

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



UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

N° d'ordre : 47/D₃C/2017
N° de série : 05/BIOCH/2017

Thèse

Présentée pour l'obtention

Du Diplôme de Doctorat de 3^{ème} cycle LMD

En Biotechnologies et Biochimie

Par

GASMI Meriem

Thème :

**Isolement, identification et criblage d'actinomycètes à activité
chitinolytique à partir du sol de la région de Laghouat.**

**Optimisation de la production de chitinase par *Streptomyces
griseorubens* C9 par la méthode des surfaces de réponse**

Soutenue le 29 Juin 2017

Membres du jury :

Président :	Mme. MERAIHI Zahia	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Directeur de thèse :	Mr. Kitouni Mahmoud	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur :	Mr. Kecha Mouloud	Professeur	U. Aberrahmane Mira- Bejaia
Examineur :	Mr. Boudemagh Allaoueddine	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur :	Mr. Hamidechi M ^{ed} Abdelhafid	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine

Année universitaire: 2016 - 2017

DEDICACES

A la mémoire de mon Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Rien au monde ne vaut ton dévouement et tes efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Que dieu tout puissant t'accueille dans son vaste paradis

A ma chère mère

Aucune dédicace n'est assez éloquente pour exprimer ma gratitude pour tes sacrifices et tes encouragements à mon égard tout au long de mon parcours.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon frère Hakim, ma sœur Hannen et son mari Dssam. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Ames rayons de soleil, mon petit neveu Mouhib et mes petites nièces Nour et Darine

A toute ma famille et mes amis.

REMERCIEMENTS

Je tiens à témoigner ma sincère gratitude à mon directeur de thèse, Pr. Kitouni Mahmoud, pour sa disponibilité et pour m'avoir soutenu et supporté ces quelques années. Qu'il trouve ici ma reconnaissance la plus profonde et le témoignage de mon plus profond respect.

Mes sincères remerciements sont adressés au Pr. Meraihi Zahia de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je tiens également à remercier Les Pr. Kecha Mouloud ; Boudemagh Allaoudine et Hamidechi Med Abdelhafid d'avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci au Pr. Boulahrouf Abdelrahmane pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à Monsieur Philippe Normand, Directeur de recherche CNRS à l'université Lyon 1, d'avoir accepté de m'accueillir à plusieurs reprises au sein de son laboratoire et de son équipe. Ce séjour à Lyon a été pour moi l'occasion de découvrir un autre laboratoire, d'acquérir de nouvelles techniques, de croiser et discuter avec beaucoup de personnes.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe 1 du laboratoire d'écologie microbienne UMR5557, particulièrement Petar, Lorena, Hugo, Pascal et Nicole.

Mes remerciements les plus profonds et sincères s'adressent à Mme. Boubakri Hasna pour la confiance qu'elle m'a accordé, son soutien et son aide précieuse.

Par crainte d'oublier de nommer certaines personnes, j'adresse mes remerciements à celles et ceux qui m'ont accompagné de près ou de loin jusqu'à aujourd'hui. J'ai une pensée pour celles et ceux qui m'ont donné le goût de la Biologie et surtout pour les personnes qui m'ont accompagné durant toutes ces années de thèse et qui m'ont permis de mener à bien ce travail en me faisant vivre des moments inoubliables.

Je pense bien sûr à mes collègues et amis(es) du Laboratoire pour les bons moments passés ensemble mais aussi à mes amis (es) de parcours.

Je terminerai en adressant un très grand merci à ma famille pour son soutien sans faille et de tous les instants.

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

Publication scientifique

Gasmi, M. and Kitouni, M. (2017) Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. *Ann. Microbiol.*, **67**, 175–183.

Article en préparation

Meriem Gasmi, Mahmoud Kitouni, Lorena Carro, Petar Pujic, Philippe Normand, Hasna Boubakri: *Chitinolytic actinobacteria isolated from semi-arid Algerian soil and their biocontrol potential.*

Conférences

GASMI Meriem, KITOUNI Mahmoud, BOUBAKRI Hasna, CARRO GARCÍA Lorena, NORMAND Philippe : **Activités chitinolytique et antifongique des actinobactéries isolées d'écosystèmes extrêmes.** VIème Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne, 21- 25 Octobre 2013, Clermont-Ferrand (Puy-de-Dôme, France).

GASMI Meriem, KITOUNI Mahmoud, BOUBAKRI Hasna, CARRO Lorena, NORMAND Philippe : **Chitinase et potentiel antifongique des bactéries actinomycétales isolées d'écosystèmes extrêmes d'Algérie.** Les Journées Internationales de Biotechnologie, 21-24 Décembre 2013, Hammamet (Tunisie).

GASMI Meriem, KITOUNI Mahmoud, BOUBAKRI Hasna, CARRO Lorena, NORMAND Philippe: **In vitro antagonistic potential of actinomycetes isolated from Algerian arid soil against plants and human pathogens.** 25ème Congrès de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB), 24-27 Mars 2014, Hammamet (Tunisie).

GASMI Meriem, KITOUNI Mahmoud: **Enzymatic Screening, Antibacterial Potential and Molecular identification of actinomycetes Isolated from Laghouat region, Algeria.** The 1st International Conference Microbial Ecology: An important Challenge for future, 12-14 Décembre 2015, Sétif (Algérie).

Résumé

La chitine est un homo-polysaccharide composé d'unités *N*-acétyl- β -D-glucosamine liées entre elles par des liaisons glycosidiques. Sa dégradation est catalysée par des enzymes appelés chitinases. Ces derniers ont fait l'objet d'une attention croissante ces dernières années pour leur intérêt biotechnologique (agents antibactériens, antifongiques, hypocholestérolémiants, antihypertenseurs). Les chitinases sont synthétisées par les champignons, les plantes ou encore les bactéries. Parmi ces dernières, les bactéries telluriques du genre *Streptomyces* ont développé des systèmes extracellulaires complexes pour utiliser ainsi la chitine comme source nutritionnelle. Dans cette thèse, nous avons choisi d'étudier dans un premier temps, les actinobactéries isolées des sols arides du désert algérien afin d'identifier des souches ayant un fort potentiel au niveau de leurs activités chitinolytiques et antifongiques. À partir d'un échantillon de ce sol, nous avons isolé 40 actinobactéries phénotypiquement différentes. Premièrement, nous avons mené une étude fonctionnelle en criblant ces isolats sur un milieu minimum complété en chitine colloïdale (MCC) pour caractériser leurs activités chitinolytiques dans des conditions extrêmes de températures (30, 35, 40, 45 et 50 °C) et de pH (5, 7 et 9). Par ailleurs, une étude taxonomique a été menée en combinant une approche par BOX-PCR et par séquençage de l'ARNr 16S de 20 souches. Cette identification a montré que 10 de ces isolats appartenaient au genre *Streptomyces*, deux au genre *Micromonospora* et 08 potentielles nouvelles espèces bactériennes. Aussi la recherche d'une activité antimicrobienne contre 06 bactéries-test et deux champignons phytopathogènes a été réalisée, en utilisant une nouvelle approche d'induction/répression de la chitinase par le glucose dans le test antifongique afin de prouver que les chitinases sont bel et bien responsables de l'inhibition des champignons phytopathogènes. Ce qui a permis de trouver que la souche C31 pouvait réduire la croissance fongique seulement après induction de la chitinase par la chitine colloïdale. Le second volet de ce travail a visé à mettre en place un milieu de culture afin d'optimiser la production de la chitinase par la souche *S. griseorubens* C9, en utilisant les plans d'expérience et les méthodes des surfaces de réponse. Un premier plan statistique de Plackett-Burman nous a permis d'identifier quatre facteurs qui ont un effet significatif sur la production de l'enzyme par *S. griseorubens* C9. Ces derniers ont fait l'objet d'une optimisation par le plan d'expérience de Box-Wilson basé sur les composites centrés. Cette étude nous a permis de prédire ce milieu de culture : 2% de chitine colloïdale ; 0,47% de mélasse de datte ; 0,25 g / l d'extrait de levure et 1,81 g / l de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pour une production maximale de l'enzyme égale à 0,902 U/ml. Ce qui a été confirmé par des cultures en erlenmeyers où la production de la chitinase par *S. griseorubens* C9 a atteint 1,53 U/ml. De ce fait, Le rendement de la production de l'enzyme a été augmenté de 26,38% après optimisation par la méthode des surfaces de réponse. Enfin, nous nous sommes penchés sur la purification et la caractérisation partielle de l'enzyme produite dans le milieu optimisé. L'enzyme a subi 3 étapes majeurs de purification où elle a atteint un seuil de purification de 23,24 ; un rendement de 29,7 % et une activité spécifique égale à 2,393 U/mg. L'activité de la chitinase purifiée était maximale à 50 °C et à pH 5,0. L'enzyme a conservé plus de 60% de son activité à un pH compris entre 4,0 et 7,0 et elle est restée stable à des températures comprises entre 30 °C et 60 °C. Les performances des enzymes chitinolytiques de la souche *S. griseorubens* C9 la qualifient de souche d'utilité dans les domaines industriels, de biotechnologies et bio-control.

Mots clés: Actinomycètes; BOX-PCR; ARNr 16S; chitinases; *Streptomyces griseorubens* C9; Plackett-Burman; Box-Wilson; purification.

Abstract

With at least 10 gigatons synthesized and degraded each year in the biosphere, chitin is the second most represented polysaccharide in nature after cellulose. It is a crystalline polysaccharide consisting of long linear chains containing more than 1000 units of N-acetyl- β -D-glucosamine linked by β -1,4 glycoside bonds. Chitin degradation is performed by chitinases (E.C. 3.2.1.14), that hydrolyze β -1,4 bonds releasing compounds easily metabolized by many microbes. Production of microbial chitinases receives worldwide attention in both industrial and scientific communities, because of its wide applications spectrum. Chitinases are used in biochemistry, food processing, and various chemical industries due their antimicrobial, anticholesterol, and antitumor activities. They are also used in waste-water treatment, dietary fiber and in agriculture to inhibit plant pathogens. The physiological function of chitinases depends on their origin. In bacteria, chitinases play a trophic role by degrading chitin, as source of both carbon and nitrogen. Microorganisms particularly *Streptomyces* are efficient chitin hydrolysers. Chitinases have been identified in several *Streptomyces* spp. It is induced by chitin and repressed by readily utilizable carbon sources such as N-acetyl-glucosamine and glucose. In this thesis, we chose to study actinobacteria isolated from a semi-arid soil of the Algerian desert in order to identify strains with a high chitinolytic and antifungal potential. We isolated 40 phenotypically different actinobacteria. First, we carried out a functional study by screening these isolates on a minimal medium supplemented with colloidal chitin (CCM) to characterize their chitinolytic activities under extreme temperature conditions (30, 35, 40, 45 and 50 °C) and pH (5, 7 and 9). In addition, a taxonomic study was conducted by combining a BOX-PCR approach and sequencing 16S rRNA of 20 strains. This identification showed that 10 of these isolates belonged to the genus of *Streptomyces*, two to the genus of *Micromonospora* and 08 potential new bacterial species. Also, the search for antimicrobial activity against 06 test bacteria and two phytopathogenic fungi was carried out, using a novel glucose-inducing / repressing chitinase approach in the antifungal test, to prove that only chitinases can inhibit these phytopathogenic fungi. One strain (C31) was able to reduce fungal growth only after induction of chitinase by colloidal chitin. The second part of this work aimed to use statistical Plackett–Burman and Box–Wilson response surface methodology to optimize the medium components and, thus, improve chitinase production by *Streptomyces griseorubens* C9. First, syrup of date, colloidal chitin, yeast extract and K_2HPO_4 , KH_2PO_4 were proved to have significant effects on chitinase activity using the Plackett–Burman design. Then, an optimal medium was obtained by a Box–Wilson factorial design of response surface methodology in liquid culture. Maximum chitinase production (0.902 U / ml) was predicted in medium containing 2% colloidal chitin, 0.47% syrup of date, 0.25 g/l yeast extract and 1.81 g/l K_2HPO_4 , KH_2PO_4 . This was confirmed by Erlenmeyer cultures where the Production of chitinase by *S. griseorubens* C9 reached 1.53 U/ml, the yield of enzyme production was increased 26.38% after optimization by the response surface methodology. Finally, purification and partial characterization of the enzyme produced in the optimized medium was performed. 3 major purification steps were done and the enzyme reached a purification fold of 23.24; a yield of 29.7% and a specific activity equal to 2.393 U/mg. The purified chitinase activity had optimum catalytic activity at pH 5.0 and 50 °C. It retained more than 60% stability at pH range between 4.0 and 7.0 and remained stable at temperatures between 30 °C and 60 °C. Thus, *S. griseorubens* C9 could be a potent strain for industrial chitinase production, as well as in biotechnology and bio-control fields.

Key words: Actinomycetes; BOX-PCR; 16S rRNA; Chitinases; *Streptomyces griseorubens* C9; Plackett-Burman; Box-Wilson; Purification.

الملخص

الكيتين هي سكاريد يتألف من وحدات-N أسيتيل β -D جلوكوز امين مرتبطة معا عن طريق روابط غليكوزيدية وهي المكون الرئيسي لأصداف المحار و جدار خلايا الفطريات . يتم تحليل الكيتين بواسطة انزيم الـ chitinases الذي تلقي اهتماما متزايدا في السنوات الأخيرة وذلك لاستعمالاته في التكنولوجيا الحيوية (كمضاد للجراثيم، مضاد للفطريات، مخفض للكوليسترول، وخافض للضغط الدموي). يتم إفراز هذه الانزيمات من طرف الفطريات، النباتات و البكتيريا. من بين هذه الأخيرة طورت بكتيريا التربة من نوع *Streptomyces* أنظمة معقدة خارج الخلية لاستخدام الكيتين كمصدر غذائي. في هذه الأطروحة، اخترنا دراسة بكتريا أكتينوميستات المعزولة من التربة شبه القاحلة من الصحراء الجزائرية كمرحلة أولى، لتحديد السلالات ذات القدرة العالية علي تحليل الكيتين وإنتاج مضادات للفطريات. انطلاقا من عينة من هذه التربة، قمنا بعزل 40 أكتينوميستات مختلفة المظهر. لقد قمنا في البداية بدراسة قدرة هذه العزلات على إنتاج الـ chitinases في وسط بسيط مكمل بالكيتين الغروية وذلك في ظروف قاسية لدرجات الحرارة (30 ، 35 ، 40 ، 45 ، 50 درجة مئوية) ودرجات الحموضة (5، 7، 9). بالإضافة إلى ذلك، أجريت دراسة تصنيفية من خلال الجمع بين الـ BOX-PCR وتسلسل الحمض النووي الريبي الـ 16S لـ 20 سلالة. وأظهرت النتائج أن 10 من هذه العزلات تنتمي إلى جنس *Streptomyces*، إثنان لجنس *Micromonospora* و 08 عزلات من الممكن أن تكون أنواع بكتيرية جديدة. بالإضافة إلى هذا تم البحث عن نشاط مضادات الميكروبات ضد 6 سلالات بكتيرية مختلفة وسلالتين من الفطريات المسببة للأمراض النباتية، وذلك باستخدام طريقة جديدة تحفيز/ تثبيط الكيتيناز بالجلوكوز في اختبار مضاد الفطريات. ذلك لإثبات أن إنزيم الكيتيناز هو المسؤول بحق عن تثبيط الفطريات المسببة للأمراض النباتية. مما سمح العثور على سلالة (C31) التي لا تثبط نمو الفطريات إلا بعد تحفيز إنتاج الكيتيناز بالكيتين الغروية. الجزء الثاني من هذا العمل يهدف إلى تشكيل بيئة مغذية من أجل تحسين إنتاج الكيتيناز من قبل السلالة *Streptomyces griseorubens* C9، وذلك باستخدام تصاميم تجريبية حيث سمح لنا مخطط Plackett-Burman باختيار أربعة عوامل ذات التأثير الأكبر على إنتاج الإنزيم من قبل *Streptomyces griseorubens* C9. هذه الأخيرة تم البحث على قيمها المثلى بواسطة مخطط تجريبي ثاني (Box-Wilson). سمحت لنا هذه الدراسة أن نتوقع هذه البيئة المغذية : 2% كيتين غروية. 0.47% من عسل التمر؛ 0.25 غرام/لتر من خلاصة الخميرة و 1.81 غ/لتر من K_2HPO_4 ، KH_2PO_4 ، لإنتاج أقصى كمية من الإنزيم بقيمة 0.902 و/مل. وهو ما أكدته عملية الإنتاج في القارورة الزجاجية التي قدرة بـ 1.53 و/مل حيث تم رفع المردود من إنتاج الإنزيم بـ 26.38%. في النهاية، ركزنا على تطهير وتحديد جزئي لخصائص الأنزيم المنتج على البيئة المغذية الأمثل. شهد الإنزيم ثلاثة مراحل رئيسية لتثقيته حيث وصلنا إلى مردود 29.7%، ونشاط خاص يقدر بـ 2393 و/ملغ. نشاط الكيتيناز النقي كان أقصاه عند 50 درجة مئوية، ودرجة الحموضة 5.0. احتفظ بأكثر من 60% من نشاطه بين درجتَي الحموضة 4.0 و 7.0 و كان مستقر عند درجات حرارة تتراوح بين 30 و 60 درجة مئوية. مميزات الانزيمات المحللة للكيتين المفرزة من قبل سلالة *Streptomyces griseorubens* C9 يأهلها بأن تكون سلالة مفيدة في ميادين صناعات التكنولوجيا الحيوية والمكافحة الحيوية.

الكلمات المفتاح : الأكتنوميستات، Box-PCR، ARN 16S، الكيتيناز، المكافحة الحيوية، Box-Wilson، Plackett-

Burman، *Streptomyces griseorubens* C9.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure d'une chaîne linéaire de chitine..	5
Figure 2: biosynthèse de la chitine chez les insectes. (Merzendorfer and Zimoch, 2003).....	9
Figure 3: Processus impliqués dans la dégradation de la chitine.	11
Figure 4 : représentation schématique de la structure de la chitine et des multiples enzymes impliquées dans sa modification/dégradation. (Neeraja <i>et al.</i> , 2010).	12
Figure 5 : Représentation des 5 classes de chitinases (modifié d'après Singh <i>et al.</i> , 2007, Graham and Sticklen, 1994; Kolosova <i>et al.</i> , 2014).....	15
Figure 6 : Structure tridimensionnelle des chitinases de la famille 18 (exemple d'une chitinase de classe III) (modifié d'après Neuhaus, 1999).	16
Figure 7 : Signature spécifique de type DXDXE de la famille 18 des glycosides hydrolases. Résidu aspartate (D) et résidu glutamate (E) nécessaires au mécanisme catalytique.....	16
Figure 8 : Structure tridimensionnelle des chitinases de la famille 19 des glycosides hydrolases (exemple d'une chitinase de classe II) (modifié d'après Neuhaus, 1999).....	17
Figure 9 : Signature spécifique de la famille 19 des glycosides hydrolases (Robertus and Monzingo, 1999).	17
Figure 10 : Structure de l'allosamidine (Sakuda <i>et al.</i> , 1987).....	23
Figure 11 : Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide (Breton <i>et al.</i> , 1989).....	25
Figure 12 : Classification du phylum des Actinobactéria basée sur des données de séquençage de l'ARNr 16S (Zhi <i>et al.</i> , 2009).....	31
Figure 13 : préparation de la chitine colloïdale.....	41
Figure 14 : Programme d'amplification par BOX-PCR.....	46
Figure 15 : Programme d'amplification par PCR de l'ADNr 16S.....	47
Figure 16 : (A) Isolement d'actinobactéries sur milieu MCC. (B) Aspect macroscopique des isolats (C13, C28, C33, C37) cultivés sur le milieu ISP-2.....	61
Figure 17 : Dendrogramme déterminé par analyse BOX-PCR montrant la parenté génétique des 40 isolats analysés	64
Figure 18 : Arbre phylogénétique selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences d'ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega version 6.0 montrant la position phylogénétique de 20 souches.....	67

Figure 19 : dégradation de la chitine colloïdale par les souches actinomycétales isolées.	70
Figure 20 : Activité chitinolytique mesurée à différents pH après 7 jours de croissance. # Différence significative observée entre les deux conditions (tests de Wilcoxon, valeur p <0,05). • souches capables de croître à pH5 mais sans activité chitinolytique.....	72
Figure 21 : Activité chitinolytique mesurée à différentes températures après 7 jours d'incubation et trié selon l'activité des souches à 45 °C. Les souches C27, C39 et C40 ne poussent pas à 45 °C et les souches de C1 à <i>S. coelicolor</i> sont capables de croître, mais n'ont pas d'activité chitinase à 45 ° C. # Différence significative observée à 30 °C (tests de Wilcoxon, p <0,05).	73
Figure 22 : (A) Activité chitinolytique mesurée (30 °C, pH = 7, 5 jours de croissance) sur le milieu MCC et MCCG. (B) pourcentage d'inhibition de l'activité de chitinase due à la répression catabolique par le glucose.	75
Figure 23 : Test d'activité antibactérienne de quelques souches... Erreur ! Signet non défini.	
Figure 24 : Tracé des surfaces de réponse de l'activité chitinolytique de <i>S. griseorubens</i> C9.	92
Figure 25 : Cinétique de croissance et de production de la chitinase par <i>S. griseorubens</i> C9.	93
Figure 26 : Profil chromatographique de la chitinase de <i>S. griseorubens</i> C9 purifiée sur colonne échangeuse d'ion (DEAE- Sephadex).....	96
Figure 27 : Effet du pH sur l'activité de la chitinase purifiée et stabilité de l'activité à différents pH.....	97
Figure 28 : Effet de la température sur l'activité de la chitinase purifiée et stabilité de la température à différentes températures.	98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Arrangement des chaînes dans les trois formes de chitine.....	6
Tableau 2 : Pourcentages des teneurs en chitine par espèces (Mathur and Narang, 1990; Shahidi, 2005).....	7
Tableau 3 : Propriétés de la chitine et du chitosane et leurs principales applications.	8
Tableau 4 : Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (d'après Goodfellow et Williams, 1983).	32
Tableau 5 : Chitinases produites par différentes espèces d'actinomycètes.	39
Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel.....	45
Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel.....	45
Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés pour l'amplification des différents gènes.	46
Tableau 9 : Conditions de séparation des produits amplifiés par électrophorèse.	47
Tableau 10 : Générateur des matrices pour N= 11, 15, 19 et 23 essais de Plackett et Burman.	50
Tableau 11 : La matrice de Plackett-Burman pour l'étude de 19 variables avec 20 expériences.	51
Tableau 12 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett-Burman pour 15 facteurs.	53
Tableau 13 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré.	53
Tableau 14 : Traitement de la matrice du plan composite centré.	54
Tableau 15 : Matrice du plan composite centré de <i>Box et Wilson</i> à quatre facteurs.	55
Tableau 16 : Caractéristiques physico-chimiques du sol.	60
Tableau 17 : Dénombrement des actinobactéries isolées à partir de l'échantillon de sol.....	61
Tableau 18 : Identification taxonomique des isolats.....	65
Tableau 19 : Antagonisme des actinobactéries isolées contre les deux champignons phytopathogènes et sur deux milieux de culture différents MCC et MCCG....	76
Tableau 20 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu ISP-2 et MCC.	80
Tableau 21 : Pourcentage des souches d'actinomycètes actives cultivées sur les milieux ISP-2 et MCC.....	80

Tableau 22 : Analyse statistique des résultats du plan Plackett-Burman pour la production des chitinases par la souche C9.....	83
Tableau 23 : Matrice du plan composite centré de Box et Wilson à quatre facteurs (valeurs codées), avec l'activité chitinolytique de la souche C9 comme réponse.....	87
Tableau 24 : Effets estimés des variables et coefficient de régression de la production de la chitinase par la souche C9.	88
Tableau 25 : Analyse de la variance pour l'activité chitinolytique du plan de composite centré.....	89
Tableau 26 : Effets estimés des variables et coefficients de régression de la production de la chitinase du modèle réduit.	90
Tableau 27 : Analyse de la variance (ANOVA) pour l'activité chitinolytique du modèle réduit.....	90
Tableau 28 : Coordonnées codées des extremums des facteurs étudiés et leurs valeurs réelles.	91
Tableau 29 : Purification de la chitinase produites par <i>Streptomyces griseorubens</i> C9.....	94

Table des matières

Résumé

Abstract

المخلص

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La chitine	4
1.1. Structure	4
1.2. Sources	6
1.3. Applications	7
1.4. Synthèse et rôle	8
1.5. Dégradation de la chitine	9
1.5.1. <i>Dégradation chimique</i>	9
1.5.2. <i>Dégradation enzymatique</i>	10
2. Classification des chitinases	13
2.1. Selon le mode d'action.....	13
2.2. Selon la structure.....	13
2.2.1. <i>Les chitinases de la famille 18</i>	15
2.2.2. <i>Les chitinases de la famille 19</i>	16
2.2.3. <i>Les chitinases de la famille 23</i>	17
2.2.4. <i>Les chitinases de la famille 48</i>	17
3. Rôle des chitinases	18
3.1. Chitinases et microorganismes.....	18
3.2. Chitinases fongiques	19
3.3. Chitinases végétales	19
3.4. Chitinases animales.....	20
3.5. Insectes et chitinases	21
4. Propriétés physico-chimiques de quelques chitinases de microorganismes.	21
5. Multiplicité dans le système chitinolytique	23
6. Les actinobactéries productrices de chitinases.....	24

6.1.	Généralités.....	24
6.2.	Classification des actinomycètes.....	26
6.2.1.	<i>Généralités</i>	26
6.2.2.	<i>Critères d'identification des actinobactéries</i>	26
6.2.3.	<i>L'Ordre des Actinomycétales</i>	30
6.3.	Distribution et Rôle écologique des actinobactéries.....	31
6.3.1.	<i>Les actinomycètes du sol</i>	33
6.4.	Spécificité métaboliques, applications industrielles et biotechnologiques.....	34

MATERIEL ET METHODES

1.	Isolement et purification des actinobactéries.....	40
1.1.	Échantillonnage.....	40
1.2.	Traitement de l'échantillon.....	40
1.3.	Isolement et mise en culture.....	40
1.4.	Purification et conservation des souches actinomycétales.....	40
2.	Mise en évidence des actinobactéries productrices de chitinases.....	41
2.1.	Préparation de la chitine colloïdale.....	41
2.2.	Préparation de l'inoculum.....	41
2.3.	Mesure de l'activité chitinolytique dans différentes conditions.....	42
2.4.	Répression catabolique de l'activité chitinolytique.....	42
3.	Recherche de l'activité antimicrobienne.....	42
3.1.	Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	42
3.1.1.	<i>Technique des cylindres d'agar</i>	43
3.2.	Recherche de l'activité antifongique.....	43
4.	Identification moléculaire des actinobactéries chitinolytiques.....	44
4.1.	BOX-PCR (BOX-Polymerase Chain Reaction).....	44
4.1.1.	<i>Extraction et purification de l'ADN</i>	44
4.1.2.	<i>Amplification et conditions de la Box-PCR</i>	45
4.1.3.	<i>Électrophorèse sur gel d'agarose</i>	46
4.1.4.	<i>Traitement statistique des profils obtenus sur gel d'agarose</i>	46
4.2.	Identification moléculaire des actinobactéries.....	47
4.2.1.	<i>Electrophorèse</i>	48
4.2.2.	<i>Purification des bandes d'ADN à partir du gel d'agarose</i>	48
4.3.	Séquençage et analyse des séquences.....	48
5.	Optimisation de la production de la chitinase.....	48

5.1.	Conditions des fermentations	49
5.2.	Les plans d'expériences	50
5.2.1.	<i>Plan d'expériences Plackett et Burman</i>	50
5.2.2.	<i>Plan composite centré</i>	52
5.3.	Analyses statistiques	55
5.4.	Expérience de confirmation	56
5.5.	Cinétique de production des chitinases	56
6.	Purification de la chitinase	56
6.1.	Précipitation par le sulfate d'ammonium	56
6.2.	Dialyse.....	57
6.3.	Chromatographie d'affinité.....	57
6.3.1.	<i>Chromatographie échangeuse d'ion</i>	57
7.	Caractérisation partielle de la chitinase purifiée	57
7.1.	Effet du pH.....	57
7.2.	Stabilité du pH.....	58
7.3.	Effet de la température	58
7.4.	Stabilité thermique de la chitinase purifiée	58
8.	Méthodes analytiques.....	58
8.1.	Dosage de l'activité chitinolytique.....	58
8.2.	Dosage des protéines.....	58
8.3.	Mesure de la biomasse	59

RESULTATS ET DISCUSSION

1.	Caractéristiques physico-chimique du sol.....	60
2.	Isolement et purification des actinobactéries	60
3.	Analyse phylogénétique des isolats	63
4.	Mise en évidence des actinobactéries productrices de chitinases	69
4.1.	Répression catabolique et activité antifongique chitinase-dépendante.....	74
4.2.	Activité antibactérienne des actinobactéries chitinomytiques	79
5.	Optimisation d'un milieu de culture pour la production des chitinases.....	81
5.1.	Sélection des facteurs influençant la production de chitinase par la souche C9	82
5.2.	Détermination des optima	86
5.3.	Tracés des surfaces de réponse et Calcul des optima.....	90
5.4.	La validation de la conception expérimentale.....	93

5.5. Etude des cinétiques de croissance et de production de la chitinase de <i>Streptomyces griseorubens</i> C9	93
6. Purification de la chitinase	94
7. Caractérisation partielle de l'enzyme purifiée	96
7.1. Effet du pH sur la chitinase de <i>S. griseorubens</i> C9.....	96
7.2. Effet de la température sur la chitinase de <i>S. griseorubens</i> C9.....	98
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	100
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103
ANNEXES	
ARTICLE	

INTRODUCTION

La biotechnologie est une science multidisciplinaire qui englobe différentes techniques et procédés. Il s'agit peut-être actuellement de la technologie émergente la plus au point et la plus susceptible d'avoir un avenir. En outre, cette situation s'est accélérée en raison des grands progrès de la biologie moléculaire ces dernières années, qui ont permis d'obtenir de nouveaux organismes et protéines de synthèse. Face à la pollution croissante de la planète, la biotechnologie est considérée comme une solution dans bon nombre de domaines de la prévention de la pollution, dans le traitement des déchets et dans les nouvelles technologies moins polluantes.

