 20 min, pour la sonication, en maintenant la sortie du sonificateur à 40 ampères et donnant 10 coups de 40 secondes avec un intervalle de temps de 2 minutes chacun à 4 °C. Le surnageant de ce mélange de sonication était utilisé comme source intracellulaire d'enzyme. Les particules ou fraction associée aux cellules obtenue sous forme de culot après centrifugation (4000 g pendant 20 minutes) était suspendu dans le tampon de McIlvaine et utilisé pour l'étude enzymatique des cellules liées. La concentration en protéines de chaque source d'enzymes a été maintenue constante (1,0 mg/ml) pour l'étude enzymatique (Ganesh *et al.*, 2011).

## **5. La recherche de l'enzyme kératinase**

Selon une étude publiée par Omran en 2017, la chercheuse a étudié une enzyme qui est une kératinase produite par un nouvel isolat du genre désigné *Nocardiopsis* sp. 28ROR.

### **5.1 Caractéristiques de l'enzyme**

Dans le but d'étudier l'activité enzymatique de cette l'enzyme, le professeur Omran (2017) a étudiée l'effet de divers paramètre comme le pH, la composition de milieu de production, la température et le temps d'incubation sur cette activité. Les expériences ont montré que la souche *Nocardiopsis* sp. 28ROR produit la kératinase après trois jours de culture pendant la phase post exponentielle et continue jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour.

La souche bactérienne a été responsable de la production de deux types d'enzymes kératinolytique acide et alcaline. Ces enzymes avaient également des activités optimales aux diverses valeurs de pH de production, ainsi que la température.

La production de protéase kératinolytique acide a été réalisée sur un milieu minéral de plume contenant 1% de farine de plumes, un pH de 6 et une température optimal entre 30 et 35°C, pendant 7 jours d'incubation. Cependant la protéase kératinolytique alcaline a été produite sur un milieu minérale de plumes où un milieu d'extrait de farines-ciment de plume (1% de farine de plumes) à pH 10 et une température de 40°C et pendant la même durée d'incubation.

## **5.2 Choix du site et isolement de la souche bactérienne**

Les échantillons ont été collectés à partir de différent site comme les sols de ferme, les sols d'une ferme avicole et les déchets de plumes de poulet.

Les échantillons ont été transférés dans des sacs en plastique dans des bacs à glace au laboratoire où, les échantillons de sol ont été broyés. 1g de poudre de chacun des sols a été mis en suspension dans 100 ml de solution physiologique, bien mélangés. 1ml des surnagent a été cultivés sur les milieux stérilisées. L'échantillon de plume a été coupée en petit morceaux de 1 à 2 cm de long, et 1g de chacun a été trempé dans 100 ml de solution physiologique, bien mélangé, et 1 ml de surnageant a été cultivés sur le milieu stérile.

Pour l'isolement bactérien le chercheur a utilisé trois milieux de culture différents : la gélose nutritive, le trypticase soja agar et le milieu extrait de malt agar qui ont été complété avec 1% de l'extraie de sol (voir annexe) à pH de 9 à 10. Les extraits de sol et les substances antifongiques ont été ajouté aux milieux en surfusion à 50°C préalablement stérilisés par autoclave à 121°C pendant 20 min. les milieux ainsi inoculés ont été incubés a trois température différentes (30, 35, 40°C) pendant 7 jours. Les colonies uniques d'actinobacteries entourés par une zone claire ont été choisis puis purifiées sur le même milieu. Les isolats bactériens purs ont été maintenus à 4 °C.

L'isolat sélectionné 28 ROR a été identifiée en fonction de ses caractéristiques microbienne physiologiques, biochimiques ainsi que moléculaire (séquençage du gène d'ARN 16s) comme appartenant au genre *Nocardiosis*.

### **5.3 Culture des cellules**

Les cellules bactériennes ont été cultivées sur une gélose de farine de plumes (1% de la farine de plumes, 1% de glucose et 0,02 mM de tampon glycine à pH final 9) puis incubées à 35 °C pendant 7 jours. L'hydrolyse des plumes a été observée visuellement par la présence d'une zone claire autour des colonies productrices.

### **5.4 Production de l'enzyme**

Les bactéries ont été cultivées dans le milieu liquide de plumes natives (voir annexe) (plume native comme seule source de carbone et d'azote). Le pH du milieu a été ajusté à 7, 9 et 11 en utilisant le carbonate de sodium.