Les enzymes sont des catalyseurs naturels ; comme c'est le cas pour tous les processus naturels, elles sont très spécifiques et font preuve d'une efficacité thermodynamique. Utilisées depuis des siècles, en particulier dans le secteur de la production d'aliments, elles sont l'une des formes les plus anciennes de la biotechnologie.

L'utilisation d'enzymes est d'une grande importance non seulement dans l'industrie alimentaire mais également dans la production de substances chimiques, dans les systèmes analytiques et de diagnostic, dans le traitement des maladies et enfin, dans l'industrie émergente des technologies plus propres. L'utilisation des enzymes dans tous ces domaines a été rendue possible grâce aux meilleures connaissances de leur structure, de leur fonction dans les systèmes métaboliques des êtres vivants et par-dessus tout grâce à la possibilité d'obtenir des enzymes de synthèse via la manipulation génétique et chimique des microorganismes.

Les microorganismes sont largement exploités en biotechnologies pour la production de molécules bioactives ayant des activités biologiques très importantes. Parmi ces derniers, les actinobactéries, en particulier ceux appartenant au genre *Streptomyces* sont connus pour leur capacité à produire des antibiotiques et des enzymes lytiques (Rughaworn et al. 2007). Ce genre a été largement exploré pour le criblage des agents de lutte biologique contre des maladies de plantes (El-Tarabily and Sivasithamparam 2006), 75% de composés biologiquement actifs sont produits par ce genre. Cependant, depuis les années 1990, le taux de nouvelles molécules découvertes à partir d'actinobactéries a remarquablement diminué, et très peu de molécules ont été commercialisées (Cattoir and Daurel 2010). Afin de palier à ce déficit et découvrir de nouvelles molécules bioactives autre que les antibiotiques, de nouvelles stratégies ont été mise en place. Tel que l'exploration de niches écologiques extrêmes ou peu étudiées (sols arides, fonds marins, ...), une autre alternative est d'explorer d'autres molécules

bactériennes afin de lutter contre les microorganismes pathogènes, comme les peptides antimicrobiens, les bactériophages et les hydrolases de la paroi des bactéries ou des champignons (Parisien et al. 2007).

Deux siècles après la découverte de la chitine, il est largement admis que ce biopolymère est un biomatériau important aux applications multiples. De nombreuses études sur la chitine ont mis l'accent sur ses applications biomédicales, en biochimie, en industries alimentaire et chimiques. Elle a une activité antimicrobienne, anti-cholestérol et anti-tumorale (Gooday 1999; Patil et al. 2000, [CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]).

La chitine est le second polysaccharide le plus représenté dans la nature après la cellulose. Absente du règne végétal, la chitine est une structure de soutien chez les champignons et les animaux. On la trouve chez les cnidaires, les brachiopodes, les annélides. Elle est aussi présente dans les téguments de nombreux invertébrés tels les mollusques ou les nématodes.

Les enzymes chitinolytiques ou chitinases sont les enzymes qui hydrolysent la chitine. Elles sont présentes dans de nombreux organismes, virus, bactéries, champignons, insectes, plantes supérieures et mammifères. Elles ont fait l'objet d'études biologiques, et sont regroupées en familles, sur la base de leur similarité de séquence d'acides aminés. Les chitinases ont suscité un intérêt dans différentes applications biotechnologiques en raison de leur capacité à dégrader la chitine dans la paroi cellulaire des champignons et des insectes, ce qui a conduit à les utiliser en tant qu'agents antimicrobiens ou insecticides. Elles sont impliquées dans la résistance des plantes contre les pathogènes fongiques en raison de leur nature inductible et activités antifongiques *in vitro* (Taira et al. 2002). Une autre application intéressante de la chitinase est la bioconversion respective de la chitine et du chitosane en N-acétylglucosamines et chito-oligosaccharides qui ont des propriétés pharmacologiques.

Le territoire algérien est caractérisé par un écosystème méditerranéen au Nord, saharien au Sud et une région intermédiaire semi-aride. Cette région est caractérisée par une altitude de 900 à 1200 m et de faibles précipitations annuelles (environ 320 mm par an). Les moyennes minimale et maximale de la température sont de + 4 et 33 °C, respectivement (Aouar et al. 2012). La diversité des actinobactéries dans les écosystèmes semi-arides, n'a pas été largement explorée. Ainsi, peu d'informations sur le potentiel antimicrobien des

actinomycètes isolés à partir d'échantillon du sol non rhizosphérique ont été reportées (Boudemagh et al. 2005; Kitouni et al. 2005; Boughachiche et al. 2005).

À notre connaissance, aucune recherche n'a porté sur l'isolement d'actinobactéries à partir de sols arides de la région de Laghouat (Algérie) et sur leurs éventuelles activités chitinolytiques et phytopathogènes. De ce fait, nous avons choisi cet écosystème pour mener notre étude, dont les objectifs se focalisent principalement sur :

- ✓ L'isolement, la purification et la mise en évidence d'actinobactéries productrices de chitinases à partir d'un écosystème inhabituel (sol aride).
- ✓ L'étude de la diversité phylogénétique des souches actinomycétales isolées et l'identification moléculaire des actinobactéries chitinolytiques.
- ✓ Recherche de l'activité antimicrobienne et sa corrélation à l'activité chitinolytique.
- ✓ Sélection des meilleures souches antagonistes et productrices de chitinases.
- ✓ Optimisation d'un milieu de culture pour la production de chitinases.
- ✓ Purification et caractérisation de l'enzyme.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La chitine

1.1. Structure

Historiquement, on doit la découverte de la chitine au chimiste français Henri Braconnot en 1811 (Le Roux 2012). En effet, il a isolé une substance fibreuse à partir d'un champignon et a observé qu'elle n'était pas soluble dans les solutions aqueuses d'acides. Il appela cette substance « fungina ». En 1823, cette même substance a été décrite par Odier à partir des cuticules d'insectes (coléoptères) (Desbrieres 2002; Khoushab and Yamabhai 2010), qu'il nomma chitine. Issue du grec « khiton » qui signifie « tunique » car elle participe à l'enveloppe extérieure de nombreux organismes depuis des milliers d'années. À ce titre, la chitine ou ses unités osidiques servent à étudier les fossiles et la phylogénie (Shen and Jacobs-Lorena 1999). Par exemple, Furuhashi l'a utilisé pour déterminer l'ancêtre commun des mollusques (Furuhashi et al. 2009).

Avec au moins 10 gigatonnes synthétisées et dégradées chaque année dans la biosphère, la chitine est le second polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose (Gooday 1990a; Whitman et al. 1998; Muzzarelli 1999; Kaiser and Benner 2008), à la fois dans le milieu terrestre et marin. C'est un polysaccharide cristallin constitué de longues chaînes linéaires contenant plus de 1000 unités de *N*-acétyl- β -D-glucosamine liées par des liaisons β 1-4 (figure 1). Sa structure est similaire à celle de la cellulose, mais diffère par la présence des groupements *N*-acétylés sur les carbones C2 des glucoses. Environ 20 à 400 chaînes du polysaccharide s'associent par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes pour créer la forme structurale du polysaccharide et donner naissance à des micro-fibrilles qui confèrent le rôle squelettique de la chitine (Ruiz-Herrera and San-Blas 2003). Elle peut également être liée à d'autres éléments de structure, tels que des protéines ou des glucanes, qui constituent souvent plus de 50% de la masse des tissus contenant de la chitine (Attwood and Zola 1967; Schaefer et al. 1987; Merzendorfer and Zimoch 2003). Une chitine parfaite posséderait un degré d'acétylation (DA) de 100 % tandis que le chitosane, son dérivé désacétylé idéal, aurait un DA de 0 % (ou un degré de désacétylation, DD, de 100 %) si la désacétylation était complète. Dans la nature, ces deux extrêmes n'existent pas, la forme la plus courante est une chitine de DA de 85 à 95 %, rarement moins. Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine. La limite de DA entre chitine et chitosane varie selon les auteurs. On parle de chitosane à partir de 50 % de *N*-acétyl-glucosamine selon (Sagheer et al. 2009), plus généralement le chitosane est défini comme étant la forme désacétylée à plus de 60-70 %.

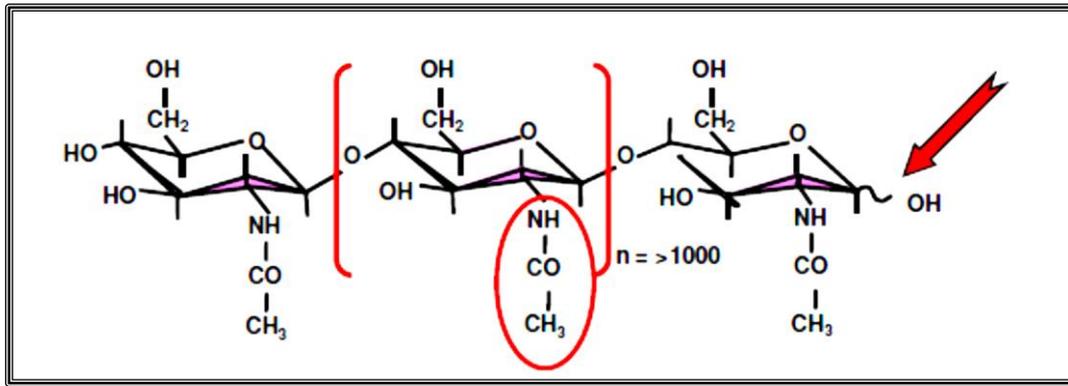


Figure 1: Structure d'une chaîne linéaire de chitine. L'unité N-acétylglucosamine, indiquée entre parenthèses, constitue l'unité répétitive du polymère de chitine. Le groupement acétylé est entouré en rouge. La flèche indique l'extrémité réductrice de la chaîne.

Contrairement à la cellulose, dont une seule forme cristalline est décrite en conditions naturelles, La chitine est polymorphique, possédant trois formes cristallines différentes, α , β , et γ . Les trois formes se distinguent par le degré d'hydratation, la taille, la disposition et le nombre de chaînes de chitine (Merzendorfer 2006).

✓ **La chitine α** possède des chaînes polysaccharidiques disposées de façon antiparallèle (tableau 1), donnant naissance à de nombreux ponts hydrogènes, ce qui entraîne une rigidité importante et une faible sensibilité aux agents de désacétylation. La chitine α constitue la forme la plus abondante du polysaccharide et est largement distribuée dans les carapaces de crabes et crevettes ainsi que dans les parois cellulaires des champignons (Noishiki et al. 2005). Elle n'est pas soluble dans les solvants aqueux.

✓ **La chitine β** est moins stable, moins cristalline et plus rare. Ses chaînes polysaccharidiques sont toutes parallèles entre elles et les ponts hydrogènes y sont moins nombreux (tableau 1). Ce qui lui confère une plus grande hydrophilie et réactivité notamment avec les solvants (Shimojoh et al. 1998; Aranaz 2009). Elle est présente chez les diatomées, dans les plumes de calmar, dans les tubes produits par des vers de la famille des pogonophores et vestimentifères et chez certaines algues et protozoaires (Blackwell 1969; Rinaudo 2008).

✓ **La chitine γ** est peu courante et a été identifiée dans les cocons des insectes. Elle implique deux chaînes parallèles qui alternent avec une chaîne antiparallèle (tableau 1) (Rinaudo 2008).

Tableau 1 : Arrangement des chaînes dans les trois formes de chitine.

Forme	Arrangement des chaînes	Schématisation
Chitine-α	Antiparallèles	↓↑↓↑↓↑
Chitine-β	Parallèles	↑↑↑↑↑↑
Chitine-γ	Deux parallèles pour une antiparallèle	↑↑↓↑↑↓

1.2. Sources

Les sources de chitine sont variées dans le monde. Elle est largement distribuée chez les eucaryotes, incluant des organismes unicellulaires (levures, amibes, diatomées) et multicellulaires (champignons filamenteux, arthropodes, nématodes, mollusques) (Ehrlich et al. 2007). Cependant, elle est absente chez les plantes, les vertébrés et les procaryotes (Cohen-Kupiec and Chet 1998).

Les arthropodes (crustacés, insectes, arachnides), comptant plus de 10^6 espèces, constituent en particulier une source abondante de ce polymère. La chitine est présente par exemple dans les crevettes, les homards, les crabes, les langoustines, les calamars, les insectes (blattes, fourmis), les levures et les champignons, ou encore certaines éponges et algues marines (Ehrlich et al. 2007). Le pourcentage de la forme α -chitine varie de 7 % chez le Barnacle (*Lepas anatifera*) à 36 % chez les écrevisses (*Astacus fluviatilis*) (Shahidi 2005).

Parmi les céphalopodes, l'os de seiche (*Sepia officinalis*) contient 20 % de β -chitine et le calamar (*Loligo vulgaris*) 40 % (Shahidi and Abuzaytoun 2005) (tableau 2).

Chez les mollusques bivalves, l' α -chitine forme avec les protéines un complexe orienté de façon définie distribué dans l'axe et sur le bord de la coquille. La chitine joue un rôle dans des forces mécaniques servant à intégrer les régions flexibles et à coordonner le changement au cours de la formation de coquille (Shahidi and Abuzaytoun 2005).

L' α -chitine est rencontrée dans la membrane cellulaire des champignons organisés sous forme de microfibrilles (10-25 nm de diamètre, et 2-3 μm de longueur). Des études sur les basidiomycètes ont rapporté que la chitine constitue 8 à 19 % du mycélium, alors que le chitosane ne dépasse guère 1 %. La chitine est présente également dans le mycélium de l'ascomycète *Aspergillus niger* (42 % de chitine et 11 % de chitosane). Chez le zygomycète,

Rhizopus oryzae, le chitosane constitue 14 % alors que chez *Mucor rouxii* le pourcentage est variable entre 8,9 et 35 % (Desbrieres 2002; Crini et al. 2009).

Tableau 2 : Pourcentages des teneurs en chitine par espèces (Mathur and Narang 1990; Shahidi 2005).

Source	Teneur en chitine (en % matière sèche)	Source	Teneur en chitine (en % matière sèche)
Arthropodes	2 à 72	Crabes <i>Chionoecetes opilio</i>	26,6
Mollusques	6 à 40	Crevettes <i>Pandallus borealis</i>	17,0
Ponophores	33	Crevettes <i>Cangron cangron</i>	33
Cnidaires (capsules œufs)	3 à 30	Crevettes <i>Penaeus monodon</i>	3 à 30
Annélides	0,2 à 38	Ecrevisses <i>Procamborus darkia</i>	0,2 à 38
Brachiopodes	4 à 29	Bouquet	4 à 29
Champignons	2,9 à 20,1	Plume de calmar	2,9 à 20,1
Algues/ Lichen	Faible	Krill <i>Euphasia superba</i>	Faible

1.3. Applications

La chitine et le chitosane sont naturelles, non-toxiques, biodégradables et versatiles. Possèdent des pouvoirs hydratants et antimicrobiens (Jayakumar et al. 2011). Ils ont des applications étendues et très diverses comme dans les industries alimentaires, textiles, pharmaceutiques, en plus des applications environnementales et biomédicales. Leur utilisation repose principalement sur leurs activités biologiques intéressantes et leur capacité à former des matrices (Peniche et al. 2008; Crini et al. 2009). Le tableau 3 met en évidence quelques importantes applications de la chitine et de son dérivé naturel.

Tableau 3 : Propriétés de la chitine et du chitosane et leurs principales applications.

PROPRIÉTÉS	DOMAINES D'APPLICATION	APPLICATIONS
Propriétés chimiques ✓ Polyamine linéaire ✓ Réactivité des groupements amines ✓ Réactivité des groupements hydroxyles	AGRICULTURE	Enrobage des semences Alimentation des volailles Fertilisant
	ALIMENTAIRE	Additifs alimentaires (liant, émulsifiant, stabilisant...) Clarification des boissons
Propriétés polyélectrolytes (en milieu acide) Polymère cationique ✓ Forte densité de charge ✓ Excellent flocculant ✓ Adhésion à des surfaces chargées négativement	BIOMÉDICAL	Agent hémostatique, bactériostatique, spermicide. Anticoagulant. Vaisseaux sanguins artificiels. Gel dentaire. Lentille cristalline (ophtalmologie). Membrane pour dialyse. Capsules pour le relargage des médicaments. Réduction du taux de cholestérol. Peaux artificielles. Pansements. Accélération de la cicatrisation des blessures. Fils de suture chirurgicaux bio-résorbables
Propriétés Biologiques ✓ Biocompatibilité ✓ Non toxique ✓ Biodégradable Bioactivité ✓ Accélère la cicatrisation des plaies ✓ Réduit le niveau de cholestérol ✓ Stimule le système immunitaire	COSMÉTIQUE	Agent de liaison dans les crèmes Émulsifiant Humidifiant Soins capillaires
	ENVIRONNEMENT (Traitement des eaux usées et des déchets)	Purification des eaux par floculation Formation de complexes avec les métaux
Propriétés chélatantes Propriétés filmogènes Propriétés de rétention d'eau Propriétés antifongiques	AUTRES	
	Acoustique	Membrane des haut-parleurs
	Biotechnologie	Immobilisation des cellules et des enzymes
	Industrie papetière	Additifs
	Textile	Additifs (imperméabilisant...)
	Photographie	Films

1.1.Synthèse et rôle

La biosynthèse de la chitine a été étudiée chez une grande variété d'organismes. Elle est catalysée par des enzymes membranaires, appelées chitines synthases (CS ; EC 2.4.1.1.6), appartenant à la famille 2 des glycosyl-transférases (GT2) (Choquer et al. 2004; Sanchez-

Vallet et al. 2015; Gonçalves et al. 2016), dont le poids moléculaire est compris entre 100 et 130 kDa (Roncero 2002). Elles catalysent l'association de deux monomères de *N*-acétylglucosamines et requièrent de l'UDP-*N*-acétylglucosamine comme substrat et des cations bivalents (Khoushab and Yamabhai 2010).

La biosynthèse est divisée en trois étapes distinctes. Au cours de la première étape, l'enzyme se place le long de la membrane cytoplasmique et oriente convenablement le polymère vis-à-vis de son site actif. La seconde étape est la translocation du polymère à travers la membrane. Il est alors libéré dans l'espace extracellulaire. La dernière étape permet l'assemblage de plusieurs polymères en microfibrilles cristallines. La fin de la réaction et la translocation de la chitine dans le milieu extracellulaire se fait par rupture de la liaison covalente liant le polymère et l'enzyme (Merzendorfer 2006) (figure 2). Ce processus est nécessaire pour faciliter la mue chez les arthropodes, ainsi que le bourgeonnement, la croissance du mycélium, la ramification des hyphes ou la formation de spores chez les champignons.

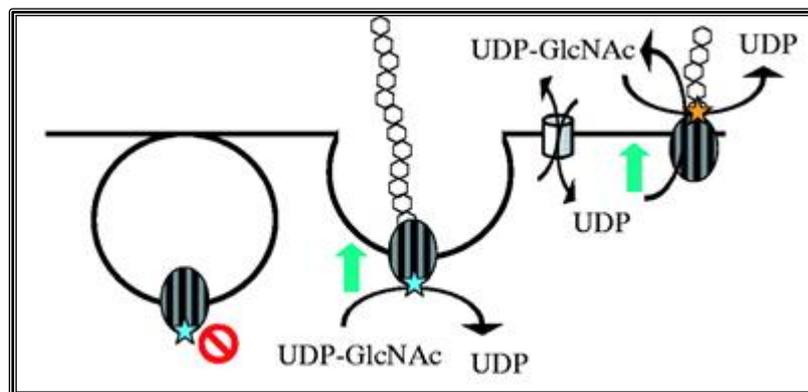


Figure 2 : Biosynthèse de la chitine chez les insectes. Les étoiles bleues et orange représentent le site catalytique faisant face soit au cytoplasme soit à l'espace extracellulaire, respectivement (Merzendorfer and Zimoch 2003).

1.2. Dégradation de la chitine

1.2.1. Dégradation chimique

La chitine est pratiquement insoluble dans l'eau, les acides dilués, les bases diluées et concentrées, les alcools et d'autres solvants organiques. Elle est seulement soluble dans l'acide chlorhydrique concentré (utilisé pour l'obtention de la chitine colloïdale par désacétylation acide), l'acide sulfurique, l'acide phosphorique à 78-97% et l'acide formique anhydre (O'Neil et al. 2006). En outre, la matrice dans laquelle la chitine est intégrée dans sa forme naturelle

prévient les attaques chimiques, entravant davantage sa dégradation physico-chimique. Pour qu'un organisme puisse dégrader la chitine naturelle, il doit avoir la capacité d'éliminer des revêtements cireux et protéiques pour accéder à la chitine. Il doit également être en mesure de faire face aux divers degrés de cristallinité et d'acétylation de la chitine. Beaucoup de recherche sur les chitinases utilisent des substrats analogues tels que la chitine colloïdale. Toutefois, en raison de sa forte teneur en carbone (47,29%) et en azote (6 à 7%) (C : N =8 :1) (Jeuniaux et al. 1993), sa dégradation est une étape extrêmement importante dans le cycle nutritif, en particulier dans les océans (Poulicek et al. 1998; Kirchman and White 1999).

1.2.2. Dégradation enzymatique

La chitine est dégradée par une double hydrolyse enzymatique réalisée par l'action combinée des chitinases et des β N-acétyl-glucosaminidases (Kramer and Koga 1986). Ces enzymes hydrolysent la chitine au niveau de la liaison glucosidique β (1-4) N-acétyl glucosamines. Par ailleurs, la chitine peut être désacétylée en chitosane ou éventuellement même en des formes cellulose-like, si elle est soumise à une désamination (figure 3). Un tel mécanisme de dégradation a été suggéré dans quelques études antérieures (Zobell and Rittenberg 1938; Campbell and Williams 1951; Beier and Bertilsson 2013). Les chitinases et les chitosanases se chevauchent dans la spécificité du substrat, tandis que leur efficacité respective est commandée par le degré de désacétylation du polymère (Somashekar and Joseph 1996; Beier and Bertilsson 2013). Les polymères de la chitine constitués de résidus N-acétyl-D-glucosamine peuvent être clivés soit, au hasard par l'action d'une endochitinase, soit par l'exochitinase A à partir de l'extrémité N-terminale ou par l'exochitinase B à partir de l'extrémité non réductrice afin de produire des oligomères. La chitine peut être désacétylée par la chitine déacétylase entraînant la production de chitosane, qui peut être clivé par l'endo/exo-chitosanase. Les oligomères de la chitine et du chitobiose peuvent encore être hydrolysés par des chitodextrinase et une N-acétylglucosaminidase, respectivement, afin de produire le N-acétyl-D-glucosamine (figure 4). Outre les chitosanases spécifiques, les cellulases peuvent aussi posséder un pouvoir considérable de cliver le chitosane (Xia et al. 2008) (figure 3). Elles peuvent également se lier directement à la chitine (Ekborg et al. 2007; Li and Wilson 2008). Mais jusqu'à présent, on n'a pas rapporté que ces enzymes hydrolysent effectivement les polymères de chitine. Peu d'études ont comparé l'importance quantitative des différentes voies chitinolytiques, et les études disponibles suggèrent que la dégradation de la chitine par désacétylation initial pourrait être plus importante dans le sol et les sédiments

par rapport aux milieux aquatiques (Hillman et al. 1989; Gooday 1990a; Beier and Bertilsson 2013).

Si la production de chitine est une propriété de certaines cellules animales et fongiques, cette dernière peut être hydrolysée par des organismes ne possédant pas de chitine dans leur structure à des fins nutritionnelles en grande partie, en tant que source de carbone et d'azote. Les enzymes chitinolytiques sont présentes chez de nombreux organismes, comprenant les bactéries, les champignons, les crustacés, les insectes (Perrakis et al. 1993), les plantes (Neuhaus 1999), et même chez les vertébrés (Renkema et al. 1995, 1997, 1998).

L'activité des chitinases peut être mesurée par une variété de substrats et à différentes conditions. Les tests enzymatiques sont souvent effectués avec des substrats artificiels obtenus par l'acétylation du chitosane. D'autres substrats peuvent aussi être utilisés, comme le glycol-chitine, le chitosane, les chitooligosaccharides ou le 4-méthyl-umbelliferyl-chitotriose (Neuhaus 1999).

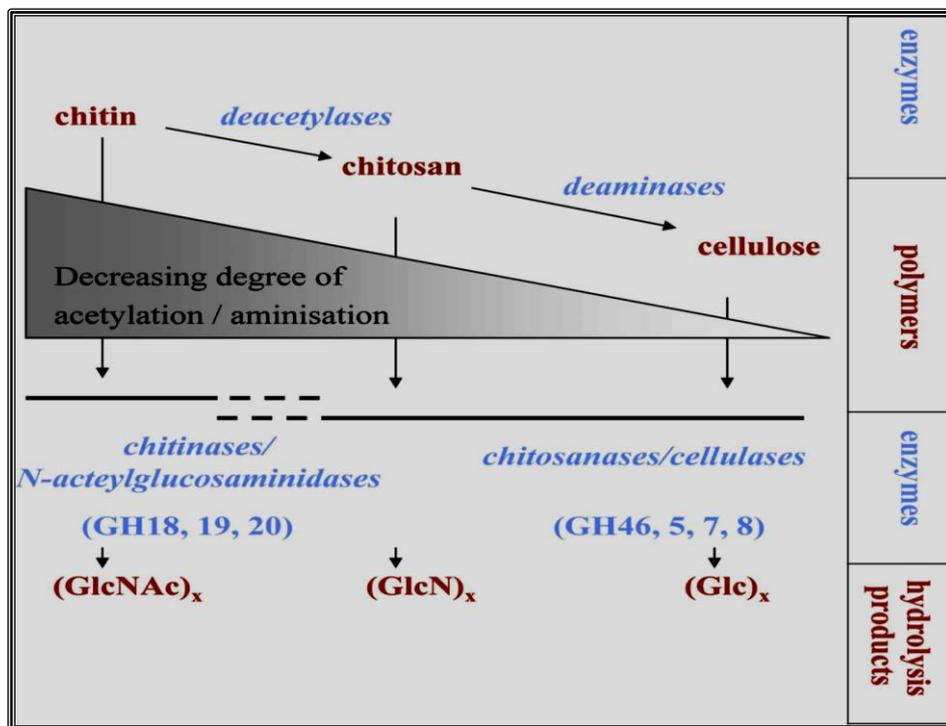


Figure 3 : Processus impliqués dans la dégradation de la chitine. (Beier and Bertilsson 2013).

GH : famille des glycosides hydrolases; **GlcNAc** : N-acétylglucosamine; **GlcN** : glucosamine;

Glc : glucose.

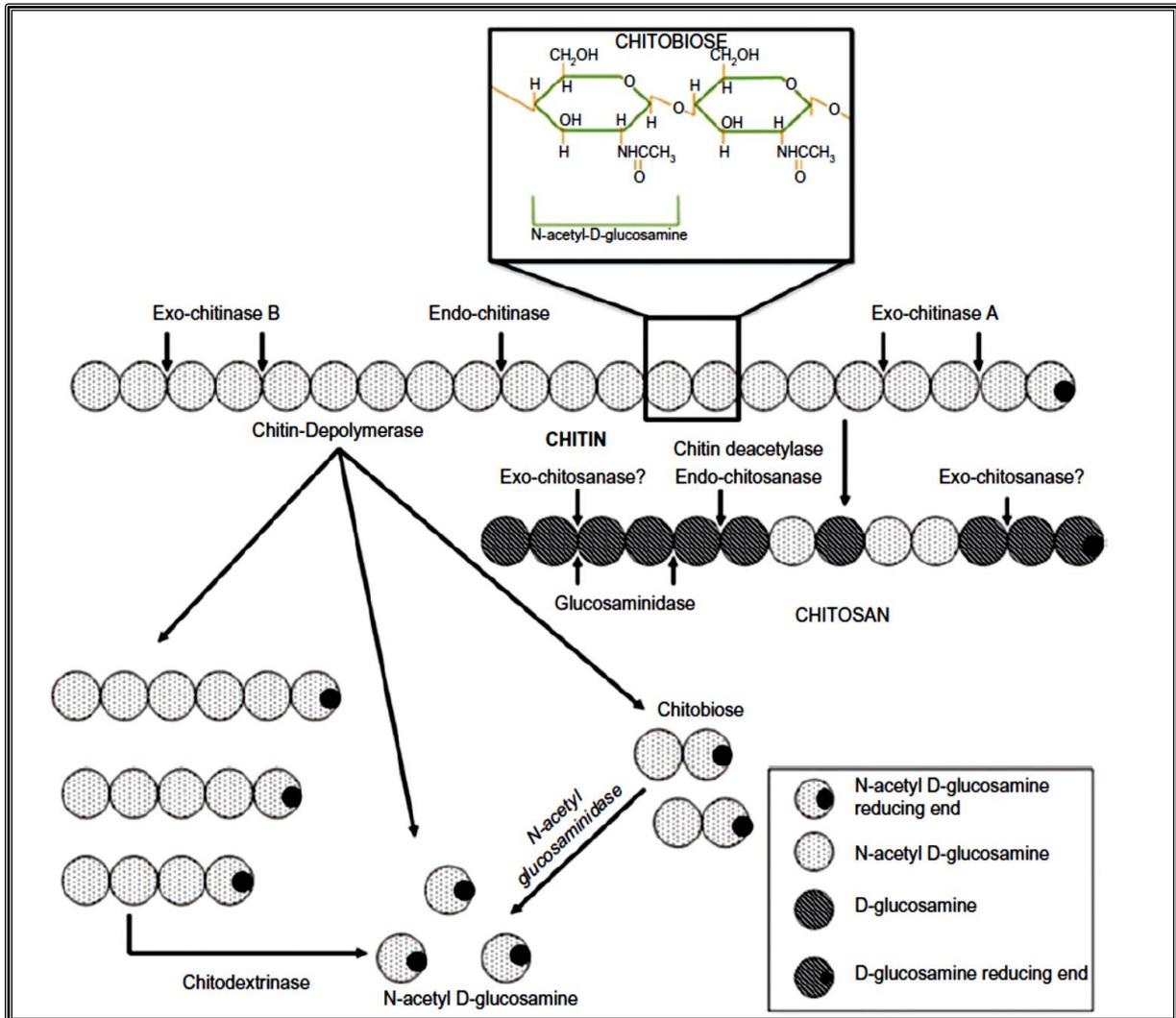


Figure 4 : Représentation schématique de la structure de la chitine et des multiples enzymes impliquées dans sa modification/dégradation. (Neeraja et al. 2010).

2. Classification des chitinases

Les chitinases ont été découvertes par Karrer en 1929 (Karrer and Hofmann 1929; Wysokowski et al. 2015; Patrulea et al. 2015), et leur activité spécifique dans l'hydrolyse de la chitine a été démontrée par Zechmeister en 1939 (Zechmeister and Tóth 1931; Wysokowski et al. 2015). Elles peuvent être classées soit selon leur structure ou leur mode d'action.

En se basant sur la classification des enzymes de la base de données CAZy : Carbohydrate Active enZYme (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>) (Henrissat 1991; Henrissat and Bairoch 1996), les chitinases (EC 3.2.1.14) (EC : Enzyme Commission) appartiennent à la superfamille des GH (Glycosides Hydrolases EC 3.2.1.-). Cette dernière regroupe 135 familles classées en fonction des similarités de leurs séquences en acides aminés. Ce sont des enzymes capables d'hydrolyser les ponts glycosidiques entre deux ou plusieurs carbohydrates ou entre un carbohydrate et une autre molécule.

2.1. Selon le mode d'action

Les chitinases sont classées selon leur mode d'action enzymatique en endo et exo-chitinases. Les premières, également nommés polys [1,4-(Nacétyl- β -D-glucosaminide)] glycanohydrolases (EC 3.2.1.14) hydrolysent les liaisons internes des microfibrilles de chitine pour libérer des fragments de chitobiose, chitotriose et chitotétraose composés respectivement de deux, trois ou quatre unités *N*-acétylglucosamine. Les secondes, nommées exochitinases ou β -*N*-acétylhexosaminidases (EC 3.2.1.52), participent à la dégradation complète des fragments de chitine. Parmi ces exochitinases, les chitobiosidases libèrent des diacétylchitobioses à partir des extrémités non-réductrices de la chitine (Jeuniaux 1963) et les β -D-acétylglucosaminidases hydrolysent ces diacétylchitobioses en monomères de *N*-acétylglucosamine (Cohen-Kupiec and Chet 1998) (figure 4).

2.2. Selon la structure

La classification des chitinases a été faite en 2 étapes, s'attardant tout d'abord sur les chitinases végétales. Elles ont été réparties en cinq classes en fonction de leurs séquences en acides aminés. Ces 5 classes possèdent un peptide signal. Celui-ci n'est pas nécessaire pour l'activité des chitinases mais peut altérer les propriétés de l'enzyme.

- ✓ **Classe I** : Ces chitinases ont un poids moléculaire d'environ 32 kDa, les protéines matures sont constituées d'environ 300 acides aminés. Elles possèdent un domaine catalytique, un domaine Chitin-Binding (CBD) (figure 5) riche de 8 résidus cystéines et présentent une structure très conservée d'environ 40 acides aminés. Les domaines

CBD riches en cystéines semblent être importants dans l'action antifongique mais non indispensables à l'activité catalytique (Ubhayasekera et al. 2009). Le domaine N-terminal est séparé du domaine catalytique par une région charnière variable riche en glycine ou proline. Les chitinases de classe I se divisent en 2 groupes. La classe Ia de nature basique, qui possède en plus d'un domaine N-terminal un domaine C-terminal riche en leucine ou valine lui permettant une localisation vacuolaire (Robert et al. 2002; Kasprzewska 2003; Ohnuma et al. 2011) et la classe Ib de nature acide est extracellulaire. Les chitinases de la classe I sont présentes aussi bien chez les plantes monocotylédones que chez les dicotylédones (Welburn et al. 1994; Keyhani and Roseman 1996).

- ✓ **Classe II** : chitinases ayant une masse moléculaire comprise entre 27 et 28 kDa. Elles ont une grande identité de séquence en acides aminés (environ 60%) (Shinshi et al. 1990; Masuda et al. 2015; Younas et al. 2016) avec les chitinases de classe I. Le domaine CBD est absent ainsi que l'extension en C-terminal (Kuranda and Robbins 1991; Masuda et al. 2015) (figure 5). Les chitinases de la classe II sont acides et sécrétées dans l'espace extracellulaire (Li 2005). Elles sont principalement trouvées chez les plantes dicotylédones (Keyhani and Roseman 1996).
- ✓ **Classe III** : De masse moléculaire comprise entre 28 et 30 kDa, les chitinases de classe III n'ont aucune similarité de séquence avec les chitinases de classes I et II (figure 5) et présentent une activité lysozyme élevée (Van Loon et al. 1994; Neuhaus et al. 1996). Les chitinases de la classe III ont été identifiées chez plusieurs plantes dicotylédones et monocotylédones (Keyhani and Roseman 1996; Masuda et al. 2015).
- ✓ **Classe IV** : Les chitinases de classe IV conservent une grande similarité de séquence avec les chitinases de classe I (entre 41 et 47%) mais sont plus courtes en raison de 4 délétions (une dans le domaine de fixation à la chitine et trois dans le domaine catalytique) pour une protéine mature de 241 à 255 acides aminés (figure 5). Elles sont extracellulaires et hydrolysent plus efficacement les oligomères que les polymères de chitine. Les chitinases de la classe IV sont principalement connues chez les plantes dicotylédones (Keyhani and Roseman 1996).
- ✓ **Classe V** : Les chitinases de classe V (figure 5), présentent une faible similarité de séquence avec les chitinases de classe III mais une similarité significative avec des exo-chitinases de bactéries, de nématodes et de champignons (Taira et al. 2009; Ohnuma et al. 2011). Elles ont d'abord été isolées du tabac (plante dicotylédone) (Kuranda and Robbins 1991; Keyhani and Roseman 1996).

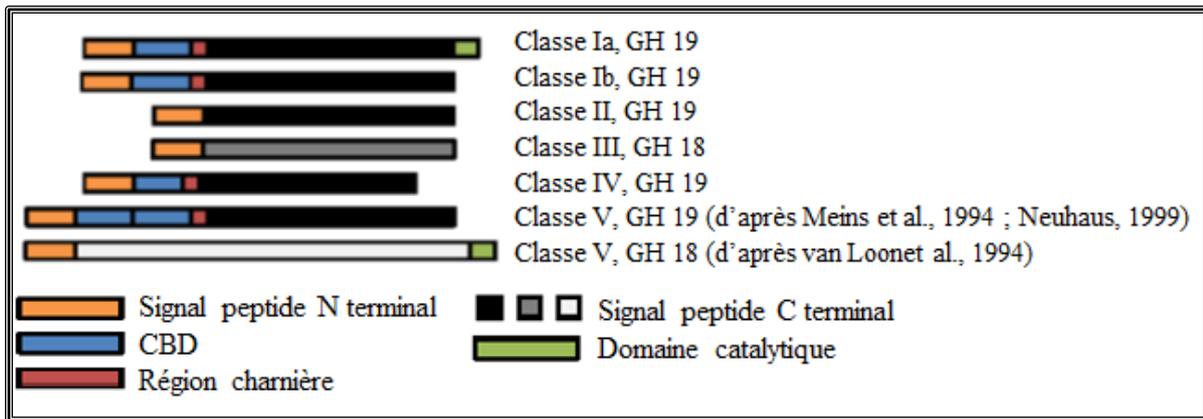


Figure 5 : Représentation des 5 classes de chitinases (modifié d'après Singh *et al.*, 2007, (Graham and Sticklen 1994; Kolosova et al. 2014). CBD: Chitin **B**inding **D**omain.

L'étude a ensuite été étendue à l'ensemble des chitinases mettant en évidence des différences de structures tridimensionnelles et de mécanismes catalytiques permettant ainsi de les regrouper en 4 familles de glycosyl hydrolases (GH), la famille 18, la famille 19, la famille 23 et la famille 48.

2.2.1. Les chitinases de la famille 18

Les chitinases de la famille 18 rassemblent plus de 460 enzymes caractérisés, identifiés principalement chez les bactéries (Lecleir et al. 2004), les virus, les archaeas (Tanaka et al. 1999; Gao et al. 2003), les champignons et chez un grand nombre de plantes (Karlsson and Stenlid 2009). La structure primaire de ces chitinases possède plusieurs motifs d'acides aminés conservés (Robertus and Monzingo 1999). Ces chitinases ne possèdent qu'un seul site catalytique, ont une structure tridimensionnelle commune composée de 8 unités α/β (figure 6) (Wierenga 2001; Malecki and Rypniewski 2013) et possèdent 2 acides aminés conservés au niveau du site actif de type DXDXE (figure 7), un aspartate (D) et un glutamate (E) nécessaires au mécanisme catalytique (Tsuji et al. 2010).

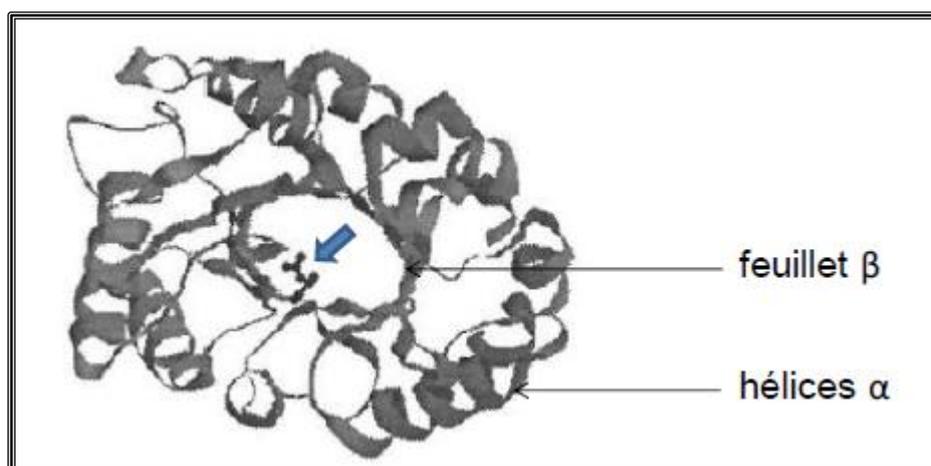


Figure 6 : Structure tridimensionnelle des chitinases de la famille 18 (exemple d'une chitinase de classe III) (modifié d'après Neuhaus, 1999). Le site catalytique est représenté par une flèche bleue.

<i>Halobacterium sp.</i> (Uniprot : Q9HR84)	FDGLD LDWE YPPG
<i>Homo sapiens</i> (Uniprot : Q13231)	FDGLD LDWE YPPG
<i>Drosophila melanogaster</i> (Uniprot : D0IQG7)	FDGLD LDWE YPTQ
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Uniprot: O81862)	FHGLD LDWE YPSS
<i>Nicotiana tabacum</i> (Uniprot: Q43576)	FHGLD LDWE YPLS
<i>Nicotiana tabacum</i> (Uniprot: P29060.1)	LDG IDFDIE GGTT
<i>Vitis vinifera</i> (Uniprot : P51614)	LDG IDFDIE LGST
<i>Cucumis sativus</i> (Uniprot P17541)	LDGV DFDIE SGSG

Figure 7 : Motif spécifique de type **DXDXE** de la famille 18 des glycosides hydrolases. Résidu aspartate (**D**) et résidu glutamate (**E**) nécessaires au mécanisme catalytique.

2.2.2. Les chitinases de la famille 19

Celles-ci hydrolysent les liaisons glycosidiques en inversant la configuration anomérique par un mécanisme catalytique acido-basique (Neuhaus 1999; Watanabe et al. 1999; Kawase et al. 2004). Les chitinases de cette famille diffèrent de celles de GH18 par leur séquence en acides aminés, leur structure tridimensionnelle et par le mécanisme d'action de leur site catalytique (Kawase et al. 2004). Elles possèdent une structure tridimensionnelle principalement composée d'hélices α , un site catalytique composé de 2 régions distinctes incluant deux résidus glutamate (figure 8) et ont 3 résidus conservés dans toutes les séquences (figure 9) (Neuhaus 1999).

Jusqu'à la découverte de la chitinase C-1 chez *Streptomyces griseus* HUT 6037 (Ohno et al. 1996), les chitinases de cette famille étaient assignés aux plantes supérieures seulement (Graham and Sticklen 1994). Depuis lors, elles ont été découvertes chez d'autres bactéries, y compris, *Burkholderia gladioli*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenza* et *Pseudomonas aeruginosa* (Itoh et al. 2002), des virus (Yamada et al. 2010) et d'autres organismes, tels que les nématodes (*Caenorhabditis elegans*). Les chitinases de la famille GH19 restent encore mal connues (Ubhayasekera 2011). Dans la littérature, 12 structures cristallines existent, dont 2 seulement sont des chitinases bactériennes : *Streptomyces coelicolor* A3 (2) et *Streptomyces griseus* HUT 6037 (Kezuka et al. 2006; Hoell et al. 2006).

Récemment, la séquence complète du génome de *Nosema bombycis* a été rapportée par Han *et al.* (2015), à partir duquel le gène *NBO_41 g0043* d'une endochitinase a été identifié et classé comme membre de la famille GH19 (Han *et al.* 2016a).

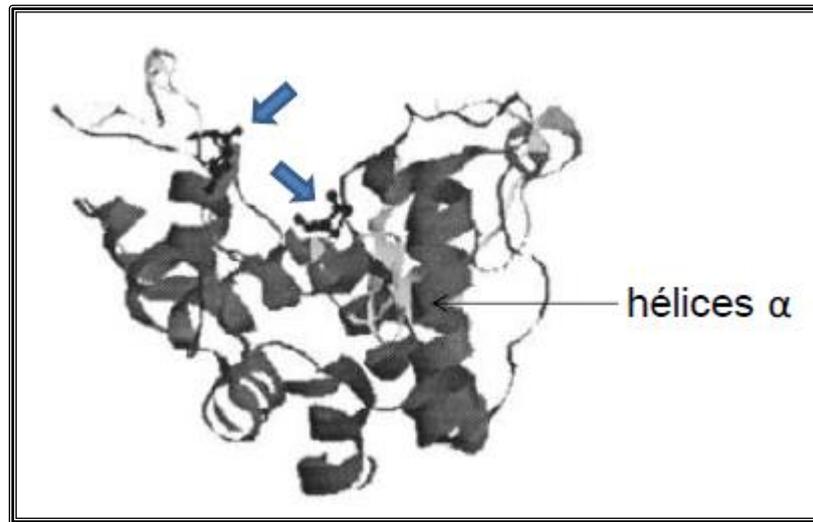


Figure 8 : Structure tridimensionnelle des chitinases de la famille 19 des glycosides hydrolases (exemple d'une chitinase de classe II) (modifié d'après Neuhaus, 1999). Le site catalytique est composé de deux régions représentées par les flèches bleues.

<i>Streptomyces griseus</i> (Uniprot : O50152)	VKKREAAAF LANVSH ETGGLFYIK EVNE
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Uniprot : O23248)	DSRREIAAFFAHVTHE TGRNFCYIE EID
<i>Vitis vinifera</i> CHI4D (AF532966)	ANKREIAAFFAHVTHE TGHFCYIE EING
<i>Nicotiana tabacum</i> (Uniprot: A1IJ67)	DSKREIAAFFAHVTHE TGHMCFINE ING

Figure 9 : Signature spécifique de la famille 19 des glycosides hydrolases. Les séquences conservées qui jouent un rôle clé dans le mécanisme catalytique sont représentées en rouge (Robertus and Monzingo 1999).

2.2.3. Les chitinases de la famille 23

Ces chitinases possèdent une structure tridimensionnelle similaire à celle de la famille 19 (composée principalement d'hélices α). À ce jour, une seule chitinase GH23 a été identifiée chez les bactéries (Ueda *et al.* 2009). Cette enzyme a été isolée à partir de *Ralstonia* sp. A-471 et comprend un domaine de liaison N-terminal Chitin-Binding lié à un domaine catalytique C-terminal qui présente une homologie au lysozyme type-oie (goose-type). Le gène codant pour cette enzyme semble être acquis par transfert horizontal de gènes (Ueda *et al.* 2009).

2.2.4. Les chitinases de la famille 48

Les enzymes de la famille GH48 possèdent une structure en tonneau (α/α)₆ caractérisée par six hélices centrales entourées de 6 autres hélices externes (Yennamalli *et al.*

2011). Une seule chitinase GH48 a été mise en évidence chez le scarabée *Gastrophysa atrocyanea* (Adrangi and Faramarzi 2013).

3. Rôle des chitinases

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.

3.1. Chitinases et microorganismes

Les chitinases sont présentes chez de nombreux microorganismes eux-mêmes dépourvus de chitine, mais pour lesquels la chitine constitue une source de nutriments. Ainsi, les bactéries chitinolytiques marines, d'eau douce ou du sol produisent des chitinases qui participent à la biodégradation et au recyclage des chitines produites annuellement dans leur écosystème respectif.

Les chitinases bactériennes sont également impliquées dans des processus digestifs (Cohen-Kupiec and Chet 1998; Patil et al. 2000). En effet, les bactéries du genre *Streptomyces* produisent des enzymes chitinolytiques qui favorisent leur adhésion au substrat et la pénétration de leur hôte (Charpentier and Percheron 1983; Schrempf 2001) au niveau des lésions formées sur l'exosquelette des arthropodes. *Streptomyces griseus* HUT6037, qui possède une chitinase de la famille GH 19, présente également une activité antifongique (Itoh et al. 2002, 2003).

Certaines chitinases bactériennes facilitent également la dégradation de la chitine du puparium de certains insectes, favorisant ainsi l'émergence des adultes (Iverson et al. 1984). Aussi, les chitinases produites par les bactéries de la microflore intestinale de nombreux animaux (poissons, oiseaux, ...) facilitent les processus de digestion des aliments composés de chitine.

Des gènes de chitinase ont également été identifiés dans le génome du baculovirus *Autographa californica*, inféodé aux arthropodes (Hawtin et al. 1995). Chez ce baculovirus, les chitinases jouent un rôle crucial dans les processus d'infection virale, plus particulièrement lors des phases de pénétration du virus dans l'organisme attaqué (Thomas et al. 2000, 2002). Cette chitinase virale entraîne une liquéfaction des tissus du lépidoptère *Trichoplusia ni* infecté (Hawtin et al. 1997).

De nombreux protozoaires et métazoaires parasites des tractus digestifs présentent la capacité de synthétiser des chitinases. Parmi ces parasites, on trouve des filaires, des amibes,

des trypanosomes, des plasmodiums (Huber et al. 1991)). Chacun de ces microorganismes utilise la chitine et les chitinases différemment et spécifiquement selon le stade de son développement (Shahabuddin et al. 1993). Les chitinases produites par les procaryotes facilitent les processus de colonisation de leurs insectes hôtes qui leur servent de vecteurs.

3.2. Chitinases fongiques

Les chitinases fongiques possèdent de multiples fonctions. Comme les chitinases bactériennes, elles participent largement au métabolisme trophique et sont également impliquées dans le développement, la morphogenèse et lors d'interactions symbiotiques et d'infestations parasitaires (Cohen-Kupiec and Chet 1998). La chitine est un composé des parois cellulaires des champignons filamenteux. Les chitinases sont donc produites à différents stades de leur croissance. Ainsi, les chitinases sont impliquées dans la séparation et la germination des spores. Les hyphes mycéliens possédant une structure rigide, les chitinases permettent de remodeler la chitine des parois fongiques lors de la croissance et du développement, mais aussi lors de stress hydriques (Gooday et al. 1992; Langner and Göhre 2016). Les champignons pathogènes utilisent leurs chitinases pour faciliter leur pénétration dans l'hôte ou pour en exploiter les sucres et acides aminés issus de la dégradation des cuticules. C'est notamment le cas de champignons pathogènes des œufs de nématodes (Dackman et al. 1989), mais aussi des champignons entomopathogènes des genres *Beauveria*, *Metarhizium* et *Verticillium* (El-Sayed et al. 1989; Leger et al. 1991).

Chez les levures, les chitinases sont impliquées dans le bourgeonnement des cellules filles et leur séparation des cellules mères (Passonneau and Williams 1953; Elango et al. 1982; Kuranda and Robbins 1991; Latge and Boucias 2014; Khan et al. 2015).

3.3. Chitinases végétales

Bien que la présence de chitine n'ait jamais été mise en évidence chez les plantes, les chitinases végétales possèdent toutefois des substrats végétaux qui les impliquent dans de nombreux processus physiologiques (croissance, floraison, maturation des fruits). Les chitinases végétales peuvent être synthétisées dans certains organes ou durant différentes étapes des cycles végétatif ou reproductif de la plante. Ainsi, elles sont exprimées de façon constitutive dans de nombreux organes, tels que les feuilles (Ancillo et al. 1999), les fleurs (Takakura et al. 2000), les graines (Domon et al. 2000; Passarinho et al. 2001), les fruits (Peumans 2002) et les racines (Passarinho et al. 2001; Showalter 2001). Les chitinases végétales interviendraient notamment dans les événements précoces de l'embryogenèse et la

germination des graines (Helleboid et al. 2000; Van Hengel et al. 2002). Au niveau racinaire, les chitinases végétales favorisent la pénétration des hyphes mycéliens et le développement des interactions symbiotiques avec des champignons mycorhiziens en hydrolysant la chitine fongique (Salzer et al. 2000). Plusieurs travaux rapportent la présence de résidus N-acétylglucosamine dans les parois secondaires de diverses espèces de plantes (Benhamou and Asselin 1989). Ces composés seraient susceptibles d'agir en tant qu'éliciteurs dans des processus de reconnaissance entre végétaux et symbiotes. Ainsi, la dégradation de lipochitooligosaccharides (facteurs Nod) (Spaink et al. 1993; Schmidt et al. 1993) et de peptidoglycanes bactériens par les chitinases végétales favorisent les interactions entre des bactéries de type rhizobium fixatrices d'azote et de nombreuses légumineuses (Goormachtig et al. 1998). Enfin, les plantes carnivores produisent des chitinases qui aident à la digestion de leurs proies (Gooday 1990b).

Les chitinases végétales présentent essentiellement des propriétés antifongiques. Les activités chitinolytiques peuvent être augmentées d'un facteur 600 (van Hengel et al. 1998) suite à une attaque par un champignon pathogène. Les chitinases lysent la paroi des hyphes mycéliens et inhibent la germination des spores chez divers champignons tels que *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma* et *Rhizoctonia* (Schickler and Chet 1997; Taira et al. 2002).

3.4. Chitinases animales

Les chitinases ont été mises en évidence chez de nombreux animaux invertébrés et vertébrés, y compris chez les mammifères (Ohno et al. 2013, 2016). De nombreuses chitinases sont impliquées dans des processus digestifs (Suzuki et al. 2002b). Les chitinases salivaires de poulpe mais aussi les chitinases d'araignées facilitent la pénétration des cuticules de leurs hôtes ou proies (Krishnan et al. 1994; Jones et al. 1996). Dans le tractus alimentaire des poissons (Flach et al. 1992; Kakizaki et al. 2015) des oiseaux (Jackson and Place 1992) et des mammifères insectivores, les chitinases dégradent la cuticule des proies ingérées. Les chitinases sont également impliquées dans des processus de défenses comme chez le turbot, où elles joueraient un rôle contre certains parasites tels que les microsporidies (Manson et al. 1992). Chez les animaux, les chitinases pourraient également jouer un rôle défensif contre certains champignons pathogènes (Boot et al. 1995; Gooday 1999; Carlini and Grossi-de-Sá 2002). Enfin, chez l'homme, les chitinases sériques et leucocytaires, sécrétées en grande quantité par les monocytes lors de leur différenciation en macrophages (Escott and Adams 1995) chez des patients atteints de la maladie de Gaucher (Boot et al. 1995).

3.5. Insectes et chitinases

Chez les arthropodes et les insectes en particulier, la chitine est présente au niveau des cuticules et fréquemment dans la membrane péritrophique. Les enzymes chitinolytiques sont impliquées dans le déroulement de certaines fonctions vitales telles que les processus de morphogénèse, développementaux et digestifs et participent au remodelage de ces structures cuticulaires (Merzendorfer and Zimoch 2003; Merzendorfer 2006).

4. Propriétés physico-chimiques de quelques chitinases de microorganismes.

Les chitinases possèdent diverses propriétés physico-chimiques qui peuvent être liées à l'écosystème dans lequel croissent ces microorganismes (terrestre/marin, température, pH...).

Les chitinases bactériennes et fongiques possèdent une masse molaire variant entre 30 et 120 kDa (Iverson et al. 1984; Jeuniaux 1963), et sont actives dans un large intervalle de température et de pH. Par exemple, Les chitinases de *Bacillus licheniformis* résistent à une température élevée de 80 °C (Keyhani and Roseman 1999; Kim et al. 2003), les endochitinases de *Streptomyces violaceusniger* (Shekhar et al. 2006) et la chitinase thermostable de *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (Tsujibo et al. 1993) ont des températures optimales d'action de 28 °C et de ~80 °C, respectivement. Cette dernière enzyme est active à un pH optimum compris entre 8,0 et 10,0 (Tsujibo et al. 1993), alors que la chitinase isolée de *Stenotrophomonas maltophilia* C3 a un pH optimum compris entre 4,5 et 5,0 (Zhang et al. 2001). Le point isoélectrique chez les chitinases des microorganismes varie de 3,5 à 8,8. Toutefois, les chitinases acides et basiques sont souvent présentes dans le même organisme.

Les chitinases sont de manière générale inhibées par Hg^{2+} et Ag^+ . Par contre le Cu^{2+} peut soit inhiber la production de chitinases ou au contraire induire une activité plus élevée en sa présence. Cette induction de l'activité par le Cu^{2+} a été trouvée chez les poissons (Kono et al. 1990) et les microorganismes tels que *Pseudomonas aeruginosa* (Wang and Chang 1997). Les allosamidines (décrites ultérieurement) et leurs dérivés inhibent les chitinases de microorganismes tels que *Piromyces communis* (Sakurada et al. 1996), *Streptomyces* sp. (Wang et al. 1993; Suzuki et al. 2006; Sakuda et al. 2013) et *Streptomyces olivaceoviridis* (Romaguera et al. 1993). Toutefois, les allosamidines et leurs dérivés inhibent seulement les chitinases appartenant à la famille GH18 et n'inhibent pas celles de la famille GH19.

L'allosamidine est un inhibiteur compétitif des chitinases, c'est un pseudo-trisaccharide découvert par Sakuda *et al.* (1987) et isolé à partir de bactéries du genre *Streptomyces* (Sakuda et al. 1987). Une puissante activité inhibitrice est décrite contre les chitinases de la famille GH18, dont celles des insectes et des champignons mais pas contre les chitinases de la famille GH19 (Debnath et al. 2013). L'allosamidine est constituée de deux groupements *N*-acétylallosamine (figure 10) liés à une allosamizoline et présente une structure analogue à celle de la chitine mais qui n'est pas hydrolysable (Bortone et al. 2002; Fusetti 2002; Rao et al. 2003). L'allosamidine mime un état transitoire de la catalyse de la chitine. Le mode d'interaction entre les chitinases de la famille GH18 et cet inhibiteur a été mis en évidence par cristallographie (Van Aalten et al. 2001).