Le professeur a utilisé des tubes de 50 ml contenant 25 ml de milieu de plumes inoculé avec 5% de la suspension cellulaire (DO 0,5 à 600 nm). Après 14 jours d'incubation à 35 °C, le milieu de plume native a été complètement transformé en un état clair.

## **6. La recherche de l'enzyme PHB dépolymérase**

Selon une étude publiée par Ghanem *et al.*, en 2005, les chercheurs ont pu isoler une nouvelle souche *Nocardiopsis aegyptia sp.* capable de produire une enzyme qui est PHB dépolymérase pour la dégradation des polyesters. Ils ont appliqué la conception expérimentale de Plackett-Burman pour l'amélioration de l'activité enzymatique.

### **6.1 Particularité de l'enzyme**

Il s'agit d'une enzyme extra cellulaire capable de dégradé du poly (3-hydroxybutyrate) (PHB), et de ses copolymères poly (3-hydroxyvalérate) P (3HB-co-10-20% HV).

### **6.2 Choix du site et l'isolement des microorganismes**

La souche a été isolé à partir de sédiments marins du littoral d'Alexandrie (Egypte) qui identifiée par la suit comme une nouvelle espèce halophile du genre *Nocardiopsis*.

### **6.3 Culture des cellules**

La souche bactérienne a été cultivée sur des géloses au nitrate d'amidon (voir annexe), dont le pH est 7. Elle se développe parfaitement sur des milieux contenant du PHB ou ses copolymères comme seules sources de carbone.

#### **6.4 Production d'enzyme**

Le milieu basal qui a été utilisé dans la production de l'enzyme est constitué de certains éléments décrits en annexe. Des aliquotes de 50 ml ont été distribuée dans des Erlenmeyer de 250 ml (inoculés avec une suspension du spores à 2%, préparée en grattant une culture sur gélose inclinée de 7 jours) et préparée avec 10 ml d'eau de mer stérile et incubée en aérobie sous agitation (120 rpm) à 30 °C pendant 3 jours. Les cellules à la phase logarithmique tardive de la croissance ont été récoltées par centrifugation à 7500 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant clair a été utilisé comme enzyme brute.

# Conclusion

## Conclusion

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants métabolites bioactifs produits par les actinomycètes. De nos jours elles ont de plus en plus d'applications, dans l'industrie des détergents, dans l'industrie agroalimentaire humaine et animale et dans le secteur de la santé. Elles sont très utilisées dans l'industrie de l'amidon pour l'amélioration de la consistance, de l'aspect et la valeur nutritive, ainsi pour améliorer les goûts et les arômes. Elles remplacent les produits chimiques de synthèse.

L'objectif principal de notre travail était d'exposer le pouvoir enzymatique des espèces du genre *Nocardiopsis*, les caractéristiques des enzymes produites par ces souches, ainsi que leurs applications dans les différents domaines.

Les bactéries du genre *Nocardiopsis*, ont montrées une capacité de production naturel d'une grande variété d'enzymes extracellulaires comme : l'amylase, la protéase, la chitinase, l'inulinase, la cellulase, la xylanase, la kératinase, le PHB dépolymérase, la  $\beta$ -1,3-glucanase.

Ces enzymes ont des rôles primordiaux dans les différent processus de biotechnologies. L'amylase trouve une grande application dans les industries de la boulangerie en donnant une douceur au pain. La protéase est très utilisée comme additifs dans les détergents à lessive. La kératinase participe principalement à la dégradation de la plume de poulet et de volaille ainsi elle participe dans le processus de recyclage et de valorisation des déchets. La chitinase est souvent utilisée pour l'extraction d'oligomères de chitine qui sont des produits biomédicaux importants. La cellulase est utilisée dans l'alimentation animale et dans les industries du textile, de la lessive et du papier. L'inulinase qui est utilisée pour la production de sirops au fructose, d'inulooligosaccharide, ainsi de bioéthanol. La xylanase très utilisée en alimentation animale et en industrie de la panification. L'enzyme polyhydroxybutyrate (PHB) dépolymérase, a un rôle écologique comme un alternatif aux plastiques dérivés du pétrole.

Cette vaste gamme d'enzymes extracellulaires équipe les membres de ce genre pour dégrader les polymères végétaux, animaux et fongiques complexes et acquérir leur nutrition.

Enfin, les espèces de ce genre jouent plusieurs rôles, non seulement dans la production des enzymes mais aussi dans la production de biosurfactants, les osmorégulateurs. Elles sont utilisées pour la décontamination de l'environnement contre les différents résidus de substances toxiques.