L'allosamidine possède des propriétés antifongiques dirigées contre des champignons pathogènes tels que *Candida albicans* et *Neurospora crassa* (Dickinson et al. 1991; McNab and Glover 1991). L'allosamidine inhibe également la fragmentation des hyphes de *Acremonium chrysogenum* (Sandor et al. 1998) et de *Penicillium chrysogenum* (Sámi et al. 2001). Chez le crustacé *Artemia salina*, il est non seulement capable d'inhiber l'activité chitinolytique, mais aurait également un effet activateur sur les chitines synthèses (Peter and Schweikart 1990).

Enfin, Suzuki *et al.* (2006) ont montré que l'allosamidine est capable d'induire la production de chitinases et de favoriser la croissance chez *Streptomyces sp.* AJ9463 en agissant comme molécule signal pour la production de chitinases (Suzuki et al. 2006).

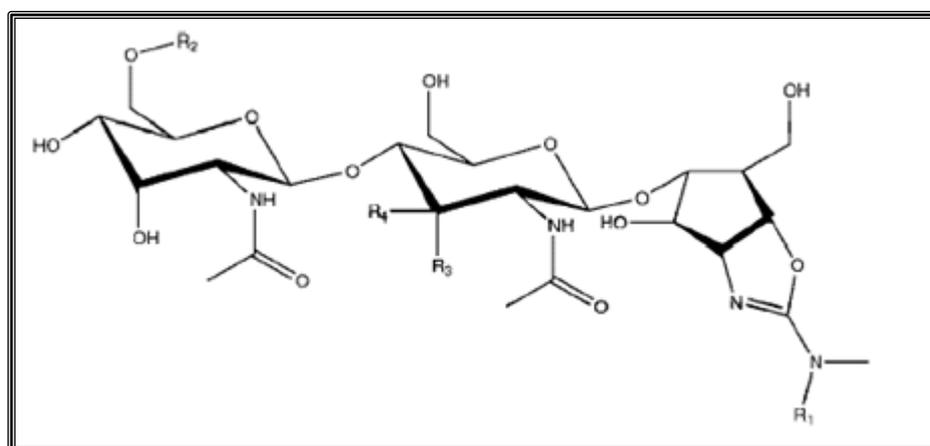


Figure 10 : Structure de l'allosamidine (Sakuda et al. 1987).

5. Multiplicité dans le système chitinolytique

Les organismes qui dégradent la chitine possèdent généralement de complexes systèmes chitinolytiques co-régulés, présentant une grande multiplicité de chitinases et chitosanases qui agissent en synergie avec des chitin-binding protéines (CBPs), ce qui leur permet de dégrader efficacement les formes les plus résistantes de chitines cristallines afin de l'utiliser comme source de carbone et d'azote. *Streptomyces coelicolor* A3 (2) possède 11 et 2 chitinases appartenant aux familles GH18 et GH19 respectivement (Saito et al. 1999, 2000; Bentley et al. 2002; Kawase et al. 2006; Nazari et al. 2011, 2013). Tandis que *Photobacterium sp.* et *Vibrio angustum* ont 8 chitinases différentes chacune (Hunt et al. 2008; Karlsson and Stenlid 2009).

Selon la disponibilité des sources de chitine, différents ensembles d'enzymes sont impliquées dans sa dégradation. On a démontré l'action synergique du système chitinolytique chez *S. coelicolor* A3 (2) et *Aeromonas sp.* O-7. Dans le cas d'*Aeromonas sp.* O-7, elle dispose de 4 chitinases, dont 3 présentent une activité contre la chitine en poudre, le glycol ou la chitine colloïdale, et une chitinase qui est adaptée au froid. En combinaison, l'activité chitinolytiques est 2 fois plus élevée que l'activité combinée des enzymes individuelles contre le même substrat (Orikoshi et al. 2005; Kawase et al. 2006; Bai et al. 2016). Les CBP sont de petites protéines extracellulaires qui contiennent des domaines de liaison à la chitine. On pense qu'elles ont un rôle de médiation entre l'organisme chitinolytiques et les diverses sources de chitine, comme l' α -chitine dans les parois fongiques et la coquille de crabe, la β -chitine, le chitosane, ou encore la cellulose (Schnellmann et al. 1994; Schrempf 2001; Manjeet et al. 2013). Les mécanismes précis par lesquels les CBPs augmenteraient la dégradation de la chitine restent encore mal connus.

Suzuki *et al.*, (2002) ont rapporté l'action synergique des chitinases *Chi A*, *Chi B*, et *Chi C1* de *Serratia marcescens* 2170 sur la dégradation de la chitine (Suzuki et al. 2002a). Ils ont proposé que, malgré des domaines catalytiques similaires, *Chi A* et *Chi B* clivent les chaînes de chitine dans des sens opposés. La *Chi A* peut dégrader la chaîne de chitine à partir de l'extrémité réductrice, alors que la *Chi B*, à partir de l'extrémité non réductrice. Un troisième gène de chitinase *Chi C* de *Clostridium paraputrificum* M-21 a été caractérisé par (Morimoto et al. 2006). Ce gène code 683 acides aminés (peptide signal inclus).

6. Les actinobactéries productrices de chitinases

6.1. Généralités

Les actinobactéries filamenteuses sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, c'est à dire des filaments qui irradient, par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance. Elles présentent un cycle biologique semblable à celui de certains champignons, mais leur structure procaryotique, sans noyau distinct, les classe parmi les bactéries. En effet, leurs parois ne renferment ni cellulose ni chitine (Kikani et al. 2010) mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives). Le diamètre de leurs mycéliums est plus petit que la plupart des hyphes fongiques (généralement 0,7 à 0,8 μm). Enfin, elles sont sensibles aux antibiotiques antibactériens (Rangaswami and Bagyaraj 2004; Koneman 2006), aux attaques des bactériophages et des lysozymes (Hawker and Linton 1971).

Les actinobactéries sont des bactéries à coloration de Gram positif (Djigal 2003), dont le GC % est compris entre 60-70 % (Pelmont 2005), formant des filaments minces et ramifiés qui, lorsqu'ils évoluent sur un substrat solide, comme de la gélose, se développent à la fois sur la surface et à l'intérieur de celle-ci (Prescott 2010). Elles ont une croissance lente par rapport aux autres bactéries, le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Beckers and van der Hoeven 1982). Leur cycle de vie est caractérisé par différents stades de croissance dont les caractéristiques sont propres à chaque espèce, ce qui amène une grande diversité morphologique. Sur milieu solide, il y aura d'abord la germination d'une spore. Le tube germinatif en croissance se subdivisera en mycélium branché pour former un mycélium végétatif basal. En réponse à une limitation de nutriments, à un stress physiologique et/ou à la densité cellulaire, la colonie en formation subira plusieurs changements tels que l'émergence d'un mycélium aérien dont les extrémités se différencieront en chaînes de spores (figure 11) (Kieser et al. 2000). Ainsi, la composition du milieu de culture va influencer la morphologie de la colonie actinobactérienne.

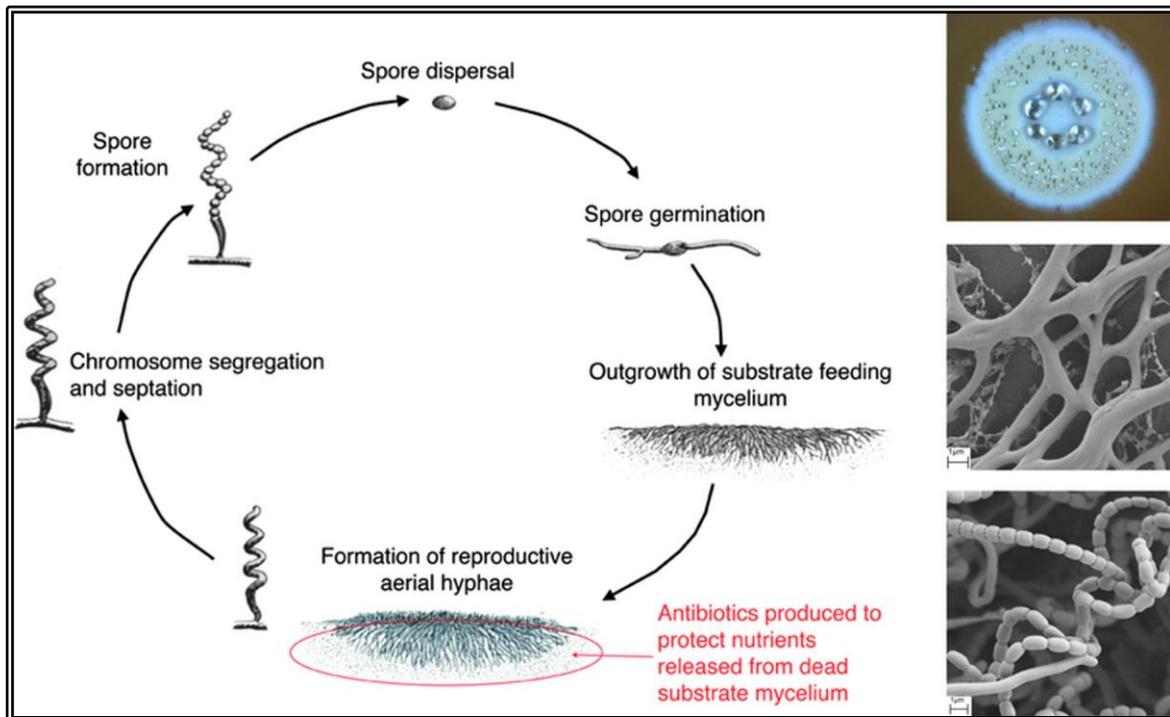


Figure 11 : Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide (Breton *et al.*, 1989).

Le mode de vie des actinobactéries est en grande partie lié aux nombreuses activités biologiques de leurs métabolites secondaires. Ceux-ci peuvent avoir notamment une action antibiotique, antitumorale, antifongique, antiparasitique, herbicide ou encore insecticide (Kieser *et al.* 2000). Environ 65% de tous les antibiotiques connus sont produits par des actinobactéries filamenteuses dont la majorité appartient au genre *Streptomyces* (Hopwood 2007). Il est admis que la production de ces métabolites dans le milieu de culture est étroitement liée à la phase de croissance et au cycle de différenciation cellulaire. Selon le composé métabolique produit, d'autres mécanismes de régulation peuvent s'y additionner, tel qu'un stress physiologique ou une répression catabolique et peuvent rendre le mécanisme de production plus complexe (Kieser *et al.* 2000). La production d'enzymes extracellulaires peut aussi être liée à la phase de croissance, mais est surtout liée à la présence de molécules inductrices dans l'environnement. Ces petites molécules assimilables sont souvent des produits issus de l'hydrolyse du composé organique ciblé par l'enzyme d'intérêt (Burke and Cairney 2002; Baldrian 2009; van Wezel *et al.* 2009). Ces inducteurs vont agir au niveau de régulateurs spécifiques de la transcription. De plus, la production d'enzymes hydrolytiques ayant pour cible un polysaccharide est communément régulée par la répression catabolique qui réprime la production de protéines nécessaires à l'utilisation de sources de carbone secondaires tant que la source principale est disponible (Kieser *et al.* 2000). Cette régulation

permet une utilisation économique des ressources énergétiques disponibles selon les capacités métaboliques du microorganisme (Brückner and Titgemeyer 2002).

6.2.ç Classification des actinomycètes

6.2.1. Généralités

La taxonomie est une science ayant pour objectif de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons (familles, genres, espèces, etc.) afin de pouvoir les nommer et les classer. Chez les bactéries, les taxons sont dans l'ordre hiérarchique : divisions, classes, sous-classes, ordres, familles, sous-familles, tribus, sous-tribus, genres, sous-genres, espèces et sous-espèces. Cependant parmi ces rangs hiérarchiques, certains sont très peu utilisés. Par conséquent, pour une bactérie donnée on peut attribuer des rangs et pas d'autres.

6.2.2. Critères d'identification des actinobactéries

La définition des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques, fonctionnels, chimiotaxonomiques et génomiques. L'ensemble des caractéristiques de chaque taxon bactérien est répertorié dans le manuel Bergey, un ouvrage de référence pour la taxinomie des bactéries, qui comprend un volume en deux parties dédiées aux Actinobacteria (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (Goodfellow et al. 2012). Différentes approches taxinomiques sont utilisées pour la classification des bactéries :

6.2.2.1. Taxinomie phénétique

Depuis la classification proposée par Cohn en 1875 et jusqu'au début des années 1960, la définition d'une espèce (et d'une manière générale toute la taxinomie bactérienne) reposait sur une classification phénétique ou phénotypique (Cohn 1872). Cette dernière utilise un faible nombre de caractères considérés comme importants tels que la morphologie, la présence de spores, la mise en évidence d'un caractère biochimique jugé essentiel, l'habitat, le pouvoir pathogène... Une classification phénétique a l'inconvénient de ne refléter qu'une quantité d'information réduite.

L'étude morphologique des actinobactéries se base essentiellement sur la présence ou l'absence du mycélium de substrat et du mycélium aérien, la couleur du mycélium, la production et la couleur des pigments diffusibles, la production de pigments mélanoïdes et la structure et la forme des spores.

La plupart des actinobactéries présentent un mycélium de substrat et un mycélium aérien. Certaines actinobactéries comme les *Micromonosporaceae* sont dépourvues de mycélium aérien et ne présentent que le mycélium de substrat.

Toutes les actinobactéries forment un mycélium de substrat, sauf le genre *Sporichthya* qui présente un mycélium aérien qui se fixe au milieu de culture par des crampons. Les *Nocardiformes* ont la particularité d'avoir un mycélium de substrat qui se fragmente (Prauser 1981).

Aussi, les spores représentent un critère fondamental dans la taxinomie des actinobactéries (Locci and Sharples 1984). Chez les genres *Micropolyspora* et *Micromonospora* et les thermoactinomycètes, la formation des spores se fait directement sur le mycélium de substrat (Cross et Goodfellow, 1973). Chez les *Streptomyces*, les spores surmontent le mycélium aérien. Les spores mobiles caractérisent le groupe des *Actinoplanes* et *Actinosynnema*, alors que *Thermoactinomyces* présente des endospores uniques thermorésistantes (Cross and Goodfellow 1973; Qin et al. 2016). Les spores flagellées caractérisent les *Oerskovia sp.*.

Le nombre de spores est aussi un caractère de classification important, ainsi *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* et *Promicromonospora* ne produisent que des spores isolées, *Microbispora* produit des spores en paires longitudinales. *Actinomadura*, *Sporichthya*, et certaines *Nocardia* présentent des chaînes de spores très courtes (inférieures à 20) alors que *Streptomyces*, *Nocardoides*, *Streptoverticillium* et certaines *Nocardia* sont caractérisés par la présence de longues chaînes de spores. Les chaînes de spores du genre *Streptomyces* sont soit droites (type Rectis), sinuées (type Rectiflexibilis) ou spiralées (types Spirales), alors que le genre *Streptoverticillium* présente des chaînes de spores en verticilles. Certains actinomycètes présentent des sclérotés (genre *Chainia*) ou des synnemas (*Actinosynnema*) ou des vésicules qui contiennent des spores (*Frankia*) ou dépourvues de spores (*Intrasporangium*). Les sporanges caractérisent les genres *Actinoplanes*, *Ampulariella*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Dactylosporangium* et *Streptosporangium*.

6.2.2.2. Taxinomie numérique

En 1957, Sneath développe une taxinomie qualifiée de numérique pour les bactéries. La méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, structuraux... et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère) (Sneath 1957). Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude les individus les plus semblables (Sneath 1957; Stuessy and Hörandl 2014).

6.2.2.3. Taxinomie phylogénétique

Dès 1936, Kluver et van Niel proposaient l'utilisation d'une taxinomie phylogénétique (Kluver and van Niel 1936), mais les outils nécessaires au développement d'une telle taxinomie n'étaient pas disponibles et il fallut attendre la deuxième moitié du 20^{ème} siècle pour qu'elle commence à se mettre en place.

La biologie moléculaire s'est imposée comme un outil puissant et incontournable en taxinomie. Actuellement, il n'est plus possible de proposer une nouvelle espèce sans effectuer des analyses génétiques. Les principales analyses moléculaires utilisées pour la détermination des espèces sont le séquençage de l'ADN ribosomal 16S (figure 12) et l'hybridation ADN-ADN. Le pourcentage G+C n'est obligatoirement demandé que lors d'une proposition de nouveaux genres.

Aussi, il existe d'autres méthodes d'analyses moléculaires dites « techniques d'empreintes génétiques ou encore de fingerprint », telle que la DGGE, RAPD, l'AFLP, la rep-PCR et la BOX. Elles sont utilisées dans le génotypage où elles permettent de façon rapide et hautement discriminante de caractériser et comparer des souches entre elles.

✓ Détermination du % G+C

En 1950, Chargaff *et al.*, montrent que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier, mais qu'il était relativement constant pour les individus d'une même espèce (Chargaff et al. 1950). Chez les bactéries, les valeurs du % G+C sont très dispersées et elles varient entre 60-70 % (Pelmont 2005). Actuellement, on admet que des bactéries dont le % G+C diffère de plus de 5 % ne peuvent appartenir à une même espèce et que des bactéries dont le % G+C diffère de plus de 10 % ne peuvent appartenir à un même genre. Toutefois, il faut être prudent, car différents groupes taxonomiques peuvent avoir le même % G+C (Kirk et al. 2004).

✓ Etude des ARNr

Cette approche est basée sur l'analyse de séquences amplifiées par PCR (réaction de polymérisation en chaîne). Les séquences les plus souvent ciblées par la PCR sont les gènes de l'opéron ribosomal, et plus particulièrement le gène codant pour l'ARNr 16S pour les procaryotes et l'ARNr 18S pour les eucaryotes. Les travaux de Carl Woese (1987) ont véritablement révolutionné la taxinomie et l'écologie microbienne. Ils ont démontré que les séquences d'ARN ribosomiaux (ARNr) sont des marqueurs évolutifs robustes permettant de déchiffrer la phylogénie et l'évolution des populations microbiennes au cours du temps. Les ARNr sont des molécules ayant évolué plus lentement que le reste du génome et constituent de ce fait une horloge moléculaire lente (Woese 1987). Le gène de l'ARNr 16S a l'avantage

d'être constitué d'une mosaïque de domaines hautement conservés (ayant peu évolué au cours du temps) et de domaines variables, mais aussi de présenter une taille d'environ 1500 nucléotides aisément séquençable. Ces régions hautement conservées servent de cibles pour des amorces dites "universelles" servant à l'amplification *in vitro* par PCR puis au séquençage. Aujourd'hui, la majorité des études de diversité des bactéries s'effectue seulement sur la base des séquences d'ARNr 16S. Quand l'ARNr 16S est utilisé pour identifier et classer les *Bacteria* et les *Archaea*, le terme d'UTO désignant l'Unité Taxonomique Opérationnelle est alors employé (OTU en anglais). Les UTOs basées sur l'identification des ARNr 16S permettent de définir une catégorie proche du rang taxonomique de l'espèce si le degré d'identité est au moins de 97%.

Pour Stackebrandt et Goebel 1994, lorsqu'il existe moins de 97% de similarité entre les séquences des ARNr 16S de deux souches, ces souches appartiennent à des espèces différentes. Par contre, si le pourcentage de similarité est égal ou supérieur à 97 %, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN-ADN.

✓ Hybridations ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN est une méthode qui permet d'estimer le degré de parenté entre deux microorganismes. Elle s'est avérée appropriée pour déterminer les relations entre des taxons étroitement liés, tels que les espèces (Stackebrandt and Goebel 1994).

Sa réalisation n'a été possible qu'après la découverte par Marmur (1961) du phénomène de renaturation de l'ADN (Marmur and Doty 1961). Les hybridations ADN-ADN, utilisées en bactériologie, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. En fonction des similitudes de séquences, deux types de duplex hétérologues peuvent se former : Si les ADN des deux bactéries présentent des similarités importantes, il se produit d'abord un appariement étroit au niveau d'un segment qui porte des bases complémentaires (site de nucléation), puis le duplex se complète de proche en proche. Si les ADN des deux bactéries ont des séquences très différentes, il peut se produire un appariement au niveau de quelques bases complémentaires situées dans une zone limitée, mais le reste des fragments ne s'associe pas ou seulement par quelques liaisons hydrogène éparses.

Les souches appartenant à la même espèce auront généralement plus de 70 % d'homologie ADN-ADN (Stackebrandt and Goebel 1994). Malgré que l'hybridation ADN-ADN est une technique utile dans l'identification des espèces du genre *Streptomyces* (Labeda 1992; Hatano 2003; Rong and Huang 2010), elle ne devrait pas être employée seule, en raison

de l'instabilité du génome de ces dernières, mais en combinaison avec d'autres techniques (Anderson and Wellington 2001).

✓ Méthodes d'empreintes génétiques

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) est une technique d'empreinte moléculaire qui donne une image de la diversité des communautés microbiennes. Elle permet d'évaluer et de comparer la diversité microbienne sur la base du génotype. Elle est basée sur la séparation des fragments d'ADN de taille identique amplifiés par PCR, selon leurs propriétés de fusion par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Plusieurs organismes, eucaryotes et procaryotes, possèdent de courtes séquences répétées (1-10 pb) le long de leur génome. Ces séquences sont appelées « REP » pour Repetitive Extragenic Palindrome, « ERIC » pour Enterobacterial Repetitive Intergenic consensus et BOX (154 pb). Leur position sur le génome est variable selon les espèces et les souches (Tiedje et al. 1999). De ce fait, trois méthodes basées sur l'amplification de ces séquences appelées Rep-PCR, Eric-PCR et Box-PCR sont utilisées dans la discrimination des souches et des espèces entre elles.

6.2.3. L'Ordre des Actinomycétales

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes et sont rattachés à l'Ordre des *Actinomycétales* créé par Buchanan en 1917 (Buchanan 1917). Plusieurs réévaluations systématiques récentes de l'ordre reflètent l'intégration de données moléculaires notamment la séquence du gène ARNr 16S. Actuellement, le phylum Actinobacteria tel qu'il figure dans le Bergey's manual (2012) renferme une seule classe : Actinobacteria, cette classe est subdivisée en 5 sous classe, 6 ordres, 13 sous ordre (dont 9 appartiennent à l'ordre des Actinomycétales), 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces (figure 12).

Tous les membres de cet ordre sont caractérisés par leur grande teneur en %G+C allant de 51% chez certaines Corynebactéries, à plus de 70% chez les genres *Streptomyces* et *Frankia*, (Ventura et al. 2007; Hiltner et al. 2015) et présentent une grande différenciation quant au développement de leur cycle de vie.

L'ordre des *Actinomycétales* comprend des genres d'une grande variabilité morphologique, allant de la forme cocci (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia*, *Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, etc.) (Oskay et al. 2004; Srivibool and Sukchotiratana 2006; Cheah et al. 2015).

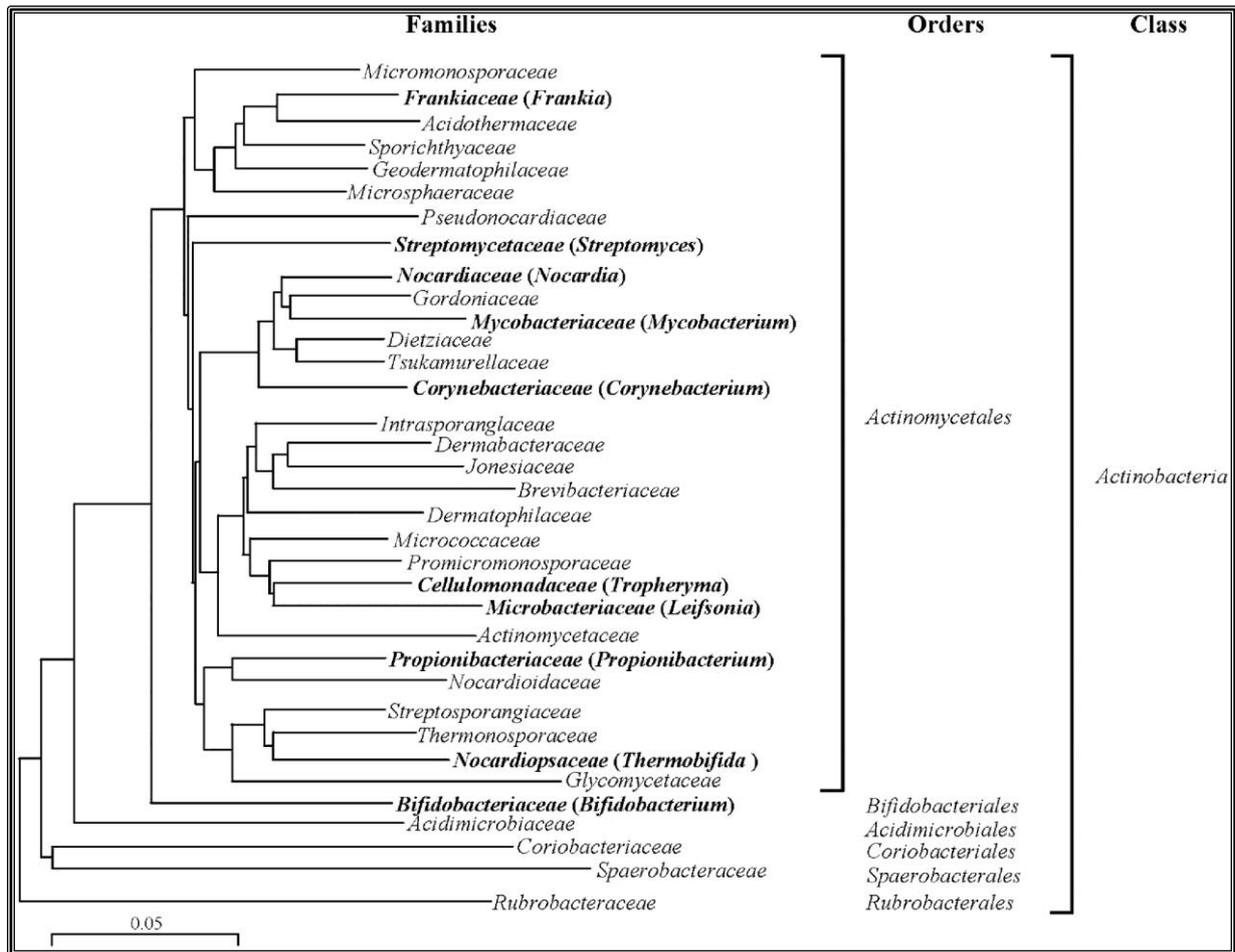


Figure 12 : Classification du phylum des Actinobactéria basée sur des données de séquençage de l'ARNr 16S. La barre représente 5 substitutions de nucléotides par 100 nucléotides. Les familles contenant des membres soumis au séquençage complet du génome sont représentées en gras (Zhi et al. 2009).

6.3. Distribution et Rôle écologique des actinobactéries

Les actinobactéries constituent une large partie des microorganismes de la rhizosphère et ont pour fonction écologique de décomposer des substances organiques au sein des écosystèmes. Elles colonisent une large variété d'habitats naturels (tableau 4) et sont capables de se développer sur une large gamme de substrats. Elles sont présentes dans des sols polaires gelés en permanence tout comme dans les sols désertiques chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec les métaux lourds les sols et les grottes naturelles (Moncheva et al. 2002).

Tableau 4 : Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (d'après Goodfellow et Williams, 1983).

Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplane</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbiospora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, Eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, Eau, Fumier, Litière, Matière en décomposition
<i>Saccharomonospora</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Streptomyces</i>	Sol et Eau
<i>Streptosporangium</i>	Matière en décomposition et en fermentation
<i>Salinispora tropica</i>	Fonds marins

Certaines souches d'actinobactéries ont été retrouvées dans des environnements marins (Imada et al. 2007; Jensen et al. 2015), dans des sédiments situés à plus de 4000 m de profondeur (Khattabi et al. 2002), tel que les actinobactéries du genre *Salinispora* (Jensen et al. 2015). Elles sont présentes dans les fonds fluviaux ou lacustres. La colonisation normale du milieu marin est un point controversé, selon les uns, il existerait une flore d'actinobactéries spécifique aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale faible ; selon d'autres, les actinobactéries isolés de ces milieux correspondraient à des souches terricoles adaptées à la salinité marine (Larpen and Sanglier 1989). Les actinobactéries sont également présentes dans les lacs extrêmement alcalins, les lacs salés, en revanche il semblerait qu'ils sont absents dans les eaux minières très acides (pH <1) et les sources thermales très chaudes d'origine volcaniques (Lechevalier and Lechevalier 1981).