En perspectives, il serait nécessaire de continuer notre étude en utilisant d'autres techniques d'isolement de la souche bactérienne, ainsi que l'extraction des enzymes recherchées en utilisant des méthodes peu coûteuses, rentables et non dangereuses, car cette bactérie est très importante à cause des bienfaits qu'elle présente dans différents domaines.

# Références bibliographique

**Références**

- Abou-Elela G. M. ; El-Sersy N.A. et Wefky S.H. (2009)** Statistical optimization of cold adapted  $\alpha$ -amylase production by free and immobilized cells of *Nocardioopsis aegyptia*. Journal of Applied Sciences Research, 5(3), 286-292.
- Ajello L., Brown J., Macdonald E. et Head E. (1987).** Actinomycetoma caused by *Nocardioopsis dassonvillei*. Arch. Dermatol. 123: 426.
- Allali K. ; Goudjal Y. ; Zamoum M. ; Bouznada K. ; Sabaou N. et Zitouni A. (2019)** *Nocardioopsis dassonvillei* strain MB22 from the Algerian Sahara promotes wheat seedlings growth and potentially controls the common root rot pathogen *Bipolaris sorokiniana*. Journal of Plant Pathology, 101,1115-1125.
- Ameur H. (2014)** Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de *Streptomyces* et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride. Thèse : Microbiologie. Université Ferhat Abbas Sétif 1. P : 200.
- Asselin A. (1993)** Quelques enzymes végétales à potentiel antimicrobien, Phytoprotection, 74(1), 3-18.
- Beau F., Bollet C., Coton T., Garnotel E. and Drancourt M. (1999)** Molecular identification of a *Nocardioopsis dassonvillei* blood isolate. J. Clin. Microbiol. 37: 3366–3368.
- Bennur T. ; Kumar A.R. ; Zinjarde S. and Javdekar V. (2014)** *Nocardioopsis* species as potential sources of diverse and novel extracellular enzymes. Applied microbiology and biotechnology, 98(22), 9173-9185.
- Bennur T. ; Kumar A.R. ; Zinjarde S. ; Javdekar V. (2015)** *Nocardioopsis* species: Incidence, ecological roles and adaptations. Microbiological Research, 174, 33-47.
- Boudjelal-Bencheikh F. (2012)** Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par *Actinoalloteichus* sp. AH97. Thèse : Sciences Agronomiques. Ecole nationale Supérieure Agronomique El-Harrach Alger. P : 186.
- Bouras N. (2005)** Régulation de la production d'antibiotiques Dithiolopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* Nrrl B-24137. Thèse : Sciences des Procédés et de L'environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse. P : 283.

- Bouras N. ; Meklat A. ; Zitouni A. ; Mathieu F. ; Schumann P. ; Spröer C. ; Sabaou N. and Klenk H.P. (2015)** *Nocardiopsis algeriensis* sp. nov., an alkalitolerant actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, Springer Verlag, 107 (2), pp.313-320.
- Cavicchioli R. ; Siddiqui K.S. ; Andrews D. and Sowers K.R. (2002)** Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol* 13, 253–261.
- Deming J.W. (1998)** Deep ocean environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 9, 283–287.
- Fibriansah G. ; Masuda S. ; Koizumi N. ; Nakamura S. and Kumasaka T. (2007)** The 1.3 Å crystal structure of a novel endo- $\beta$ -1, 3-glucanase of glycoside hydrolase family 16 from alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. *PROTEINS-NEW YORK-*, 69 (3), 683.
- Ganesh D. S. and Oh S.E. (2011)** Production of thermotolerant and alkalotolerant cellulolytic enzymes by isolated *Nocardiopsis* sp. KNU. *Biodegradation*, 22:905–919.
- Gerday C. ; Aittaleb M. ; Bentahir M. ; Chessa JP. ; Claverie P. ; Collins T.D. ; Amico S. ; Dumont J. ; Garsoux G. ; Georgette. D. ; Hoyoux A. ; Lonhienne T. ; Meuwis MA. and Feller G. (2000)** Cold-adapted enzymes, from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol* 18, 103–107.
- Ghanem N.B. ; Mabrouk M.E.S. ; Sabry S.A. ; and El-Badan D.E.S. (2005)** Degradation of polyesters by a novel marine *Nocardiopsis aegyptia* sp. nov.: Application of Plackett-Burman experimental design for the improvement of PHB depolymerase activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 51, 151–158.
- Habbeche A. (2014)** Purification et caractérisation d'une keratinase thermostable KERAK-29 chez une nouvelle souche d'actinomycète. Thèse : Biochimie Appliqué. Université Badji Mokhtar Annaba. P : 167.
- Haberra S. (2014)** Production, optimisation et étude de xylanase chez une nouvelle souche d'actinomycète thermophile isolée du compost de poulet. Thèse Spécialité : Biochimie Appliqué. Université Badji Mokhtar Annaba. P : 135.
- Harir M. (2018)** Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactéries isolées des sols arides et semi arides d'Algérie. Thèse : Intérêt des

microorganismes en Agriculture et en Agroalimentaire. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. P : 221.