Contrairement aux bactéries et aux champignons, seules quelques espèces d'actinobactéries sont pathogènes (Badji et al. 2006). Des exemples d'espèces endophytiques et phytopathogènes ont été répertoriées, les meilleurs exemples : *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies* et *Streptomyces turgiscabies*, responsables de la gale de la pomme de terre (Coombs and Franco 2003). En pathologie humaine, plusieurs genres sont responsables d'infections ou d'actinomycoses. Certaines espèces du genre *Actinomyces* semblent avoir un rôle dans le développement des caries dentaires (Sarkonen et al. 2000). Le

genre *Nocardia* comprend aussi plusieurs espèces responsables de pathologies chez les animaux et chez l'Homme. Comme exemple *Nocardia asteroides*, responsable de la nocardiose humaine (Zhang 2003). D'autres espèces tels que *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*, agents de la tuberculose et de la lèpre, respectivement.

Certaines espèces d'actinobactéries semblent préférer certains habitats à d'autres. Par exemple, les *Thermoactinomyces* et les *Faenia* se trouvent dans les composts, les foins en fermentation et les condenseurs de réfrigérateurs et de climatiseurs ; Les *Actinoplanes* et les *Actinosynnema* se rencontrent dans les sols cultivés et sur les débris végétaux qu'on trouve aux bords des rivières et des lacs, les *Micromonospora* au fond des lacs et des réservoirs ; les *Streptosporangium* à la surface des sols forestiers, les *Microbispora* et les *Actinomadura* dans les sols cultivés. Des souches de *Nocardia* et *Streptomyces* ont été isolées à partir des graines et des ovules de 27 espèces de plantes (Mundt and Hinkle 1976; Truyens et al. 2015; Aydi Ben Abdallah et al. 2016). Une majorité d'actinobactéries sont saprophytes, mais il existe des formes parasites et symbiotiques des plantes ou des animaux (Goodfellow and Williams 1983; Sharma 2014).

Cette capacité de colonisation est d'une part attribuée à leur cycle de vie complexe qui permet une dispersion efficace et une survie en conditions environnementales défavorables, et d'autre part à la capacité de ces microorganismes à produire de nombreux métabolites secondaires et enzymes extracellulaires. Ces derniers, ayant des fonctions biologiques très diversifiées, vont permettre aux actinobactéries d'entrer en compétition avec les autres microorganismes, d'adhérer et de pénétrer la matière organique provenant de champignons, plantes et autres organismes et d'hydrolyser des molécules complexes pour acquérir des nutriments (Chater et al. 2010; Chater 2013).

6.3.1. Les actinomycètes du sol

Bien que les premières souches d'actinobactéries aient été isolées de sources humaines et animales par Cohn en 1875 et Nocard en 1888 respectivement. Le sol, à partir duquel les actinobactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes, en est le réservoir le plus riche (Larpent and Sanglier 1989; Xu et al. 1996; Lee and Hwang 2002; Kikani et al. 2010; Kanini et al. 2013). Il contient 10^4 à 10^7 UFC d'actinobactéries par gramme, représentant ainsi 1-20% ou même plus de la totalité de la flore bactérienne (Donadio et al. 2002; Busti 2006).

Comme beaucoup de microorganismes du sol, les actinobactéries se comportent comme des bactéries mésophiles en laboratoire, avec une croissance maximale à une température variant entre 25 et 30°C. Toutefois, il existe des souches thermophiles isolées à une température située entre 50 °C et 60 °C (Edwards 1993; Ilayaraja et al. 2014; Busarakam

et al. 2016; Liu et al. 2016). Dans les sols sahariens d'Algérie, les *Streptomyces* constituent entre 15 et 60 % de la totalité des microorganismes et peuvent même dépasser les 85 % dans les horizons profonds des sols des palmeraies (Sabaou et al. 1992).

En ce qui concerne le pH, la plupart des actinobactéries sont des bactéries neutrophiles, leur croissance est comprise entre pH 5 et 9 avec un maximum autour de la neutralité. Comme la plupart des sols sont acides, le pH constitue un facteur important influençant leur distribution et leur activité. Cependant, quelques *Streptomyces* sont acidophiles et croissent à des pH compris entre 3,5 et 6,5.

Les actinobactéries jouent un rôle prépondérant dans la fertilisation des sols (Kitouni 2007; Aouar et al. 2012). Elles ont un effet sur la structure du sol dans la liaison des particules argileuses grâce aux hyphes qui donnent une structure granuleuse viable ; ce qui améliore la production. Le système *Frankia*-plantes ligneuses fixe, globalement dans la biosphère, presque autant d'azote que le système *Rhizobium*-légumineuses. Les *Frankia* fixent aussi l'azote *in vitro*. Tandis que les *Rhizobium* ne le font *qu'in planta* (Normand et al. 2014).

6.4. Spécificité métaboliques, applications industrielles et biotechnologiques

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. En effet, la composition du milieu de culture influence les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires.

Pour découvrir de nouveaux composés ayant une bioactivité prometteuse, plusieurs méthodes onéreuses, comme la recherche de nouveaux microorganismes producteurs par criblage de différentes sources biologiques particulières, ont été utilisées (Mellouli et al. 2003; Miao et al. 2006; Busti 2006). Alternativement, une approche d'optimisation efficace des conditions de production de biomolécules à partir d'une souche sélectionnée peut être réalisée, à travers des études et des analyses des conditions physico-chimiques de la culture ainsi que la composition du milieu de croissance et de production. Il y a couramment une étroite relation entre le taux de croissance et le rendement maximal des métabolites secondaires biologiquement actifs. Le rendement des composés bioactifs est généralement augmenté suite à l'optimisation des facteurs chimiques (composition du milieu, précurseurs, inhibiteurs, oligoéléments, etc.) et physiques (température, pH, aération, etc.) pour la croissance microbienne.

Les *Streptomyces* sont les meilleurs candidats pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet, ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Peela et al. 2005). Plusieurs travaux ont été menés pour augmenter la production de métabolites d'intérêts à partir de ce genre bactérien, où l'implication et l'importance des conditions de culture de la bactérie sur la production du ou des métabolites recherchés a été démontrée (Miao et al. 2006; Eliasson Lantz 2014; Al-Dhabi et al. 2016). La différenciation morphologique des *Streptomyces* est accompagnée d'une différenciation métabolique. En effet, en milieu liquide et à la fin du cycle biologique, les *Streptomyces* produisent un grand nombre de métabolites secondaires possédant des structures chimiques et des activités biologiques très variées qui n'existent dans aucun autre genre bactérien.

Les *Streptomyces* produisent essentiellement la moitié des antibiotiques connus et plus de 70 % des antibiotiques produits industriellement. Cette diversité considérable de composés biologiquement actifs a pour conséquence la grande importance des *Streptomyces* dans l'industrie pharmaceutique puisque les molécules produites par fermentation sont la deuxième source de revenus de l'industrie biotechnologique (Thomson et al. 2004). Ces bactéries sont considérées comme le paradigme des microorganismes capables de synthétiser des molécules naturelles par le biais de leur métabolisme secondaire.

L'espoir que ces bactéries soient à nouveau une source majeure de découverte de nouveaux composés utiles est apparu suite au séquençage des génomes de plusieurs *Streptomyces* (Bentley et al. 2002; Ikeda et al. 2003). En effet, l'analyse fonctionnelle des gènes a révélé que les prédispositions génétiques de ces microorganismes à produire des métabolites secondaires étaient très sous-estimées. Ces bactéries possèdent en réalité un grand nombre de métabolites « cachés » ou « cryptiques ». Si on arrive à induire la production de ces métabolites cryptiques, il serait possible d'obtenir plusieurs nouvelles molécules d'intérêts thérapeutique et industriel.

Les actinobactéries sont aussi une grande source de molécules possédant des activités biologiques variées telles que des agents antitumoraux, des antiviraux, des immunosuppresseurs ou des inhibiteurs d'enzymes. Parmi les substances antitumorales isolées à partir de souches d'actinobactéries il y a la montanastatine produite par *Streptomyces anulatus*, la mitomycine de *Streptomyces lavendulae* et les bléomycines de *Streptomyces verticillus*. Il y a aussi la valinomycine qui est un antibiotique antinéoplasique (Pettit et al. 1999). Certains groupes d'actinobactéries sont capables de produire des molécules immunosuppressives et immunostimulantes (Trujillo et al. 1997; Petrosyan 2003; Savic et al.

2007; Petrossian 2012) tels que la brasilinolide A, appartenant à la classe des macrolides, qui possède une puissante activité immunosuppressive et antifongique et qui a été isolée à partir de la souche *Nocardia brasiliensis* (Hideyuki et al. 1996; Luo et al. 2014; Buchmann et al. 2016). Enfin, les invermictines produites par *Streptomyces avermitilis* ont montré des propriétés insecticides et anti-parasitaires (Demain 1999; Chen et al. 2009).

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants produits des actinobactéries (Donadio et al. 2002; Cavalcanti 2004). Certaines sont utilisées à cet effet dans le milieu industriel et en particulier dans le traitement des déchets et dans les composts. Ainsi, les glucosidases des actinobactéries thermophiles jouent un rôle important dans la dégradation d'une grande variété de polymères comme les lignocelluloses ou encore la chitine (Adhi et al. 1989; Gomes et al. 2000; Niladevi and Prema 2005; Pradeep et al. 2014; Musengi et al. 2014; Awad et al. 2014; Nguyen-Thi and Doucet 2016) et ils possèdent ainsi toute une variété d'enzymes intervenant dans ces dégradations: des chitinases, des endo-glucanases, des peroxydases, des cellulases (Grigorevski de Lima et al. 2005) ou encore des xylanases et des estérases (Rifaat et al. 2005). Les actinobactéries produisent de multiples protéases (Rifaat et al. 2006; Vonothini et al. 2008) qui peuvent ensuite trouver des applications dans l'industrie des détergents par exemple (Moreira et al. 2002). Les microorganismes producteurs de pectinases sont très importants vues leurs applications industrielles. En effet, elles sont utilisées dans l'extraction et la clarification des jus de fruit, le traitement du vin, l'extraction des huiles (Kashyap et al. 2001; Hoondal et al. 2002). De ce faite, une nouvelle souche de *Streptomyces lydicus* a été isolée et différentes activités pectinolytiques ont été étudiées (Jacob et al. 2008).

Certains actinobactéries sont également utilisés dans l'industrie alimentaire vues leurs vertus multiples. Ainsi les bactéries propioniques laitières sont les principaux agents de l'affinage des fromages à pâtes pressées cuites, type Emmental. Elles sont aussi utilisées pour la production d'acide propionique dans les industries pharmaceutiques et agroalimentaires. Cet acide propionique est utilisé en tant que conservateur et/ou antifongique pour des produits alimentaires ; il est utilisé comme base de solvant pour la synthèse de thermoplastique et comme base aromatique en cosmétologie etc. Enfin, en tant que bactéries « alimentaires », les bactéries propioniques sont intéressantes pour la production de vitamine B12 (Gautier et al. 1993; Freitas et al. 2015).

La sensibilité de la paroi des champignons aux enzymes lytiques a été exploitée en utilisant des bactéries produisant des chitinases pour le contrôle des champignons phytopathogènes dans la rhizosphère (Ordentlich et al. 1988; Inbar and Chet 1991). Les

actinobactéries chitinolytiques sont courants dans la nature où ils jouent un rôle important dans la dégradation de la chitine (Tahtamouni et al. 2006; Dhanya et al. 2014; Wang et al. 2015; Yandigeri et al. 2015). La Chitinolyse est une caractéristique très répandue chez les *Streptomyces* isolées du sol, alors que très peu d'études sont rapportées sur les chitinases des autres genres d'actinomycètes dits rares (O'Riordan et al. 1989; Gupta et al. 1995; Gomes et al. 2000; Hirsch and Valdés 2010) (tableau 5). Les souches productrices de chitinase peuvent être utilisées directement dans le contrôle biologique des champignons ou indirectement en utilisant la protéine purifiée (Ordentlich et al. 1988).

En 1995, Mitsutomi *et al.*, purifient deux nouvelles chitinases, C1 et C2 à partir de la souche *Streptomyces griseus* HUT 6037 (Mitsutomi et al. 1995). Le poids moléculaire des deux enzymes est de 27 kDa avec une température optimale d'action de 55°C. L'agent de biocontrôle antifongique *Streptomyces lydicus* WYEC108 est capable non seulement, de détruire les oospores de *Pythium ultimum*, mais aussi les parois cellulaires des hyphes fongiques (Yuan and Crawford 1995). Pour la souche WYEC108 l'addition de chitine extraite à partir des parois cellulaires fongiques dans le milieu de culture peut induire une production de grandes quantités de chitinases, alors qu'en absence de chitine, la production de l'enzyme est négligeable. La chitinase produite par *Streptomyces lydicus* WYEC108 est aussi induite par la chitine colloïdale, le N-acetylglucosamine et les chitooligosaccharides. Par contre la synthèse de chitinase est réprimée par des fortes teneurs en glucose et carboxyméthyl cellulose (CMC) (Mahadevan and Crawford 1997).

Hoster *et al.*, ont isolé une chitinase IS à partir de la souche *Streptomyces griseus* MG3, cette enzyme montre une activité très élevée dans un large intervalle de pH, incluant les pH acides *et alcalins*. Cette propriété en plus de sa capacité à inhiber la croissance des champignons phytopathogènes la rend très utile pour une application comme agent de lutte biologique (Hoster et al. 2005b).

El-Sayed *et al.*, (2000) ont identifié deux chitinases A et B, purifiées à partir du surnageant d'une culture de *Streptomyces albocinaceus* S-22. Ces dernières montrent un important potentiel antifongique qui se traduit par une lyse cellulaire. Elles ont un poids moléculaire de 43 et 45 kDa, et sont actives à un optimum de température et pH de 40 °C et 6 respectivement (El-Sayed et al. 2000).

L'endochitinase isolée par Shekhar *et al.*, à partir de *Streptomyces violaceusniger* XL-2 est une protéine de 28,25 kDa, cette enzyme possède un pouvoir de bio-contrôle contre les mycètes cellulolytiques comme *Phanerochaete chrysosporium*, seulement en présence de chitine comme source de carbone dans le milieu de culture (Shekhar et al. 2006).

Actuellement, des travaux portent sur l'isolement du gène de l'endochitinase de *S. violaceusniger* XL-2 pour être cloné dans un vecteur adéquat afin d'optimiser la production de cette enzyme. Plusieurs gènes codant pour les chitinases ont été clonés à partir de *Streptomyces* sp. Ces dernières ont plusieurs applications dans divers domaines (Miyashita et al. 1991; Fujii and Miyashita 1993; Blaak et al. 1993; Karthik et al. 2015; Nguyen-Thi and Doucet 2016; Dua et al. 2016).

Tableau 5 : Chitinases produites par différentes espèces d'actinomycètes.

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

MATERIEL ET METHODES

1. Isolement et purification des actinobactéries

1.1. Échantillonnage

L'échantillon analysé est prélevé selon la technique de Pochon et Tardieux (1962), à partir d'un site de sol aride de la région de Laghouat (33°N, 3°E, Algérie) (Pochon and Tardieux 1962). À l'aide d'une grande spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, 100 à 150 g de terre sont alors prélevés avec une petite spatule dans la couche sous-jacente (entre 5 et 15 centimètres de profondeur), et déposés sur une feuille d'aluminium stérile. Les gros débris sont écartés (pierres, racines, etc.) et environ 50 g sont récupérés dans un flacon stérile et transportés au laboratoire (Pochon and Tardieux 1962). L'analyse physico-chimique du sol est réalisée par le laboratoire «César» (01250 Ceyzériat, France).

1.2. Traitement de l'échantillon

Un gramme de sol séché à l'air est mélangé avec 0,1 g de CaCO₃. Le mélange est incubé à 28 °C dans une enceinte stérile saturée d'humidité pendant 07 jours (El-Nakeeb and Lechevalier 1963).

1.3. Isolement et mise en culture

Une suspension mère est préparée par addition de 2 g de sol à 18 ml d'eau physiologique stérile. Cette dernière est agitée au vortex deux fois pendant 5 min (Boughachiche et al. 2005). Des séries de dilutions décimales (de 10⁻¹ à 10⁻⁷) sont préparées à partir de la solution mère et 0,1 ml de chaque dilution est inoculé sur milieu gélosé.

Deux milieux de culture sont utilisés pour l'isolement des actinobactéries ; un milieu minimum additionné de chitine colloïdale (MCC) et le milieu Bennett (annexe n° 01). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30 °C et sont observées après deux, trois et quatre semaines d'incubation.

1.4. Purification et conservation des souches actinomycétales

Toutes les colonies se rapprochant par leur aspect macroscopique aux actinobactéries sont repérées au microscope photonique (Grossissement 100x), puis purifiées et ensemencées sur le milieu ISP-2. Les colonies sont conservées à 4 °C sur gélose inclinée (Boughachiche et al. 2005) et à -20 °C en suspension dans le milieu ISP-2 liquide additionné de glycérol à 20 % (V/V).

2. Mise en évidence des actinobactéries productrices de chitinases

2.1. Préparation de la chitine colloïdale

La chitine étant insoluble dans l'eau et les solvants organiques, elle doit être transformée en chitine colloïdale pour permettre une dispersion homogène en suspension ou sur milieu gélosé. Un protocole modifié de Murthy et Bleakley (2012) est utilisé pour la préparation de la chitine colloïdale (Murthy and Bleakley 2012).

Dans un bécher de 1000 ml, vingt grammes de poudre de chitine sont traités avec 300 ml d'HCl concentré ~ 12M. Ce dernier est ajouté lentement sous agitation continue pendant 60 min sous une hotte chimique à température ambiante (25 °C). La suspension est ensuite traitée avec 2 litres d'eau distillée refroidie, puis incubée pendant une nuit à 4 °C pour précipiter la chitine colloïdale.

La suspension est alors passée à travers deux couches de papier filtre à café, logés dans un entonnoir de Büchner (130 mm). Trois litres d'eau du robinet (pH 8,0 ~) sont ensuite passées à travers la chitine colloïdale retenue dans le filtre à café, jusqu'à atteindre un pH neutre. La chitine colloïdale obtenu est pressée entre Les papiers filtres (pour éliminer l'humidité supplémentaire) et re-suspendue dans de l'eau distillée à raison de 2% (P/V), stérilisée, puis conservée à 4 °C (figure 13) (Murthy and Bleakley 2012).



Figure 13 : Préparation de la chitine colloïdale.

2.2. Préparation de l'inoculum

Le milieu utilisé pour l'inoculation est l'ISP-2. Une anse de chaque culture est transférée du milieu solide sur boîte vers le milieu ISP-2 liquide. Les cultures sont incubées à

30 °C sous une agitation de 200 rpm pendant 3 ou 4 jours, jusqu'à obtention d'une densité optique de 0,8 à 660 nm (Kieser et al. 2000).

2.3. Mesure de l'activité chitinolytique dans différentes conditions

La mise en évidence de l'activité chitinolytique consiste à déposer 20 µl de chaque inoculum sur la surface du milieu MCC. Ce test est réalisé à différentes températures d'incubation (30, 35, 40, 45 et 50 °C). Divers pH (5,0 ; 7,0 et 9,0) sont également testés à 30 °C. Le milieu de culture est préparé avec des tampons (annexe n° 02) appropriés pour chaque pH (le Tris-HCl 0,2 M pour le pH 9, et le Na₂HPO₄ à 0,4 M et 0,2 M d'acide citrique pour le pH 5).

La production de chitinase extracellulaire se traduit par l'apparition de zones claires autour des colonies. Les diamètres des zones d'hydrolyse (CZ) ainsi que ceux des colonies (CS) sont mesurés pour chaque souche, afin de calculer le rapport CZ/CS (les valeurs sont indiquées dans l'annexe n°05). La présence de halos clairs autour des colonies est observée après 7 jours d'incubation (Kim et al. 2003). Ces tests sont répétés trois fois. La souche *S. coelicolor* M145 (Bentley et al. 2002) est utilisée comme souche de référence. L'analyse statistique est réalisée grâce au logiciel « R freeware 66 » en utilisant le test de Wilcoxon.

2.4. Répression catabolique de l'activité chitinolytique

L'effet du glucose sur la production de chitinases a été évalué après inoculation des souches isolées sur milieu MCC et MCCG (MCC supplémenté par 0,5 % de glucose) à 30 °C et pH= 7,0. Le rapport CZ/CS est mesuré pour les deux milieux de culture après 5 jours de croissance. Les essais sont effectués en trois répliques indépendantes. La répression catabolique est calculée en utilisant la formule suivante:

$$\frac{CZ/CS_{MCC} - CZ/CS_{MCCG}}{CZ/CS_{MCC}}$$

3. Recherche de l'activité antimicrobienne

3.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des actinobactéries isolées est recherchée contre des bactéries tests qui sont obtenues auprès du CHU de Constantine. Il s'agit de trois bactéries à coloration de Gram positive : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus*

(ATCC 43300), *Bacillus cereus*, et de trois autres bactéries à coloration de Gram négative : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC70603) et *Enterobacter* sp..

A partir des cultures de 18 h sur la gélose trypticase soja (TSA) (Annexe n° 01), une suspension de chaque bactérie-test est préparée en eau physiologique (0,9 % NaCl). La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans l'eau physiologique stérile et par comparaison avec la solution 0,5 Mc Farland (une densité optique égale à 0,2 à 650 nm) de façon à obtenir une concentration finale de 10^6 UFC/ml après incorporation dans le milieu Mueller Hinton (annexe n° 01) (Kitouni et al. 2005).

3.1.1. Technique des cylindres d'agar

Les souches d'actinobactéries isolées sont ensemencées en stries serrées sur les milieux ISP-2 et MCC et incubées pendant 7 jours à 28 °C. La recherche des métabolites antibactériens est effectuée par la technique des cylindres d'agar (Lemriss et al. 2003), qui consiste à prélever à l'aide d'un emporte-pièce, des cylindres de 6 mm de diamètre de cultures et de les déposer sur la surface du milieu Mueller-Hinton gélosé, préalablement ensemencé par écouvillonnage selon la technique de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) par les bactéries tests.

Les boîtes de Pétri sont ensuite maintenues à 4 °C pendant 4 heures pour permettre une diffusion des substances antimicrobiennes actives dans le milieu de culture (Siham et al. 2012) avant d'être incubées à 37 °C. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24 heures.

3.2. Recherche de l'activité antifongique

La recherche du pouvoir antagoniste des actinobactéries isolées grâce à leur activité chitinolytique est mise en évidence *in vitro* contre deux champignons filamenteux *Fusarium oxysporum* CIP 625.72 et *Botrytis cinerea*, provenant du laboratoire de Génie Microbiologique et Application de l'Université des frères Mentouri Constantine et du laboratoire d'Ecologie Microbienne, UMR 5557, de l'Université Claude Bernard, Lyon, respectivement.

L'activité est testée sur deux milieux différents MCC et MCCG selon la méthode modifiée de Crawford *et al.* (1993). Vingt microlitres de suspension de spores de chaque souche sont déposés sur la surface de chaque milieu. Quatre isolats différents sont inoculés sur la même boîte de Pétri (Crawford et al. 1993). L'opération est répétée trois fois pour chaque souche et chaque milieu. Après 4 jours d'incubation à 30 °C, un cylindre de 6 mm de diamètre de chaque champignon est déposé au centre de la boîte Pétri, et sur deux boîtes ne contenant que les milieux MCC et MCCG non inoculées (témoins positifs). Enfin, les boîtes de Pétri sont incubées à 30 °C. Après 5 jours d'incubation avec les champignons, les

diamètres d'inhibition sont mesurés qualitativement. (-) pour l'absence d'inhibition, (+) peu d'inhibition, (++) pour un fort antagonisme et (+++) pour un très fort antagonisme.

4. Identification moléculaire des actinobactéries chitinolytiques

Au cours de notre travail, les colonies d'actinobactéries isolées sont regroupées par BOX-PCR. Ensuite, quelques souches de chaque groupe sont identifiées et caractérisées par une amplification de l'ADNr 16S et un séquençage.

4.1. BOX-PCR (BOX-Polymerase Chain Reaction)

L'identification des bactéries a été traditionnellement effectuée par des descriptions phénotypiques, mais cette approche a des limites. Par conséquent, d'autres techniques ont vu le jour pour pallier ce déficit, telles que les méthodes d'empreintes génétiques. Parmi lesquelles la technique de Box-PCR, qui est une méthode basée sur l'amplification de la séquence répétitive de 154 pb (Versalovic et al. 1994). Ces séquences sont très conservées au sein d'une même espèce (Versalovic et al. 1994; Rademaker and de Bruijn 1997). L'amplification par Box-PCR permet donc d'obtenir des amplicons de taille variable qui sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le profil électrophorétique alors obtenu représente une signature hautement discriminante qui permet de différencier les microorganismes. Cette technique s'est avérée extrêmement fiable, reproductible, rapide et fortement discriminatoire des souches et espèces entre elles (Versalovic et al. 1994).

Dans les conditions d'isolement que nous avons appliqué, il est possible qu'une même souche soit présente plusieurs fois dans la collection. Avant d'entreprendre l'identification fine des souches par séquençage du gène de l'ADNr 16S, il semble important d'éliminer les doublons de la collection et de différencier les souches entre elles. La méthode choisie pour cela est la Box-PCR. Une étape d'extraction et de purification de l'ADN est nécessaire avant d'entamer l'amplification par PCR, puis l'électrophorèse sur gel d'agarose.

4.1.1. Extraction et purification de l'ADN

L'ADN est extrait à l'aide d'un kit d'extraction Sigma aldrich « REDEExtract-N-Amp Plant PCR » (Sigma®). Une colonie bactérienne est déposée dans un tube Eppendorf contenant 80 µl de solution d'extraction. Après une brève agitation au vortex, le mélange obtenu est incubé à 95 °C dans un bain marie sec pendant 10 min. Après incubation, 80 µl de solution de dilution sont additionnés suivi d'une agitation au vortex. Afin de purifier l'ADN extrait, 100µl de phénol-chloroforme isoamilque sont rajoutés, le tout est agité au vortex. Le mélange est centrifugé à 14500 rpm pendant 10 min et les surnageants de chaque échantillon

(environ 40 µl) sont récupérés dans un nouveau micro-tube. La même quantité de chloroforme isoamilique est rajoutée. L'ensemble est agité au vortex puis centrifugé à 14500 rpm pendant 5 min. Les surnageants contenant les ADN sont alors récupérés dans de nouveaux micro-tubes, dilués à 50% avec de l'eau distillée et conservés à 4 °C.

4.1.2. Amplification et conditions de la Box-PCR

La BOX-PCR est réalisée en utilisant l'amorce BOX-A1R (tableau 6) qui permet l'amplification des séquences répétitives dans le génome bactérien (Versalovic et al. 1994).

La PCR est réalisée sur un appareil (Perkin Elmer 480) dans un volume final de 25 µl. la composition du mélange réactionnel ainsi que le programme de la PCR sont indiqués dans le tableau 7 et la figure 14, respectivement.

Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés pour l'amplification des différents gènes.

Nom de l'amorce	La séquence	Origine de la séquence	Gène ciblé
BOX-A1R	5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3'	(Versalovic et al. 1994))	Séquence répétitive de 154 pb
SF1	5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'		ADNr 16S
SR5	5' AAGGAGGTGATCCANCC 3'		ADNr 16S

Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel.

Réactifs	Volumes (µl)
Tampon 10X	2,5
MgCl ₂ (50 mM)	6
BOX-A1R (20µM)	2,5
dNTP (10 mM)	2,5
Taq polymérase (2U/µl)	0,4
W1% (additive)	1,25
Eau PCR stérile	8,85
ADN	1

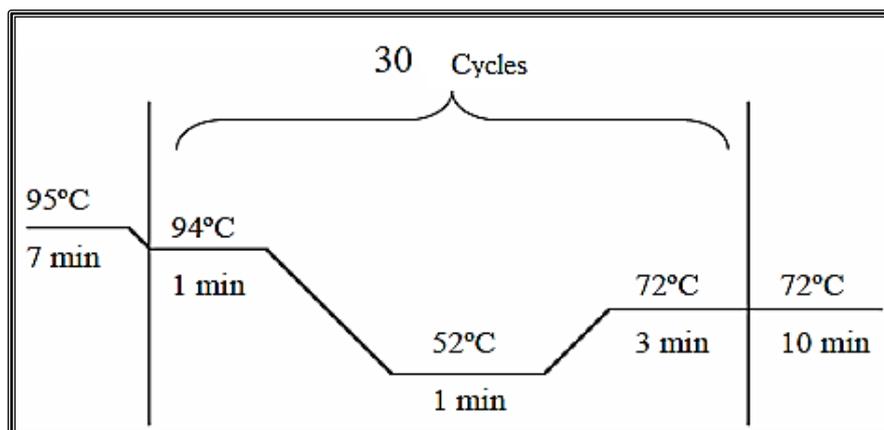


Figure 14 : Programme d'amplification par BOX-PCR.

4.1.3. Électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de PCR sont vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose. 1,2 µl de la solution de bleu de charge et 6 µl du produit PCR sont déposés dans chaque puits. Le marqueur de taille de 1 kb est placé dans le premier et le dernier puits. Les conditions de l'électrophorèse sont résumées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Conditions de séparation des produits amplifiés par électrophorèse.