**Hocinat A. (2018)** Biodégradation de quelques composés organiques volatils et certains pesticides par des actinomycètes provenant d'un sol agricole et de boues activées. Thèse : Biotechnologie Microbiennes, Génomes et Environnement. Université des Frères Mentouri Constantine. P : 223.

**Hozzein W.N. et Goodfellow M. (2008)** *Nocardiopsis arabia* sp. nov., a halotolerant actinomycete isolated from a sand-dune soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2520–2524.

**Hozzein W. et Trujillo M. (2012)** Genus *Nocardiopsis*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Actinobacteria.* p: 1891-1906. Vol. 5, 2nd Ed. Springer New York.

**Ibrahim A.H. ; Desoukey S.Y. ; Fouad M.A. ; Kamel M.S. ; Gulder T.A. and Abdelmohsen U.R. (2018)** Natural product potential of the genus *Nocardiopsis*. *Marine drugs*, 16(5), 147.

**Kroppenstedt R.M. and Evtushenko L.I. (2006)** The family Nocaridiopsaceae. *The Prokaryotes : A Handbook on the Biology of Bacteria*, 3, 754-795.

**Leghlimi H. (2013)** Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de source thermale). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse : Biotechnologie Génie microbiologique-Science Technologie et Santé. Université de Constantine 1P : 159.

**Li H.W. ; Zhi X.Y. ; Yao J.C. ; Zhou Y. ; Tang S.K. ; Klenk H.P. ; Zhao J. and Li W.J. (2013)** Comparative genomic analysis of the genus *Nocardiopsis* provides new insights into its genetic mechanisms of environmental adaptability, *PLoS One*, 8(4), e61528.

**Lu W.D. ; Li A.X. and Guo Q.L. (2013)** Production of novel alkalitolerant and thermostable inulinase from marine actinomycete *Nocardiopsis* sp. DN-K15 and inulin hydrolysis by the enzyme. *Annals of Microbiology*, 64(2), 441-449.

**Mathel V. (2016)** Étude de la cristallisation du polyhydroxybutyrate. Mémoire : génie mécanique, Canada, Université De Sherbrooke, 4.

- Mohammadipanah F. Ghelishkhani F. Khajeh K. Hamed J. (2018)** Alkaline Protease from *Nocardiosis arvandica* UTMC 1942 Isolated from Saline Soil with the ability to Produce Bioactive Protein Hydrolyse. *Industrial Biotechnology*, 14(1) :54-60.
- Omran R. (2017)** Production of keratinases from *Nocardiosis* sp.28ror as a novel Iraqi strain. *Asian J Pharm Clin Res*, 10, 160-168.
- Ouargli M. (2018)** Les actinomycètes producteurs de molécules bioactives. Thèse Spécialité : Microbiologie Appliqué. Université Badji Mokhtar – Annaba. P : 189.
- Oulmi L. (2014)** Étude des infections causées par les actinomycètes aérobie autres que les mycobactéries dans la région de Constantine. Thèse : Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Constantine 1. P : 203.
- Oussadi M. (2018)** Sélection et optimisation de la production d' $\alpha$ -amylases par *Streptomyces* sp 20r par la méthodologie des surfaces de réponse. Clonage et expression de deux gènes. Thèse : Biotechnologie Microbienne, Génomes et Environnement. Université des Frères Mentouri Constantine. P : 209.
- Pridham T.G. ; Anderson P. ; Foley C. ; Lindenfesler L.A. ; Hesseltine C.W. and Benedict R.G. (1956)** A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiot Annu* 1, 947–953.
- Ray R.C. et Rosell C.M. (2017)** *Microbial Enzymes Technology In Applications : Enzymes*, Boca Raton London New York : toylor – francis group, 4-6.
- Russell N.J. (1998)** Molecular adaptations in psychrophilic bacteria, potential for biotechnological applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 61, 1–21.
- Saguez J. (2007)** Dérégulation des activités chitinases : vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides. Thèse : Sciences et Santé, France, Université de Picardie Jules Verne, 11.
- Saker R. (2015)** Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. Thèse : Microbiologie. Université Ferhat Abbas Sétif 1. P : 244.
- Saratale G.D. and Oh S.E. (2011)** Production of thermotolerant and alkalotolerant cellulolytic enzymes by isolated *Nocardiosis* sp. KNU. *Biodegradation*, 22(5), 905-919.