	Agarose (%)	Tampon	BET (µl)	Temps (h)	Voltage (V)
Box-PCR	2	TBE (0,5x)	2	4	85
ADNr 16S	1	TBE (0,5x)	2	1	100
Gène des GH18 et 19	1	TBE (0,5x)	2	1	100

4.1.4. Traitement statistique des profils obtenus sur gel d'agarose

Les amplicons de taille variable sont séparés selon leur taille dans le gel d'agarose pour donner des profils électrophorétiques différents entre des souches d'espèces différentes et également pour des souches de la même espèce. Les photos des profils de la Box-PCR sont analysées avec le logiciel Gel-Compar (version 4.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgique). Ce logiciel détecte et identifie d'abord toutes les bandes visibles sur chaque gel. Tous les gels sont normalisés en utilisant le marqueur de taille 1kb. Chaque bande est repérée par la taille des fragments auxquels elle correspond. La présence des bandes sur chaque gel est ensuite enregistrée sous la forme d'une matrice binaire tenant compte de l'absence (0) ou de la présence (1) des bandes aux positions enregistrées (Heyndrickx et al. 1996). L'analyse des données de la matrice binaire ainsi que la construction de l'arbre phylogénétique sont réalisées grâce au logiciel BioNumerics version 4.5 (Applied Maths, Belgique), en appliquant

la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group with Mathematical Averages) ainsi que le coefficient de corrélation de Pearson.

4.2. Identification moléculaire des actinobactéries

Les souches actinomycétales isolées ont pu être classées en 4 grands groupes après analyse de la BOX-PCR. Dans chaque groupe, quelques souches ont été choisies (20 au total) pour être identifiées par amplification de l'ADNr 16S et séquençées. L'ADN de chaque souche est extrait en suivant le même protocole décrit précédemment (Cf 4.1.1). La séquence partielle de l'ADNr 16S est amplifiée en utilisant un couple d'amorces « SR5 » et « SF1 » (tableau 6).

Les amplifications par PCR sont effectuées sur un appareil (Perkin Elmer 480), selon les instructions du kit « REDExtract-N-Amp Plant PCR » (Sigma®) dans un volume final de 20 µl. Le mélange réactionnel ainsi que les cycles d'amplification sont indiqués dans le tableau 9 et la figure 15, respectivement.

Tableau 9 : Composition du mélange réactionnel.

Réactifs	Volumes (µl)
REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix ^(*)	10
Mélange 1:1 (dilution/extraction)	2
Oligonucléotide F (20µM)	0,4
Oligonucléotide R (20µM)	0,4
Eau PCR stérile	6,2
ADN	1

^(*) Le « REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix » contient un tampon 10X, du MgCl₂, des dNTP, et de la Taq polymérase.

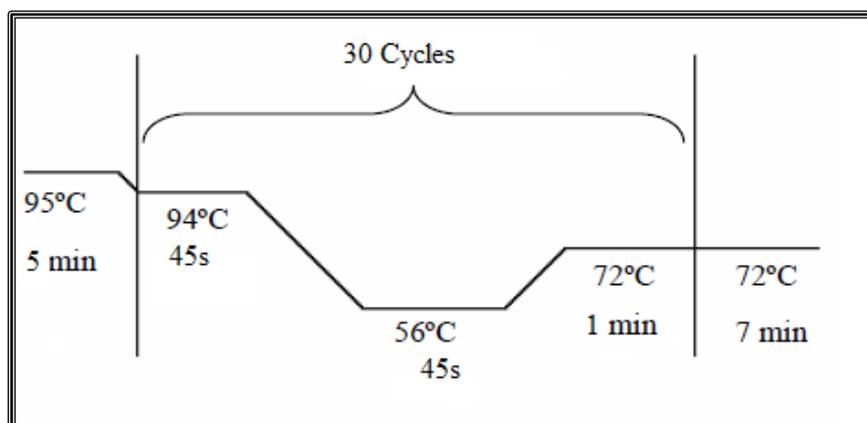


Figure 15 : Programme d'amplification par PCR de l'ADNr 16S.

4.2.1. Electrophorèse

Après amplification, les échantillons sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (tableau 8) en présence d'un marqueur de taille moléculaire de 100 pb. Après migration, le gel est examiné sous lumière ultraviolette (UV) pour repérer les bandes amplifiées.

4.2.2. Purification des bandes d'ADN à partir du gel d'agarose

Les produits d'amplification par PCR ne sont pas suffisamment purs pour être utilisés directement dans les réactions enzymatiques telles que le séquençage, et nécessite une purification préalable. L'excès d'oligonucléotides et de dNTP non-incorporés a été éliminé par le kit « QIAquick PCR Purification Kit » (QIAGEN®). Les amplifias montrant des bandes aspécifiques ont été purifiés après électrophorèse et excision de la bande correspondante à partir du gel d'agarose et traitement selon les recommandations du kit « QIAquick Gel Extraction Kit ».

4.3. Séquençage et analyse des séquences

Le séquençage a été effectué par une société privée "Biofidal" (Villeurbanne, France, www.biofidal.com).

Les résultats du séquençage des souches sont obtenus sous forme d'électrophorégrammes bruts et sont analysés par le logiciel Chromas Lite. Les séquences consensus obtenues sont par la suite comparées avec la banque de données du site du NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST (Altschul et al. 1990) et EzTaxon (Chun et al. 2007) afin d'identifier les taxons les plus proches. L'alignement de séquences homologues des ADNr 16S avec d'autres séquences de GenBank est effectué en utilisant le logiciel Clustal X (Gibson et al. 1994) pour définir la séquence consensus. Après avoir aligné les séquences, l'arbre phylogénétique est construit à l'aide du programme Mega version 6.06 (Tamura et al. 2013). Selon la méthode du "Neighbor Joining" (NJ) (Saitou and Nei 1987), la matrice de distance est calculée selon le model Kimura à deux paramètres (Kimura 1980). Les valeurs de bootstrap ont été déterminées à partir de 1000 répliques (Felsenstein 1985).

5. Optimisation de la production de la chitinase

Les conditions de culture et la composition du milieu de base de la fermentation ont une influence importante sur la biomasse et la production des chitinases. Les méthodes classiques d'optimisation des milieux de production consistent à changer un paramètre à

chaque fois, tout en gardant les autres variables constants. Cette méthode est extrêmement longue et coûteuse à cause du nombre élevé de variables. En outre, elle ne parvient pas à déterminer l'effet combiné des différents facteurs (Gasmi and Kitouni 2017). Les méthodes statistiques fournissent une autre méthode pour résoudre ces problèmes et optimiser un processus particulier.

Cette étape consiste à évaluer le taux de chitinase produite par la souche *Streptomyces griseorubens* C9 en fonction des différentes conditions du milieu. Cette dernière a été choisie parmi notre collection de souches pour son fort pouvoir antagoniste contre les deux champignons phytopathogènes testés, sa tolérance aux hautes températures et son activité chitinolytique élevée. Aussi, aucune étude antérieure sur l'optimisation des milieux de culture de production des chitinases n'a été menée sur cette espèce.

Les paramètres faisant l'objet de l'optimisation sont des facteurs organiques et inorganiques comme la chitine colloïdale, l'extrait de levure, le K_2HPO_4 , le KH_2PO_4 .

L'optimisation des milieux de cultures est réalisée en deux étapes ; la première étape a pour but de sélectionner les paramètres (variables) ayant un effet positif sur la production de la chitinase en utilisant le plan de Plackett-Burman (1946), la deuxième étape permet de déterminer les optima des paramètres sélectionnés par le plan des composites centrés de Box-Wilson (1951) couplé à la méthodologie des surfaces de réponse (RSM).

5.1. Conditions des fermentations

Une suspension sporale de la souche actinomycétale sélectionnée est préparée à partir d'une culture sur milieu gélosé ISP-2. 10 ml d'eau physiologique sont versés aseptiquement sur la boîte et les spores sont raclées à l'aide d'une anse de platine. Cette suspension est ensuite prélevée dans un tube à essai stérile et la DO_{600} est ajustée à 0,8 (ce qui correspond à une suspension de 10^7 spores/ml).

Les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu de production à pH 7,0 après une stérilisation à 120 °C pendant 20 min. Les milieux sontensemencés avec 1% (v/v) de la suspension de spores préalablement préparée de *Streptomyces griseorubens* C9 (LN864570). Ensuite, les cultures sont agitées à 150 rpm dans un incubateur à 40 °C, pendant 168 h. Après centrifugation ($\times 10\,000$ g, 4 °C, pendant 20 min), les surnageants sont réservés au dosage de l'activité chitinolytique.

5.2. Les plans d'expériences

La méthode des plans d'expériences est un modèle statistique permettant à un expérimentateur de limiter le nombre d'essais à réaliser lors d'une expérimentation afin de déterminer une réponse pour un grand nombre de facteurs étudiés. En effet, un phénomène étudié peut toujours être modélisé sous la forme mathématique :

$$Y = f(x_1, x_2, \dots, x_n).$$

Y étant la grandeur ou la réponse à laquelle l'expérimentateur s'intéresse.

f la fonction mathématique exprimant le mieux les variations de la réponse selon les différentes valeurs des facteurs (ou variables appelées x_i).

Cette méthode consiste en une variation raisonnée des niveaux de tous les facteurs en même temps pour chaque essai. Les plans d'expériences vont ainsi permettre d'étudier l'influence simultanée d'un grand nombre de facteurs et de leurs interactions, pour conduire à une optimisation des conditions.

5.2.1. Plan d'expériences Plackett et Burman

Les matrices sont des plans factoriels fractionnaires simplifiés qui permettent de réaliser un modèle d'ordre 1 pour k facteurs à 2 niveaux. Cependant, ceux-ci ne permettent de déterminer que les effets principaux des facteurs, sans prendre en compte les interactions. Ce type de plan est construit selon des matrices n'existant que lorsque le nombre d'essais est un multiple de 4.

Le plan d'expériences de Plackett et Burman est constitué de matrices carrées établies à partir d'un générateur de base (tableau 10), ne contenant que des éléments égaux à +1 ou -1. La dernière ligne du plan d'expérience étant toujours au niveau inférieur. Chaque ligne représente une expérience et chaque colonne représente une variable. Ces plans permettent de mettre en évidence l'effet de k facteurs à 2 niveaux (tableau 11) sur le phénomène étudié avec un nombre d'expériences minimales N , tel que $N = k + 1$. L'analyse statistique consiste à identifier les variables qui ont un effet significatif positif ou négatif sur la production de la chitinase.

Tableau 10 : Générateur des matrices pour $N = 11, 15, 19$ et 23 essais de Plackett et Burman.

N	k	
11	12	++-+++----+-
15	16	++++-+++-+---
19	20	++--++++-++-----+-
23	24	+++++--++-++-+-----

Tableau 11 : La matrice de Plackett-Burman pour l'étude de 19 variables avec 20 expériences.

		Variables																	Activités chitinolytiques (U/ml)		
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	
Expériences	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	7,476
	2	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	2,239
	3	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	7,053
	4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	7,043
	5	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	6,544
	6	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1,799
	7	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1,973
	8	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1,116
	9	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	7,049
	10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	3,244
	11	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1,861
	12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	6,527
	13	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1,934
	14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	7,033
	15	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1,986
	16	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1,924
	17	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	2,042
	18	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	2,062
	19	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	6,639
	20	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2,134

D, H, L, P sont les variables erreurs ;

+1 niveau supérieur,

-1 niveau inférieur.

Les matrices de Plackett- Burman sont basées sur les blocs incomplets équilibrés (B.I.E), fournissant une méthode efficace pour sélectionner un grand nombre de variables et identifier les plus importantes, pour effectuer un plan de modélisation plus complet afin

d'étudier le phénomène de façon plus approfondie. L'interprétation des résultats reste cependant très limitée dans ce type de plan fractionné et ne permet pas d'établir d'optimum.

La réponse expérimentale \hat{Y} s'écrit sous forme d'une équation du premier degré où seules sont retenues les variables explicatives X_i à effet significatif positif.

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \varepsilon \quad (1)$$

\hat{Y} la réponse expérimentale ;

β_0 constante ;

β_i coefficient de régression de la variable explicative X_i ;

X_i variable explicative ;

ε la moyenne des erreurs expérimentales.

Dans notre étude, le plan expérimental est établi d'après les matrices de Plackett-Burman où $N=20$, soit 20 expériences et 19 facteurs (15 réels et 4 variables muettes ou Dummy) (Plackett and Burman 1946). Ce plan est utilisé pour sélectionner les facteurs favorisant la production de la chitinase par *S. griseorubens* C9 (tableau 12). La signification de chaque variable sur la production de la chitinase est déterminée via le test-*t* de Student. Le niveau de confiance accepté est $(1 - \alpha) \geq 95\%$.

5.2.2. Plan composite centré

Le plan composite centré CCF (Central Composite Face) est introduit par Box et Wilson en 1951 en combinaison avec la méthodologie de surface de réponse (RSM). Ce plan est adopté pour déterminer les optima des variables significatives permettant une réponse maximale.

Le plan composite permet le test de chaque facteur à 4 niveaux (tableau 13) et est composé de trois parties distinctes pour générer un nombre de traitements de combinaisons égal à : $2^k + 2.k + N$

- Un plan factoriel à deux niveaux (-1, +1), à partir de facteurs 2^k (k = nombre de facteur, égal à 4 dans notre étude) soit $2^4 = 16$ combinaisons.
- $2.k$ soit 8 points en étoiles, avec 2 niveaux (+ α) et (- α) correspondant au plan factoriel 2^4 : (-2 et +2).
- $N= 4$ (4 combinaisons) répétitions du point central (niveau 0).

Au total 28 essais (combinaisons) ont été réalisés (tableau 14).

Tableau 12 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett-Burman pour 15 facteurs.

Facteurs	Niveaux		Unités
	+1	-1	
A : pH	5	9	
B : Concentration chitine	1	3	%
C : Mélasse de datte	0	2	%
D: Dummy	-	-	
E: Lactosérum	0	2	%
F: Péptone	10	15	g/l
G: Caséine	0,1	0,4	g/l
H: Dummy	-	-	
I: Tryptone	10	15	g/l
J : Extrait de levure	0,1	0,4	g/l
K : Sulfate d'ammonium	0,1	0,4	g/l
L: Dummy	-	-	
M: K₂HPO₄, KH₂PO₄	1	2	g/l
N : Microélément	0.5	1.5	ml/l
O : Ecrevisses	0	20	g/l
P : Dummy	-	-	
Q : Champignon	0	20	g/l
R : Crevettes	0	20	g/l
S : NaCl	5	10	g/l

Tableau 13 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré.

Facteurs	Niveaux				
	α (-2)	-1	0	+1	α (+2)
X1 : chitine colloïdale (%)	1	1,5	2	2.5	3
X2 : Mélasse de datte (%)	0	0,5	1	1.5	2
X3 : Extrait de levure (g/l)	0.05	0,15	0.25	0.35	0.45
X4 : K₂HPO₄, KH₂PO₄ (g/l)	1	1,25	1.5	1.75	2

Tableau 14 : Matrice du plan composite centré de *Box* et *Wilson* à quatre facteurs.

N° d'essai	Facteurs			
	X1	X2	X3	X4
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0

Ce plan est représenté par l'équation polynomiale du second degré suivante :

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 \quad (2)$$

\hat{Y} : la réponse (activité chitinolytique) ;

X_1, X_2, X_3, X_4 : les formes codées des variables explicatives ;

β_0 : la constante du modèle ;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$: les coefficients linéaires ;

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$: les coefficients quadratiques ;

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{23}, \beta_{24}, \beta_{34}$: les coefficients d'interaction.

Les quatre facteurs retenus dans le tableau 10 sont codifiés selon l'équation suivante (tableau 15) :

$$X_R = \frac{X_i - X_0}{d}$$

X_R : valeur codée

X_i : valeur réelle

X_0 : valeur au niveau 0

d : intervalle entre niveaux

Tableau 15 : Traitement de la matrice du plan composite centré.

Chitine colloïdale : $X_1 = \frac{[\text{chitine colloïdale}] - 2}{0,5}$
Mélasse de datte : $X_2 = \frac{[\text{Mélasse de datte}] - 1}{0,5}$
Extrait de levure : $X_3 = \frac{[\text{E. de levure}] - 0,25}{0,1}$
K_2HPO_4, KH_2PO_4 : $X_4 = \frac{[K_2HPO_4, KH_2PO_4] - 1,5}{0,25}$

5.3. Analyses statistiques

Les données découlent des expériences indépendantes. Chaque expérience est analysée pour qualification par trois à quatre essais. Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types.

- La conception expérimentale et l'analyse des données sont effectuées par le logiciel STATISTICA version 12,0 (Dell, Inc. 2015).

- L'évaluation statistique est effectuée en utilisant : le test de *Student (t)* : La valeur trouvée par (*t*) peut affirmer que les groupes sont différents avec un risque d'erreur (*P*).
- Les comparaisons entre les variables dépendantes ont été déterminées par analyse de la variance (ANOVA).

5.4. Expérience de confirmation

Une fermentation est réalisée en triple avec les optima calculés afin de confirmer la validité du modèle.

5.5. Cinétique de production des chitinases

Tenant compte des paramètres optimaux testés, une culture sur milieu optimisé (50 ml) est réalisée en 3 réplicas dans des erlenmeyers de 250 ml. Les cultures sont incubées pendant 08 jours à 40 °C et agitées à 150 rpm. Des prélèvements sont effectués chaque 24 h afin de mesurer la production des chitinases en milieu liquide ; ce qui permet d'établir une cinétique en fonction du temps et déterminer le meilleur temps de production.

6. Purification de la chitinase

Après 144 heures d'incubation de la souche *Streptomyces griseorubens* C9 à 40 °C et une agitation de 150 rpm dans le milieu optimisé, le milieu de culture obtenu est centrifugé à 4500 rpm pendant 15 min puis filtré en utilisant un filtre de 0,45µm. Le filtrat constitue l'extrait enzymatique brut (environ 150 ml).

La purification de la chitinase se déroule en trois étapes majeures selon la méthode de Mukherjee et Sen (2006). Une précipitation par le sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie d'affinité à base de chitine colloïdale et enfin une chromatographie échangeuse d'anions DEAE-sephadex ont été réalisées (Mukherjee and Sen 2006).

6.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium

L'extrait enzymatique brut (150 ml) est soumis à une précipitation par du sulfate d'ammonium à 80% de saturation (annexe n° 04). La solution est mise sous une faible agitation pendant 4 heures jusqu'à ce que tout le sulfate d'ammonium soit complètement dissous. Ce processus est réalisé à 4 °C afin de maintenir l'activité biologique de la chitinase.

Le précipité ainsi obtenu est recueilli par centrifugation à 10.000 g pendant 20 min à 4 °C. Le culot est ensuite dissous dans 10 mM d'acétate de sodium (pH 5,0) (annexe n° 02). L'activité chitinolytique et les protéines totales sont mesurées après cette étape.

6.2. Dialyse

La dialyse est réalisée après précipitation par le sulfate d'ammonium dans le but d'éliminer l'excès de sel, de solvants organiques ou de molécules de petits poids moléculaires de la solution (Rosenberg 2005).

Les protéines précipitées mises en suspension dans un volume réduit du tampon acétate de sodium (10 mM ; pH 5,0) sont dialysées contre 3 litres du même tampon, en utilisant une membrane semi-perméable (Spectra/por ; 20 mm ; limite d'exclusion : 12 kDa) sous une faible agitation à 4 °C. Le tampon de dialyse est renouvelé 3 fois chaque 4h.

6.3. Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est réalisée en rajoutant au dialysat un volume de 10 ml de chitine colloïdale et 15 ml de chlorure de sodium à 1M. Ce volume est complété à 35 ml par du tampon acétate à pH 5,0. La solution est laissée dans un bain de glace pendant une heure puis centrifugée afin d'éliminer les protéines non liées. Le culot est abondamment lavé avec le tampon acétate (pH 5,0) puis suspendu dans 15 ml du même tampon (Mukherjee and Sen 2006).

La solution obtenue est ensuite incubée à 35 °C pendant 6 h sous une faible agitation (90 rpm) afin que la chitinase absorbée puisse digérer la chitine colloïdale. Le surnageant transparent qui en résulte est à nouveau précipité avec 80% de sulfate d'ammonium, centrifugé et dialysé (Mukherjee and Sen 2006).

6.3.1. Chromatographie échangeuse d'ion

Enfin, une chromatographie échangeuse d'anion est réalisée en utilisant une colonne de DEAE-Sephadex (10×1cm). La colonne est préparée et équilibrée par 10 mM de tampon phosphate (pH 7,5). L'élution est effectuée par gradient de 150 mM à 1,5M de NaCl à un débit de 0,5ml/min. La teneur en protéines de chaque fraction de 1 ml est déterminée à 280 nm. Les fractions présentant une haute activité chitinase sont rassemblées, stockées à -20°C et utilisées en tant qu'enzyme purifiée pour la caractérisation.

7. Caractérisation partielle de la chitinase purifiée

7.1. Effet du pH

Pour la détermination du pH optimum, l'activité chitinolytique est mesurée à 50 °C pendant 30 min sous les conditions standards de mesure en utilisant les tampons suivants : tampon citrate à 0,2M (pH 3,0 – 5,0), tampon sodium phosphate à 0,2M (pH 6,0 – 8,0) et du tampon Tris-HCl 0,2M (pH 9,0 – 11,0) (annexe n° 02).

7.2. Stabilité du pH

La stabilité de la chitinase à différents pH est déterminée par la mesure de l'activité résiduelle, en incubant la chitinase purifiée à différents pH sans la présence de substrats pendant 1 h à 50 °C.

7.3. Effet de la température

La température optimale de la chitinase purifiée est mesurée en mélangeant 1 ml de chitinase avec 1 ml de 0,1% (p/v) de chitine colloïdale dans 0,2M de tampon acétate de sodium (pH 5,0). Procéder ensuite à la mesure de l'activité chitinolytique à des températures allant de 30 °C à 70 °C.

7.4. Stabilité thermique de la chitinase purifiée

L'étude de la stabilité thermique est réalisée en incubant la chitinase dans du tampon acétate de sodium 0,2M à pH 5,0 sans substrat pendant 30 min à différentes températures (30, 40, 50, 60 et 70 °C). L'activité résiduelle est déterminée en utilisant le protocole de dosage de l'activité chitinolytique (la méthode du DNS).

8. Méthodes analytiques

8.1. Dosage de l'activité chitinolytique

L'activité chitinolytique est déterminée en utilisant la méthode de dosage des sucres réducteurs par le DNS (Miller 1959). Le mélange réactionnel est composé de 1 ml d'extrait enzymatique brut auquel on ajoute 1 ml de chitine dans un tampon d'acétate de sodium (50 mM, pH 5,0) (Annexe n°02) (0,2 g de chitine dans 2 ml de tampon). Le mélange est incubé dans un bain marie agitateur pendant 30 min à 50 °C. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 15 min, prélever 1 ml du surnageant et rajouter 3 ml du réactif DNS (Annexe n° 03) afin de stopper la réaction. Le tout est porté au bain marie à 100 °C pendant 5 min puis refroidis dans un bain de glace. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (Shimatzu UV-120-02) à 540 nm. La quantité de sucres réducteurs libérés est calculée en fonction de la courbe étalon du N- Acétyl-Glucosamine (GlcNAc) utilisé comme référence (Toharisman et al. 2005) (Annexe n° 03).

Une unité de l'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la libération de 1 µmol de N-acétylglucosamine par ml en 1 min, dans ces conditions.

8.2. Dosage des protéines

Les protéines sont quantifiées par la méthode de Bradford. La courbe étalon est établie à partir d'une solution de sérum-albumine-bovin (BSA) (annexe n° 03).

8.3. Mesure de la biomasse

La mesure du poids sec de la biomasse est effectuée pour déterminer la concentration cellulaire des actinomycètes au cours des fermentations. 2 ml de bouillon de culture sont prélevés et centrifugés à 7000 rpm pendant 15 min. Le surnageant est éliminé et le culot est dissous dans 1 ml d'eau distillée. Après filtration sur papier filtre (0,22 μ), les échantillons sont séchés à 70 °C jusqu'à poids constant. La différence de poids est calculée puis exprimée en poids sec (mg/ml).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Caractéristiques physico-chimique du sol

L'échantillon de sol a été recueilli à partir du territoire environnant la région de Laghouat dans le sud de l'Algérie (33°N, 3°E). Les caractéristiques physicochimiques sont rassemblées dans le tableau 16. C'est un sol aride, de nature sablonneuse et alcaline (pH = 8,11). Les taux de carbone, de matière organique et d'azote sont de 11,8 g/kg, 20,3 g/kg et 1,3 g/kg, respectivement. Le rapport C/N et la capacité d'échange cationique (CEC) sont très faibles. Parmi les cations échangeables (K, Ca et Mg), le calcium est le plus abondant, mais il n'est pas fixé dans le sol, donc, il n'est pas accessible aux microorganismes présents dans ce dernier. Cette faible présence est associée à la faible densité bactérienne isolée à partir de ce sol.

Tableau 16 : Caractéristiques physico-chimiques du sol.

Taille du grain		%
Sable		94,0
Limon (vase)		3,4
Argile		2,6
Contenu en carbone et azote		g/kg
Matière organique		20,3
Carbone organique		11,8
Azote total		1,3
C/N		8
Contenu en microéléments		g/kg
P		2,085
K		0,606
Ca		6,380
Mg		0,684
CEC		29 meq/Kg
K/CEC		44 %
Ca/CEC		777 %
Mg/CEC		116 %

CEC = capacité d'échange cationique.

2. Isolement et purification des actinobactéries

Le nombre en UFC (Unité Formant Colonie) par grammes de sol séché, dénombré sur les milieux MCC et Bennett sont présentés dans le tableau 17. Ils sont de $2,06 \pm 0,57 \cdot 10^5$ et $0,76 \pm 1,15 \cdot 10^5$ sur le milieu MCC et celui de Bennett, respectivement. Le milieu MCC, composé de chitine colloïdale en tant que source unique de carbone et d'azote, a été utilisé

afin de détecter rapidement et directement les bactéries dégradant la chitine (présence d’halo de dégradation). En effet, cette population représente environ 72% du nombre total de bactéries cultivables sur ce milieu (tableau 17).

Tableau 17 : Dénombrement des actinobactéries isolées à partir de l’échantillon de sol.

Echantillon	Milieux de culture	Nombre des actinobactéries ($\times 10^5$ UFC/g)	Nombre d’isolats	
Sol aride	Bennett	0,76	21 (C1, C2 à C21)	
	MCC	Total	2,83	
		Chitinase +	2,06	19 (C22 à C40)
		Chitinase -	0,77	

Les colonies sont repérées en fonction de leur aspect morphologique (présence de mycélium aérien et végétatif), et de la présence de grands halos de dégradation (seulement dans le milieu MCC) (figure 16). Un total de 40 isolats a été prélevé afin d’identifier les meilleures conditions pour la mise en évidence de souches chitinolytiques, 21 et 19 souches à partir du milieu Bennett et MCC, respectivement (tableau 17). Sur la base de leur morphologie, seules les souches C33 et C37 sont distinctes des autres, avec un mycélium orange et une pigmentation noire (figure 16). Les isolats obtenus ont été purifiés après plusieurs repiquages sur milieu ISP-2, conservés sur gélose inclinée à 4 °C et sous forme de stocks de spores à -20°C.

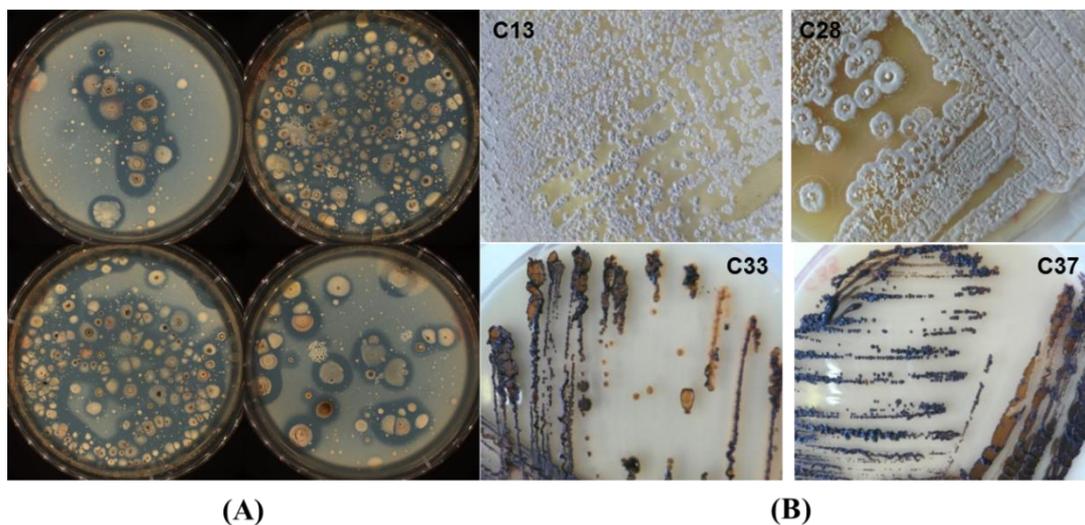


Figure 16 : (A) Isolement d’actinobactéries sur milieu MCC. (B) Aspect macroscopique des isolats (C13, C28, C33, C37) cultivés sur le milieu ISP-2.

Le sol est un environnement extrêmement riche qui abrite une multitude de microorganismes. Parmi ces microorganismes, les bactéries sont de loin les plus abondantes à la fois en termes de biomasse et de diversité taxonomique (Buckley and Schmidt 2003). Torsvik *et al.*, (1990) ont estimé par observation microscopique en utilisant l'acridine orange (fluorochrome qui se fixe sur les acides nucléiques), qu'un gramme de sol forestier naturel contient près de $1,5 \cdot 10^{10}$ bactéries. Plus tard, ils ont extrapolé des données issues d'hybridation ADN-ADN et estimé qu'un gramme de sol forestier se compose de près de 6000 génomes bactériens (Torsvik et al. 1990, 1998). Récemment, l'étude de métagénomiques de sols en termes de caractéristiques physicochimiques et géographiques a permis d'estimer entre 2000 et 10000 le nombre d'espèces bactériennes (et donc de génomes) par gramme de sol (Roesch et al. 2007). D'une manière générale, on considère aujourd'hui qu'un gramme de sol héberge, en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques, plusieurs milliers d'espèces et que l'abondance de ces espèces peut varier de 10^8 à 10^{11} cellules par gramme de sol (Curtis et al. 2002; Roesch et al. 2007). La diversité microbienne est exprimée par le nombre d'espèces différentes ainsi que par leur abondance relative dans la microflore du sol (Kennedy and Smith 1995; Bhattacharyya et al. 2014).

Les sols arides sont considérées comme biologiquement pauvres, à peine capable de maintenir la vie. Dans les climats arides, le déficit en eau limite la croissance des plantes et par conséquent celle des microorganismes. Toutefois, les communautés microbiennes présentes dans ce biotope extrême ont commencé à être étudiées et caractérisées, afin d'obtenir des souches aux propriétés inhabituelles (Pasternak et al. 2013). Aussi, peu d'informations sur le potentiel antimicrobien des actinomycètes isolés à partir d'échantillon de sol non rhizosphérique ont été reportés (Kitouni et al. 2005; Boughachiche et al. 2005).

De ce fait, notre objectif dans cette partie est de se concentrer sur la physiologie des actinobactéries isolées et leurs enzymes, les chitinases en particulier.

Le biotope étudié dans ce travail est un sol aride de nature sablonneuse prélevé de la région de Laghouat en Algérie, où la température de l'air varie entre 4 et 43 °C. L'analyse chimique a démontré que ce sol est alcalin et pauvre en matière organique et microéléments. De ce fait, l'isolement d'actinobactéries produisant des chitinases à partir de cet écosystème extrême pourrait être intéressant afin d'obtenir des actinobactéries thermophiles et alcaliphiles modérées avec un métabolisme spécifique adapté à ces conditions. Pour ce faire, il faut donc adopter une méthode efficace pour leur sélection. Plusieurs auteurs utilisent des antibiotiques dans l'isolement des actinobactéries à croissance lente, par précaution (Larpen et al. 2005).

Gourgaud 1990). Pour notre part, nous avons suivi un protocole d'isolement bactérien basé sur des travaux antérieurs (Alferova and Terekhova 1988; Kitouni et al. 2005) comprenant un enrichissement de l'échantillon de sol par CaCO_3 , afin de promouvoir la sporulation et par conséquent le nombre d'actinobactéries sporulantes. A partir de là, quarante isolats ayant une morphologie correspondante aux actinobactéries ont été collectés. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Kitouni *et al.* (2005), qui ont exploré un sol non rhizosphérique de zones arides et ont obtenu un faible nombre d'isolats actinobactériens (8 isolats).

3. Analyse phylogénétique des isolats

Parmi les méthodes de génotypage, nous avons choisi la BOX-RCR pour étudier la diversité des souches isolées. Cette méthode est souvent utilisée pour identifier le génotype des procaryotes. Elle est analogue à la méthode RAPD dont elle diffère par les amorces qui ciblent des séquences d'ADN connues, conservées et répétitives dans le génome bactérien (Versalovic et al. 1991).

L'analyse par BOX-PCR est réalisée sur les 40 isolats afin d'évaluer la diversité globale des échantillons. Tous les profils obtenus ont été numérisés et analysés par le logiciel GelCompar (version 4.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). La comparaison des profils est représentée sous forme de dendrogrammes (figure 17) dans lesquels il est possible d'observer la diversité des isolats, sauf pour C2-C3-C5 et C10-C11-C12 qui forment respectivement deux groupes clonaux. Pour une analyse plus approfondie et la suite du travail, une seule souche de chacun de ces deux groupes a été considérée (C3 et C11). Nous pouvons également constater sur le dendrogramme, que les profils des 40 souches générés permettent de les classer en 4 grands clades (figure 17). Dans chaque clade, nous avons sélectionné certaines souches représentatives pour une analyse ultérieure de leur ADNr 16S.

Le séquençage de l'ADNr 16S a donc été réalisé sur 20 isolats choisis à partir des 4 clades, afin de caractériser les différents groupes obtenus (tableau18).

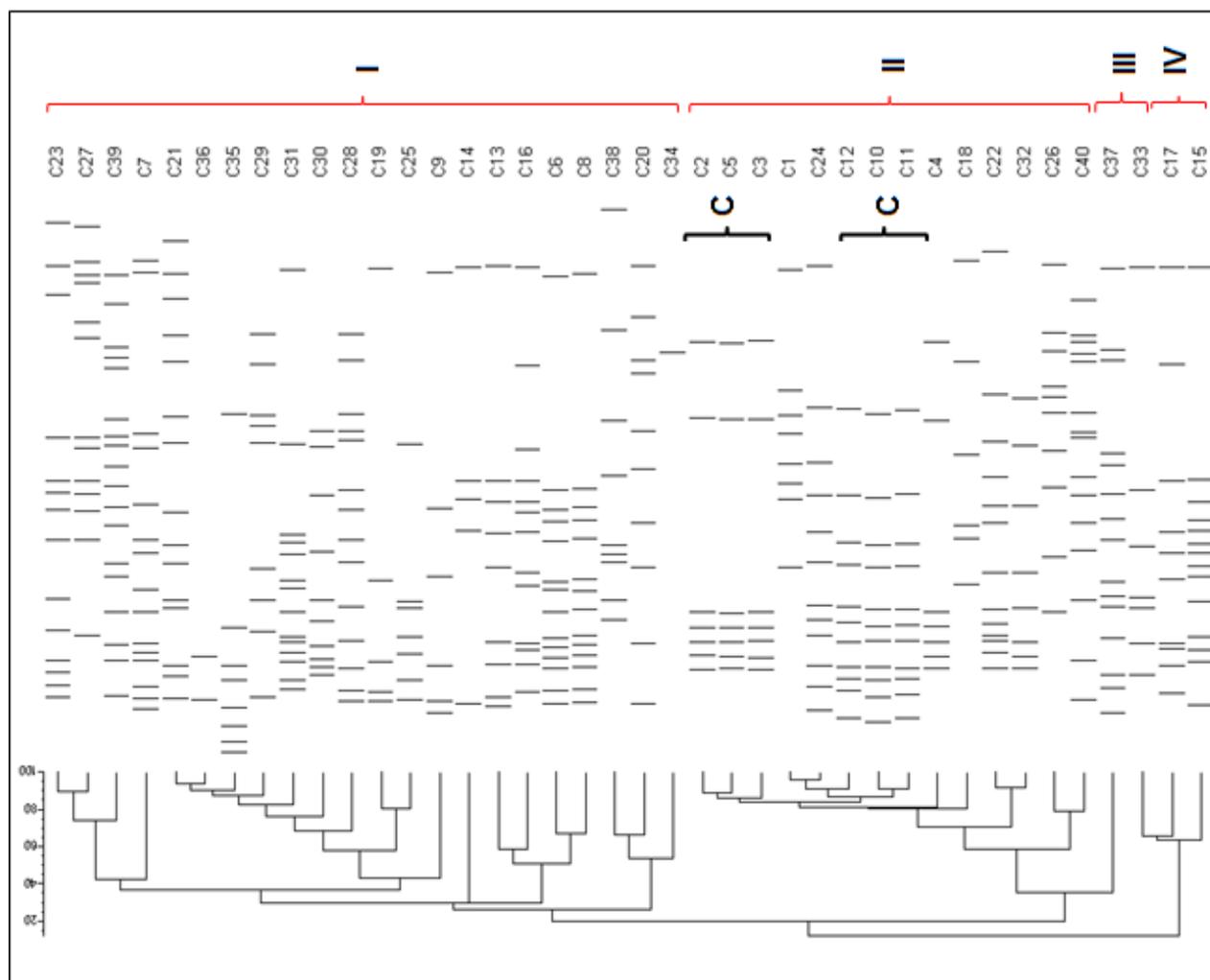


Figure 17 : Dendrogramme déterminé par analyse BOX-PCR montrant la parenté génétique des 40 isolats analysés. Quatre clades phylogénétiques se distinguent. Les isolats indiscernables sont indiqués par le symbole c.

Tableau 18 : Identification taxonomique des isolats.

Souches	Numéro d'Accession	Espèces les plus proches*	Numéros d'accession des souches les plus proches	Identité (%)	Longueur des séquences (pb)
C3	LN864567	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399(T)	AB184650	99.93	1429
C4	LN864568	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399(T)	AB184650	100	1036
C6	LN864569	<i>Streptomyces capillispiralis</i> NBRC 14222(T)	AB184577	98.99	1389
C9	LN864570	<i>Streptomyces griseorubens</i> NBRC 12780(T)	AB184139	99.51	1450
C11	LN864571	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399(T)	AB184650	99.65	1450
C12	LN864572	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399(T)	AB184650	100	1450
C15	LN864573	<i>Streptomyces capillispiralis</i> NBRC 14222(T)	AB184577	98.96	1460
C16	LN864574	<i>Streptomyces capillispiralis</i> NBRC 14222(T)	AB184577	98.97	1359
C17	LN864575	<i>Streptomyces capillispiralis</i> NBRC 14222(T)	AB184577	98.78	1396
C19	LN864576	<i>Streptomyces werraensis</i> NBRC 13404(T)	AB184381	98.84	1389
C20	LN864577	<i>Streptomyces capillispiralis</i> NBRC 14222(T)	AB184577	98.57	1397
C21	LN864578	<i>Streptomyces althiolicus</i> NRRL B-3981(T)	AY999791	99.37	1448
C27	LN864579	<i>Streptomyces thinghirensis</i> DSM 41919(T)	FM202482	96.07	1328
C30	LN864580	<i>Streptomyces heliomycini</i> NBRC 15899(T)	AB184712	99.13	1389
C31	LN864581	<i>Streptomyces speibonae</i> PK-Blue(T)	AF452714	98.83	1369
C32	LN864582	<i>Streptomyces heliomycini</i> NBRC 15899(T)	AB184712	99.71	1365
C33	LN864583	<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC15837(T)	U58532	99.25	1331
C37	LN864584	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i> MC5-1(T)	AB196710	99.11	1354
C39	LN864585	<i>Streptomyces marokkonensis</i> Ap1(T)	AJ965470	99.13	1386
C40	LN864586	<i>Streptomyces marokkonensis</i> Ap1(T)	AJ965470	99.14	1393

*Les pourcentages d'identité inférieurs à 99% sont en gras

L'amplification des ADNr 16S est réalisée en utilisant des amorces universelles (SF1 et SR5) et les chromatogrammes bruts obtenus après séquençage ont été analysés par le logiciel chromas Lite. La comparaison de ces séquences avec celle de GenBank et d'EZtaxon nous a permis d'évaluer la position taxonomique de nos isolats et de construire l'arbre phylogénétique à l'aide du programme Mega version 6.06 (figure 18).

D'après l'arbre phylogénétique présenté sur la figure 18, il en ressort que la majorité des souches sont affiliées au genre *Streptomyces*, sauf pour les souches C33 et C37 qui appartiennent au genre *Micromonospora*.

L'identification des espèces obtenues pour les isolats (C6, C15, C16, C17, C19, C21, C27, C31) est plus incertaine en raison d'un pourcentage de similarité inférieure à 99% (tableau 18). L'analyse phylogénétique de leur gène ADNr 16S a révélé que bon nombre de ces souches est regroupé en un seul clade (II) qui est éloigné des souches de référence de *Streptomyces* les plus proches, ce qui est conforté par un bootstrap élevé (figure 18).

Parmi les souches regroupées dans le clade I, Seule la souche C27 présente un faible pourcentage de similarité avec les espèces de *Streptomyces* les plus proches. Le dernier clade est seulement composé de souches appartenant au genre *Micromonospora* (C33 et C37), ces dernières sont proches de *Micromonospora echinospora* et *Micromonospora chaiyaphumensis*, respectivement.

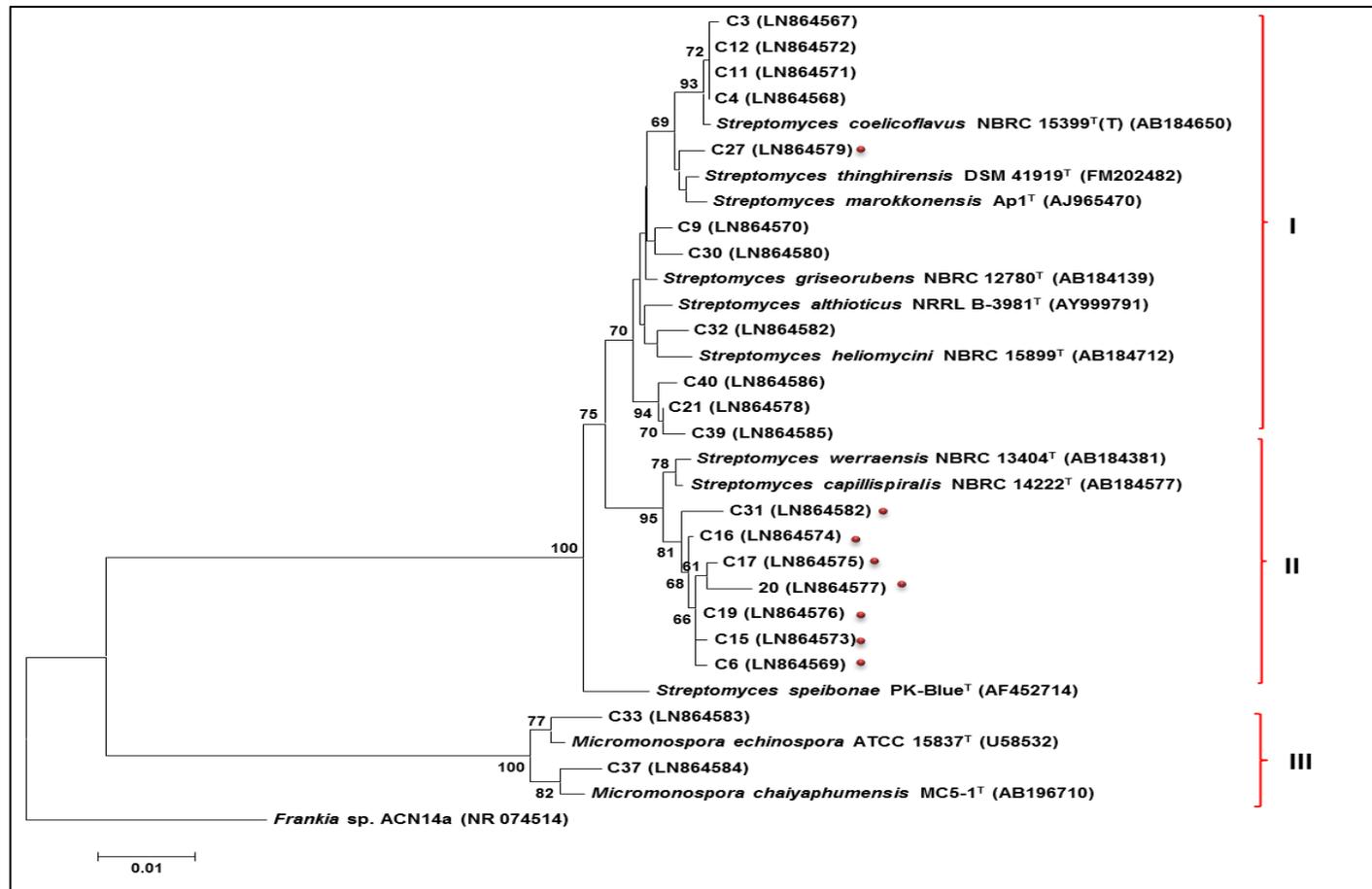


Figure 18 : Arbre phylogénétique selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences d'ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega version 6.0 montrant la position phylogénétique de 20 souches. La matrice des distances est calculée selon le model Kimura à 2 paramètres. Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 bootstrap. 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide. (•) Représente les isolats avec un pourcentage d'identité inférieure à 99%. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Frankia alni* ACN14a a été utilisée comme outgroup.

La Box-PCR est une technique basée sur l'amplification de séquences d'ADN répétitives pour identifier et classer des microorganismes. Cette technique s'est avérée extrêmement fiable, reproductible, rapide et fortement discriminatoire (Versalovic et al. 1994). Elle utilise des amorces complémentaires aux séquences répétitives fortement conservées présentes en copies multiples dans les génomes de la plupart des bactéries à Gram négatif et de plusieurs bactéries à Gram positif. Cette technique permet d'amplifier toutes les zones du génome qui contiennent des séquences nucléotidiques répétitives palindromiques (Lupski and Weinstock 1992). En l'occurrence, l'élément BOX contenant 154 pb qui sont très conservées au sein d'une même espèce (Versalovic et al. 1994; Rademaker and de Bruijn 1997). L'amplification par BOX-PCR permet donc d'obtenir des amplicons de tailles variables qui sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le profil électrophorétique alors obtenu représente une signature hautement discriminante qui permet de différencier les microorganismes. Dans notre étude, l'ensemble des souches isolées a été analysé par cette technique. Ce qui nous a permis d'observer la grande diversité génétique présente entre nos isolats chitinolytiques et nous a permis de sélectionner 20 isolats pour l'identification par l'amplification et le séquençage de leur ADNr 16S. Nous avons utilisé l'amorce BOX-A1R qui était décrite pour la comparaison des souches de *P. aeruginosa* isolées chez des patients atteints de mucoviscidose avec une haute reproductibilité et un haut pouvoir discriminatoire (Syrmis 2004). De plus, Dombek *et al.* (2000) ont comparé la capacité de la REP-PCR et de la BOX-PCR pour distinguer des isolats d'*E. coli* de 7 sources différentes (humain, canard, oie, poulet, porc, mouton et vache) et ont conclu que la discrimination de la BOX-PCR est supérieure à celle de la REP-PCR (Dombek et al. 2000). Cette technique a également été utilisée avec succès pour différencier des souches bactériennes du même genre, telles que *Frankia* (Murry et al. 1995), *Legionella* (Georghiou et al. 1994), *Xanthomonas* et *Pseudomonas* (Louws et al. 1994). Aussi, elle a été utilisée dans l'étude de la diversité des actinomycètes isolés de sédiments marins (Pathom-aree et al. 2006), la caractérisation de *Nocardia asteroides* isolée de différentes niches écologiques (Yamamura et al. 2004) et dans l'isolement d'une nouvelle espèce *Streptomyces gilvigriseus* sp. nov. A partir d'un sol de mangrove (Ser et al. 2015).

L'amplification et le séquençage du gène de l'ADNr 16S des 20 souches sélectionnées nous a permis l'identification de ses dernières. La comparaison des séquences obtenues avec celles disponibles dans les banques de données internationales nous a permis d'évaluer la diversité phylogénétique et la position taxonomique de ces isolats. La plupart des

bactéries ont été identifiées jusqu'au stade de l'espèce, pour d'autres, seule l'appartenance au genre est vérifiée. Leur pourcentage d'identité avec les souches de références les plus proches est inférieur à 99%, ce qui pourrait représenter de nouvelles espèces selon Meier-Kolthoff *et al.*. Il est possible aussi que le fragment d'ADN amplifié n'ait pas une taille suffisante pour une identification fine de ces souches (Meier-Kolthoff *et al.* 2013). Cependant, plus d'analyses phénotypique et génotypique doivent être effectuées pour confirmer les potentielles nouvelles espèces.

L'arbre phylogénétique obtenu (figure 19) représente les relations phylogénétiques entre les séquences nouvellement obtenues et celles de référence. On distingue différents clades éloignés. 90 % des isolats appartiennent au genre *Streptomyces* et 10 % au genre *Micromonopora* (C33 et C37). Ce résultat confirme l'abondance des *Streptomyces* dans les écosystèmes telluriques. Les espèces du genre *Streptomyces* ont la capacité de produire une grande variété d'enzymes extracellulaires et d'antibiotiques (Trejo-Estrada *et al.* 1998) ce qui peut expliquer leur grande capacité à coloniser différents environnements. Ainsi, l'exploration des écosystèmes extrêmes est une approche intéressante pour obtenir de nouvelles espèces potentiellement cultivables source de métabolites secondaires et d'enzymes utiles pour différentes applications.

4. Mise en évidence des actinobactéries productrices de chitinases

Les bactéries produisent des chitinases afin de digérer la chitine et de l'utiliser principalement comme source de carbone et d'énergie. Aussi, le genre *Streptomyces* est considéré comme le principal producteur de chitinases dans le sol. La mise en évidence des bactéries productrices de chitinases sur milieu gélosé, en utilisant la chitine colloïdale comme source unique de carbone et d'azote a été réalisée sur 36 isolats. Les résultats indiquent que toutes les souches sont capables de dégrader la chitine colloïdale dans les conditions standards de pH (pH= 7.0) et température (30 °C). Cette dégradation se traduit sous forme d'halo transparent autour de la colonie (figure 19). Afin d'améliorer l'activité chitinolytique des souches isolées et refléter la gamme complète des conditions environnementales de cet écosystème, différentes conditions physico-chimiques ont été testées.



Figure 19 : dégradation de la chitine colloïdale par les souches actinomycétales isolées.

Tout d'abord, nous avons utilisé le milieu de culture MCC avec trois pH différents (5, 7 et 9). A pH acide, seulement 38,88 % des isolats ont été en mesure de croître, mais lentement par rapport au pH neutre et aucun isolat n'a présenté d'activité chitinolytique (figure 20). A pH 9, tous les isolats ont pu croître et hydrolyser la chitine colloïdale qui se trouvait dans le milieu de culture, exception faite pour trois souches (C33, C36, C37), y compris les deux *Micromonospora* qui ont pu se développer mais sans former d'halo transparent indiquant la présence de chitinases. A l'inverse, l'activité chitinolytiques de plusieurs souches a été améliorée à ce pH basique tel que l'isolat C6 où l'activité chitinolytique était 1,5 fois plus importante par rapport au pH7 (annexe n° 05).

Enfin, neuf (C33, C36, C37, C14, C17, C35, C4, C9, C1) et trois (C6, C30, C40) souches présentent une forte activité chitinolytique significative seulement à pH7 ou pH9, respectivement. Alors que les 24 autres souches sont capables de dégrader la chitine à des niveaux similaires quel que soit le pH utilisé. *S. coelicolor* (témoin) a présenté de manière significative une préférence pour le pH7.

La température s'est également révélée être un facteur important pour les bactéries du sol aride. L'aptitude des souches isolées à hydrolyser la chitine a été testée à différentes températures comprises entre 30 et 50 °C et le rapport CZ/CS a été calculé après 7 jours d'incubation (figure 21). Seule la souche C9 été en mesure de croître à 50 °C, sans pour autant être capable de dégrader la chitine colloïdale dans de telles conditions extrêmes. A 45 °C, 69,44% des souches été en mesure de croître et dégrader la chitine (figure 21), contrairement au témoin (*S. coelicolor*). La souche C37 avait la plus forte activité à 45 °C lorsque la souche

C33 est la plus active à 40 °C, mais pas significativement différente de 30 °C (figure 21). Toutes les souches avaient la capacité de croître à 40 °C, y compris la souche de référence *S. coelicolor*. Pour les actinobactéries testées, l'activité chitinolytiques est maintenue à une température élevée, sauf pour cinq souches (C13, C19, C32, C34, C1, C3, C4) où 30 °C est la température optimale pour l'activité chitinolytiques.

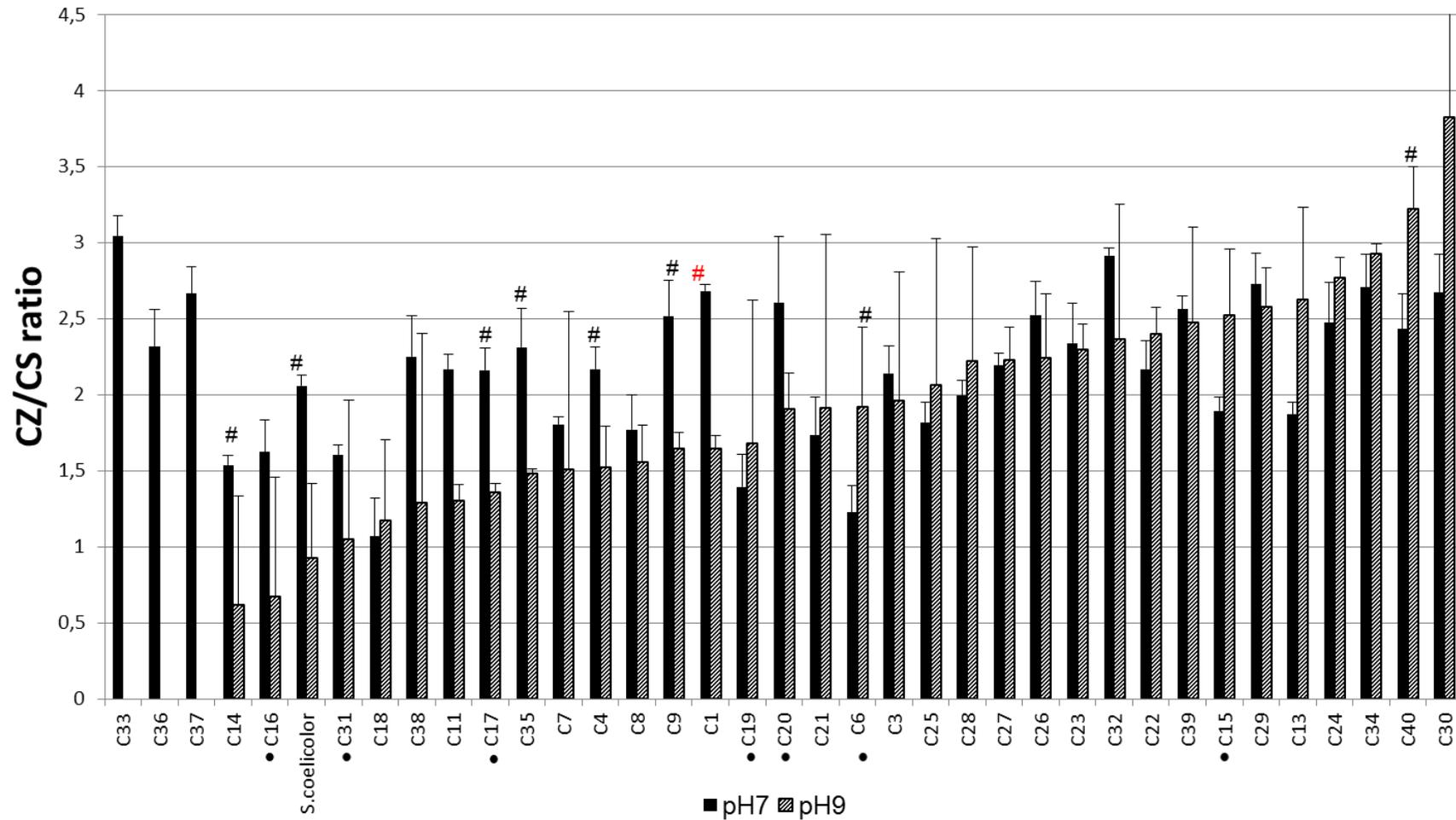


Figure 20 : Activité chitinolytique mesurée à différents pH après 7 jours de croissance. # Différence significative observée entre les deux conditions (tests de Wilcoxon, valeur $p < 0,05$). • souches capables de croître à pH5 mais sans activité chitinolytique.