**Sindhuphak W., Macdonald E. et Head E. (1985)** Actinomycetoma caused by *Nocardiosis dassonvillei*. Arch. Dermatol. 121: 1332–1334.

**Takami H. ; Inoue A. ; Fuji F. and Horikoshi K. (1997)** Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. FEMS Microbiol Lett 152, 279–285. Dans Site d'internet :

(<http://www.mccc.org.cn>)

**Zerizer H. (2014)** Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine. Thèse : Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Constantine 1. P : 217.

**Zhang J. W. and Zeng R. Y. (2007)** Purification and Characterization of a Cold-Adapted  $\alpha$ -Amylase Produced by *Nocardiosis* sp. 7326 Isolated from Prydz Bay, Antarctic. Marine Biotechnology, 10, 75–82.

**Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005)**. *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. Res. Microbiol.156: 984–993.

# **Annexe**

**L'eau de mer artificielle (ASW) (poids / volume)**

NaCl	0,3%
KCl	0,07%
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,53%
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1,08%
CaSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,1%

**Le milieu (B) pour la production de l' $\alpha$  amylase (poids / volume)**

Amidon	2,5%
Glucose	1%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05%
ASW	pH 8,0

**Le milieu MHI en g/l**

L'inuline	20
NaCl	39,45
KNO <sub>3</sub>	0,1
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10,45
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	6,9
KCl	2,1
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05
NaHCO <sub>3</sub>	0,02
NaBr	0,05
Solution d'oligo-éléments (2 ml).	

**Le Milieu Dubos en g/l**

CMC	10
NaNO <sub>3</sub>	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,001

**Le milieu liquide de plumes natif en g/l**

NaCl	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7

$K_2HPO_4$	1,4
$MgSO_4$	0,1
La plume native	100

**Le milieu de géloses au lait écrémé en g/l**

Bouillon nutritif	8
Lait écrémé en poudre	20
Gélose	12

**Extraie de sol**

Le sol de ferme	500g
Eau du robinet	1000 ml

**Le milieu de production de PHB dépolymérase en g/l**

PHB	1
$C_6H_{11}O_7Na$	5
$KH_2PO_4$	0,7
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,7
$NH_4NO_3$	1
$K_2HPO_4$	0,7
Extrait de malt	1

**Le milieu géloses au nitrate d'amidon en g/l (d'eau de mer)**

Amidon	20
$NaNO_3$	1
$K_2HPO_4$	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
Agar	20

Intitulé

Le rôle des bactéries du genre *Nocardopsis* dans la production des enzymes.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Écologie Microbienne.

Résumé

*Nocardopsis* est un genre bactérien appartenant au phylum des actinobactéries. Décrit par Meyer en 1976, il est le genre type de la famille Nocardiospiceae. Les membres de ce genre sont aérobies, catalase positive, à coloration de Gram positive et non acido-alcolo-résistants. Ubiquitaire, ils sont omniprésents dans plusieurs environnements terrestres et aquatiques avec des espèces pouvant s'adapter aux milieux les plus extrêmes. Les bactéries de ce genre sélectionnent une importance biotechnologique à cause de leur grande variété de métabolites bioactifs principalement les antibiotiques et les enzymes. Ces derniers agissent sur différentes molécules naturelles tels que la cellulose, l'amidon, le xylane, la kératine...

Les enzymes d'origine microbiennes sont utilisées dans de nombreuses applications très diverses, industries agroalimentaire, textiles, papeterie, pharmaceutique, chimie fine, cosmétique, et même dans la valorisation des déchets et le recyclage par bioconversion des ressources renouvelables. Reconnus comme technologie écologique, elle est très rentable et sans danger

**Mots clés :** *Nocardopsis*, actinobactéries, enzyme, molécules bioactif

**Laboratoire de recherche :** .....

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** *KITOUNI Mahmoud* (PROF- UFM Constantine),

**Rapporteur :** *OULMI Lamia* (MCB - UFM Constantine),

**Examineur :** *ZERMAN Ferial* (MAA - UFM Constantine).

**Date de soutenance :** .....