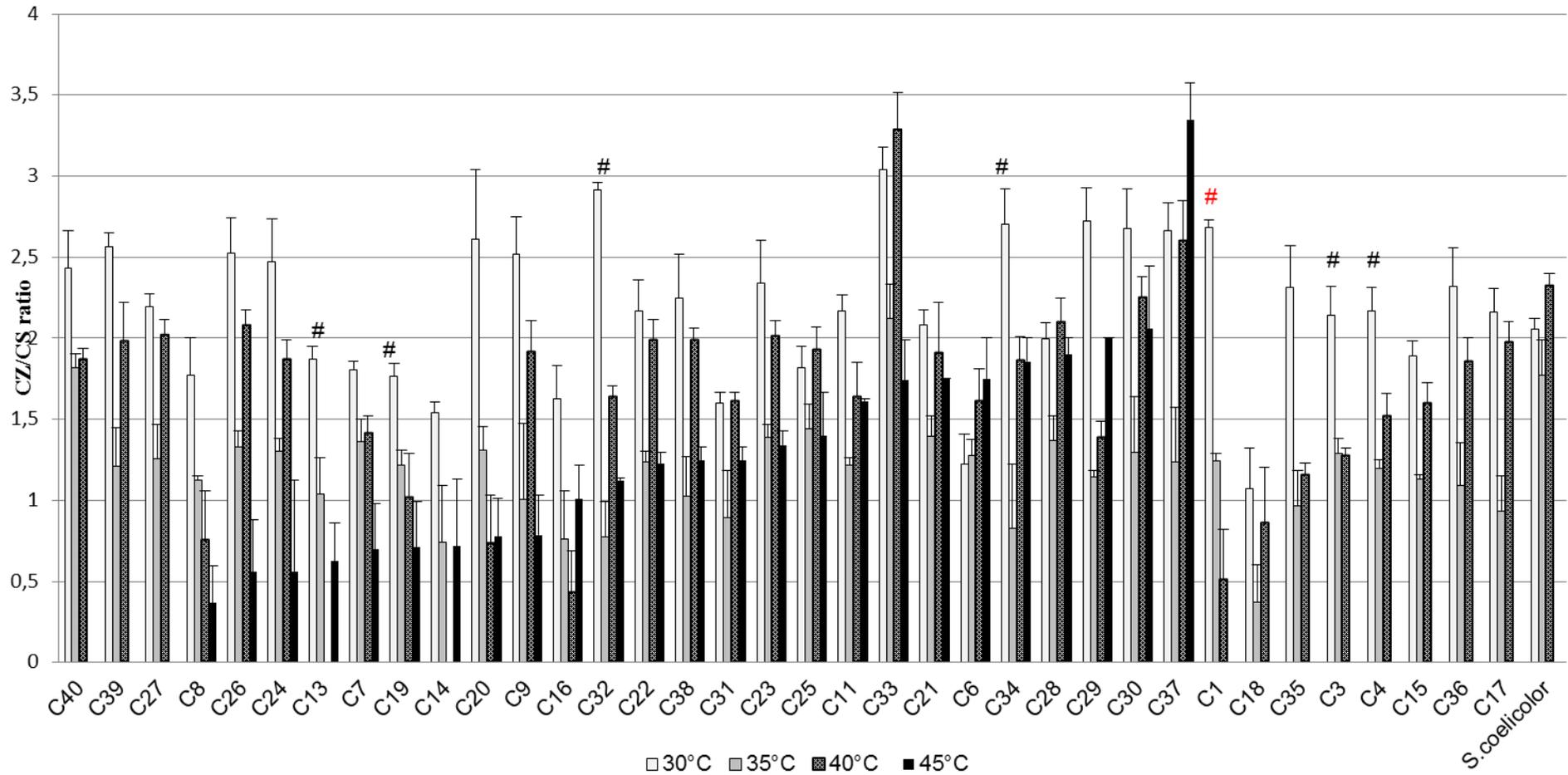


Figure 21 : Activité chitinolytique mesurée à différentes températures après 7 jours d'incubation et trié selon l'activité des souches à 45 °C. Les souches C27, C39 et C40 ne poussent pas à 45 °C et les souches de C1 à *S. coelicolor* sont capables de croître, mais n'ont pas d'activité chitinase à 45 °C. # Différence significative observée à 30 °C (tests de Wilcoxon, $p < 0,05$).

4.1. Répression catabolique et activité antifongique chitinase-dépendante

L'activité chitinolytique peut être réprimée métaboliquement par différentes sources de carbone tel que le glucose. Ce dernier a été reporté comme étant le plus fort répresseur catabolique de l'activité chitinolytique chez *S. lividans* (Miyashita et al. 2000).

Afin d'identifier des souches capables d'inhiber des champignons phytopathogènes grâce à leur activité chitinolytique. Nous avons développé une méthode de criblage rapide, qui consiste en l'utilisation en plus du milieu MCC un second milieu de culture supplémenté de glucose (MCCG). L'activité chitinase serait alors inhibée en présence du glucose et les souches n'auraient pas d'activité antifongique détectable. La répression catabolique a été réalisée sur les 36 souches isolées et mesurée après 5 jours d'incubation à 30 °C (figure 22).

Nous avons identifié 7 souches (C1, C8, C14, C16, C31, C34, C35), où l'activité chitinase a été réprimée de 80 à 100%. Pour les autres souches, presque toutes ont été modérément ou non réprimée par le glucose tel que pour la souche de référence *S. coelicolor*. Cependant, deux souches (C20 et C22) ont eu une activité chitinolytiques augmentée après l'ajout du glucose.

Ce premier criblage est important pour distinguer les souches réprimées ou non après l'addition du glucose. En effet, en utilisant les mêmes milieux de culture, les souches ayant présentée une répression catabolique supérieure à 80% ont été confrontées à deux champignons phytopathogènes, *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum*. Parmi les sept souches testées, la moitié avait une activité antifongique détectable sur milieu MCC, qui était fortement réduite ou absente par l'addition du glucose (tableau 19). La plus forte inhibition sur le milieu MCC a été observée chez la souche C31 contre les deux champignons. Les souches C34 et C35 n'ont inhibées que *B. cinerea* à un niveau modéré et élevé, respectivement. Aucune inhibition n'a été observée pour la souche C16. En ce qui concerne les souches C8 et C14, elles ont la même activité antifongique quel que soit le milieu utilisé. A l'inverse, la souche C1 avait une activité antifongique légèrement plus élevée sur le milieu MCCG même si nous avons précédemment observé que l'activité chitinase été réprimée. La production d'autres métabolites antifongiques induits par le glucose pourrait expliquer ce résultat.

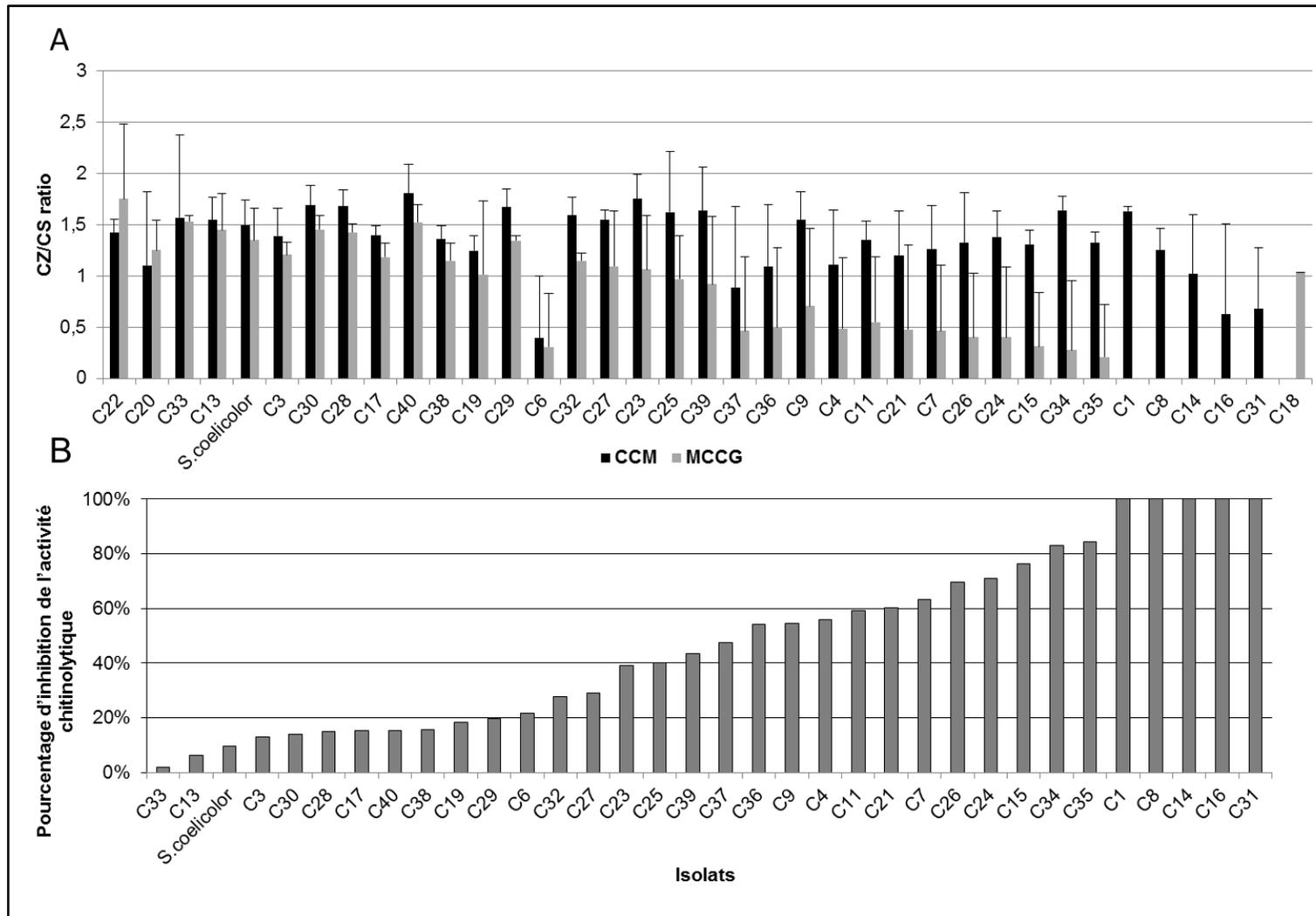


Figure 22 : (A) Activité chitinolytique mesurée (30 °C, pH = 7, 5 jours de croissance) sur le milieu MCC et MCCG. (B) pourcentage d'inhibition de l'activité de chitinase ($\frac{CZ/CS_{MCC} - CZ/CS_{MCCG}}{CZ/CS_{MCC}}$) due à la répression catabolique par le glucose.

Tableau 19 : Antagonisme des actinobactéries isolées contre les deux champignons phytopathogènes et sur deux milieux de culture différents MCC et MCCG.

Souches	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Botrytis cinerea</i>	
	MCC	MCCG	MCC	MCCG
C1	++	++	-	+
C2	++	+	-	-
C4	++	-	++	-
C6	+++	++	+++	++
C7	+++	++	+++	++
C8	++	++	+	+
C9	+++	-	+++	-
C11	++	++	+	+
C13	+	++	+	+
C14	++	++	+	+
C15	+	-	++	+
C16	-	-	-	-
C17	-	-	-	+
C18	+	-	-	-
C19	+	-	-	+
C20	-	-	+	-
C21	+	-	+++	-
C22	+	+	+++	-
C23	+	++	+++	-
C24	+	-	+++	-
C25	-	-	+++	-
C26	+	++	+++	-
C27	-	-	+++	-
C28	-	-	+++	+
C29	+	-	+++	-
C30	++	-	+++	-
C31	+++	-	+++	+
C32	++	-	+++	-
C33	-	-	+++	-
C34	-	-	++	-
C35	-	-	+++	-
C36	-	-	+++	++
C37	+++	++	+++	+++
C38	+++	++	+++	+++
C39	+++	++	+++	+++
C40	++	-	+++	+
<i>S. coelicolor</i>	-	-	+	-

(-) pour l'absence d'inhibition, (+) peu d'inhibition, (++) pour un fort antagonisme, et (+++) pour un très fort antagonisme. Les souches présentant une répression catabolique > 80% sont indiquées en gris.

Notre étude a porté sur le pouvoir de production des chitinases qui pourrait être utilisé comme moyen de biocontrol contre des champignons phytopathogènes. Parmi les 2 milieux de culture utilisés dans l'isolement des actinobactéries, le milieu MCC s'est avéré être le meilleur milieu pour l'obtention d'actinobactéries productrice de chitinases. En effet, les cinq souches possédant une importante activité chitinolytique à un pH alcalin et 45 °C ont été isolées à partir de ce milieu (figure 20 et figure 21). Ainsi, ce milieu semble être le plus approprié pour l'isolement et la mise en évidence rapide des actinobactéries bioactives à fort potentiel chitinolytique. Les souches étudiées ici sont adaptées à des conditions de pH neutres ou légèrement alcalins. Elles sont également adaptées à une température élevée. 75% d'entre elles sont capables de se développer à 45 °C et 25 souches montrent également une forte activité chitinolytique à cette même température. Il est connu que les souches d'actinobactéries appartenant à différents genres tels que certaines espèces du genre *Streptomyces* (Goodfellow et al. 1987; Singh et al. 2014), *Acidotherrmus cellulolyticus* isolé à partir d'une source thermale (Mohagheghi et al. 1986) ou encore *Thermobifida fusca* isolé à partir d'un tas de compost (Song et al. 2001) sont capables de croître à de hautes températures, supérieures ou égales à 45 °C. Dans notre travail, nous avons élargi la portée en incluant le genre *Micromonospora* avec deux souches décrites capables de croître à 45 °C, tout en maintenant une forte activité chitinolytique et en particulier à haute température. En effet, ces deux isolats sont thermophiles facultatifs possédant une activité chitinolytique élevée à 30 °C qui augmente avec l'augmentation de la température. La souche C37 qui est proche de l'espèce *Micromonospora chaiyaphumensis* est la seule souche de notre collection en mesure de maintenir une forte activité à 45 °C, 1,3 fois plus élevée qu'à 30 °C. La souche C33 proche de *Micromonospora echinospora* a une activité plus élevée à 40 °C. En revanche, leur tolérance au pH est restreinte, car ces deux isolats ne peuvent croître qu'à un pH neutre. Ce genre est rarement trouvé lors des cultures et isollements de microorganismes du sol dégradant la chitine (Nawani and Kapadnis 2003). Il pourrait donc offrir un potentiel élevé de nouvelles enzymes cataboliques et des métabolites ayant des caractéristiques spécifiques, soutenues par le fait qu'une étude méta-transcriptomique a montré que parmi les lectures avec des fonctions lignocellulosiques, la plus grande abondance est attribuée à *Micromonospora* (Simmons et al. 2014) suggérant un rôle crucial dans le cycle du carbone du sol.

Une seule souche (C9) affiliée à *Streptomyces griseorubens* est capable de croître à 50 °C. Cette dernière souche est également thermophile facultative, avec une activité chitinolytique élevée à 30 °C.

Les chitinases sont principalement étudiées pour leur potentiel en tant qu'agents de biocontrol contre des champignons phytopathogènes, mais le lien précis entre l'activité de ces chitinases et l'inhibition antifongique est plus difficile à établir. La plupart des études sont basées sur l'inhibition antifongique sur différents milieux de culture sans évaluer la production de chitinases, ce qui peut conduire à une fausse interprétation des résultats. Seuls les travaux menés par Debnath *et al.* (2013) ont essayé d'établir une relation entre ces deux activités en utilisant des extraits bruts prétraités avec un inhibiteur de la chitinase (l'allosamidine) (Debnath *et al.* 2013), qui a permis d'observer une réduction de l'activité antifongique. Des analyses biochimiques en travaillant directement sur les enzymes ont également été utilisées pour identifier la réelle implication de la chitinase comme agent antifongique (Mahadevan and Crawford 1997; Hoster *et al.* 2005a). Par ailleurs, l'expression du gène de la chitinase dans les microorganismes a été rapporté pour être contrôlé par un système de répression/induction dans laquelle la chitine ou ses dérivés sont des inducteurs (Delic *et al.* 1992; Leisner *et al.* 2008). En général, l'induction des chitinases chez les microorganismes dépend de la présence de la chitine dans le milieu de croissance.

A l'inverse, la répression catabolique des chitinases se produit lorsqu'un hydrate de carbone facilement dégradable tel que le glucose est ajouté au milieu de culture (Delic *et al.* 1992; Saito *et al.* 1999; Miyashita *et al.* 2000; Nazari *et al.* 2011). Nous avons utilisé cette propriété pour cultiver les différentes souches dans des conditions où la chitinase est normalement induite par la chitine (MCC) ou réprimée par le glucose (MCCG). Après culture, les souches actinomycétales ont été confrontées à deux différents champignons phytopathogènes (*F. oxysporum* et *B. cinerea*). La souche C31 affiliée à *Streptomyces speibonae* a montré un pouvoir d'inhibition contre les deux champignons, et seulement sur MCC (tableau 19), suggérant l'implication des chitinases dans l'antagonisme. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure la production de métabolites secondaires antifongiques qui pourraient jouer un rôle. En effet, le résultat obtenu pour la souche C1 suggère que d'autres métabolites antifongiques sont également produits. Néanmoins, cette approche pourrait permettre d'identifier rapidement des souches ayant une production de chitinases associée ou non à des propriétés antifongiques. Ainsi, d'autres analyses génomiques sont nécessaires pour bien caractériser les gènes des chitinases et leur répression catabolique. Dans ce cas, une expression hétérologue dans des bactéries non productrices de chitinases peut être réalisée afin de prouver l'implication des chitinases dans l'inhibition des champignons phytopathogènes (Kawase *et al.* 2006).

4.2. Activité antibactérienne des actinobactéries chitinomytiques

L'activité antibactérienne des actinobactéries isolées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 20, d'où il en ressort que sur les 36 isolats, 72,22% d'entre eux sont actifs sur au moins une des bactéries-tests étudiées.

Nous remarquons qu'aucune des souches testées n'est active contre *K. pneumoniae* ATCC70603, qu'elles soient cultivées sur le milieu ISP-2 ou sur le milieu MCC.

Sur le milieu MCC, seules les souches C8, C18, C23, C27, C30 et C35 montrent une activité contre au moins une bactérie-test. Les souches C8 et C18 n'inhibent que *S. aureus* ATCC25923, alors que les souches C30 et C35 possèdent une activité contre *B. cereus* uniquement. Tandis que les souches C23 et C27 ont un pouvoir antagoniste contre toutes les bactéries tests sauf *E. coli* ATCC25922 et *K. pneumoniae* ATCC70603 (figure 23).

Sur milieu ISP-2, tous les isolats possèdent une activité antibactérienne contre *E. coli* ATCC25922, excepté la souche C15. Nous remarquons également que les souches C23 et C27 possèdent un pouvoir inhibiteur contre toutes les bactéries test sauf *K. pneumoniae* ATCC70603.

Dans des études antérieures, il a été démontré que le taux d'isolement d'actinobactéries productrices d'antibiotiques est supérieur à 40 % (Lemriss et al. 2003) et dans d'autres moins de 10 % (Boudemagh et al. 2005; Kitouni et al. 2005; Boughachiche et al. 2005). Dans notre étude, le pourcentage d'actinomycètes à activité antibactérienne est de plus de 72 % et l'activité antibactérienne la plus intense est obtenue avec le milieu ISP-2 (tableau 21). D'après Aharonowitz et Demain (1978) ; Ogawa *et al.* (1986) ; Sanchez et Demain (2002) et Nakashima *et al.* (2016), la nature et la concentration des composants du milieu de culture ont un effet remarquable sur la capacité et la quantité de métabolites secondaires produites par le microorganisme en question (Aharonowitz and Demain 1978; Ogawa et al. 1987; Sanchez and Demain 2002; Nakashima et al. 2016).

Tableau 20 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu ISP-2 et MCC.

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>S. aureus</i> ATCC 43300		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i> ATCC25922		<i>K. pneumoniae</i> ATCC70603		<i>Enterobacter</i> <i>sp.</i>	
	ISP-2	MCC	ISP-2	MCC	ISP-2	MCC	ISP-2	MCC	ISP-2	MCC	ISP-2	MCC
C1	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-
C3	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-
C4	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-
C6	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-
C7	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-
C8	++	+	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C13	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C15	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
C16	-	-	++	-	-	-	++	++	-	-	++	-
C17	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C18	++	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C19	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C22	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C23	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	++	++
C25	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C26	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	++	-
C27	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	++	++
C28	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C29	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C30	++	-	++	-	-	-	++	++	-	-	++	-
C31	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C32	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C33	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-
C34	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
C35	-	-	++	-	-	-	++	++	-	-	-	-
C36	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Zone d'inhibition <10 mm, (++) Zone d'inhibition ≥10mm, (-) Absence de zone d'inhibition.

Tableau 21 : Pourcentage des souches d'actinomycètes actives cultivées sur les milieux ISP-2 et MCC.

Milieux de culture	Pourcentage (%) d'actinomycètes actifs contre :				
	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. aureus</i> ATCC43300	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>Enterobacter</i> <i>sp.</i>
ISP-2	16,66 (6)	47,22 (17)	8,33(3)	66,66 (24)	30,55 (11)
MCC	11,11 (4)	5,55 (2)	5,55(2)	8,33 (3)	5,55 (2)

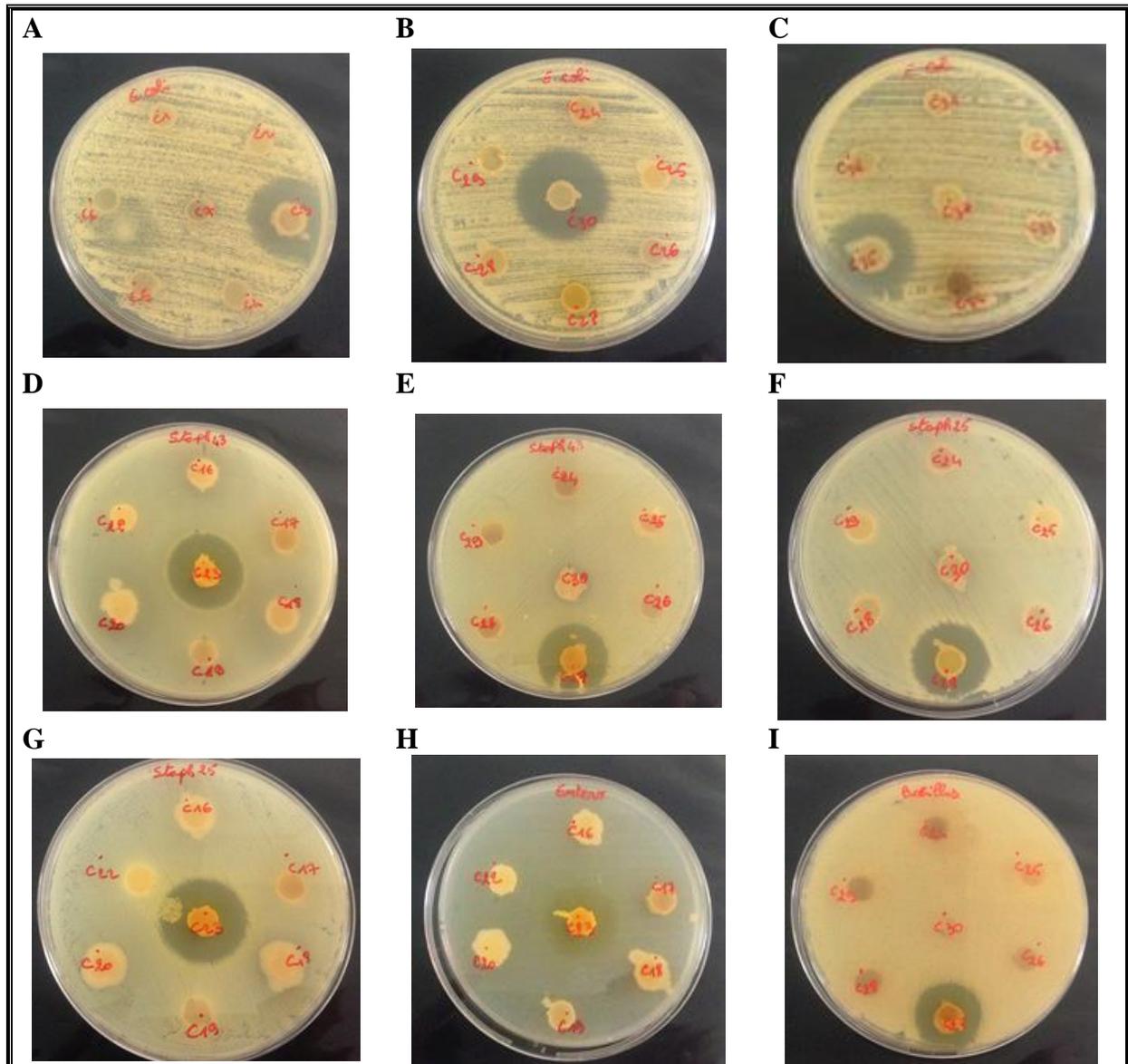


Figure 23 : Test d'activité antibactérienne de quelques souches contre : (A ; B ; C) *E. Coli* ; (D et E) *S. aureus* ATCC 43300 ; (F et G) *S. aureus* ATCC 25923 ; (H) *Enterobacter* sp. et (I) *B. cereus*.

5. Optimisation d'un milieu de culture pour la production des chitinases

Les conditions de culture et la composition du milieu de base de la fermentation peuvent affecter de manière significative la production des chitinases. Des études sur l'activité chitinolytique chez *Pseudomonas fluorescens* a montré des différences des diamètres des zones claires sur des milieux à base de chitine avec des compositions variables (Nielsen and Sørensen 1999). De ce faite, nous nous sommes penchés sur la recherche d'un milieu de culture abordable et adéquat à la production des chitinase chez *Streptomyces griseorubens* C9. Dans notre étude, les cultures sont réalisées dans un incubateur à 150 rpm et 40 °C, pendant 7 jours. Des études réalisées par Reynolds sur *Streptomyces* sp. (Reynolds 1954) ont donné une

activité chitinolytique maximale après 7 jours d'incubation qui diminue par la suite, ce qui est cohérent avec nos observations.

Les méthodes classiques de l'optimisation des milieux de culture, tel que l'approche d'un facteur à la fois, sont longues, coûteuses et difficiles à réaliser quand un grand nombre de variables doit être exploré. Aussi, ce genre de méthodes ne permet pas de détecter les interactions entre les multiples facteurs impliqués. De ce fait, l'utilisation des plans statistiques tels que les plans d'expériences pour l'optimisation des milieux de culture peut pallier aux limites des méthodes classiques. En effet, l'outil statistique est utilisé dans de nombreux procédés biotechnologiques, à savoir l'optimisation des conditions de culture (Huang et al. 2010), la production de la biomasse (Yu et al. 1997), d'éthanol (Ergun and Mutlu 2000), des enzymes (Treichel et al. 2010), ainsi que dans l'optimisation du rendement des produits recombinants tels que l'actinorhodine (Elibol 2004), le lysozyme (Gheshlaghi et al. 2005), la protéase alcaline (Adinarayana and Ellaiah 2002) et l'hirudine (Rao et al. 2000).

Dans notre étude, l'optimisation des milieux de culture a été réalisée en deux étapes ; la première étant la sélection des variables ayant un effet significatif sur la production de chitinases en utilisant le plan d'expérience de Plackett-Burman (Plackett and Burman 1946), la deuxième étape consiste à déterminer les optimums des paramètres sélectionnés par le plan des composites centrés Box-Wilson (Box and Wilson 1951) et déterminer leurs corrélations par la méthode des surfaces de réponse (RSM). Cependant, peu d'études ont été menées pour la production de chitinases utilisant le plan de Plackett-Burman et la méthodologie des surfaces de réponse (Singh et al. 2009).

5.1. Sélection des facteurs influençant la production de chitinase par la souche C9

L'effet de 19 facteurs sur l'activité chitinolytique de la souche C9 a fait l'objet d'un criblage avec un plan statistique de Plackett-Burman. Les facteurs utilisés ainsi que leurs valeurs réelles sont consignés dans le tableau 12. Ces plans sont utilisés dans l'optimisation des milieux de culture pour les productions de plusieurs de métabolites, comme la production d'acides gras (Chodok et al. 2010), la production de laccase par *Pleurotus florida* NCIM 1243 (Palvannan and Sathishkumar 2010), d' α -amylase (Oussadi and Kitouni 2015) ou encore de chitinases (Gasmi and Kitouni 2017).

L'examen du tableau 11 indique que les réponses obtenues en termes d'activité chitinolytique, estimées par la méthode DNS varient de 1,116 (essai 8) à 7,476 U/ml (essai 1). Cependant une analyse plus minutieuse sera utilisée afin d'évaluer l'effet de chaque facteur pour une réponse donnée.

Les résultats des expériences de l’optimisation sont présentés dans le tableau 22 et sont analysés en utilisant le logiciel STATISTICA version 12,0 (Dell, Inc. 2015), afin de calculer les coefficients de régression des équations. La signification de chaque coefficient est déterminée par les valeurs de t et les valeurs de p correspondantes (tableau 22).

Tableau 22 : Analyse statistique des résultats du plan Plackett-Burman pour la production des chitinases par la souche C9.

Facteurs	Effets	valeur- t	valeur - p -	Coefficients
Constante	3,98400	26,15835	0,000013	3,984000
A : pH	-0,96300	-3,16146	0,034136	-0,481500
B : chitine Colloïdale	-1,22320	-4,01567	0,015921	-0,611600
C : Mélasse de date	3,06060	10,04772	0,000552	1,530300
D : Dummy	-	-	-	-
E : Lactosérum	1,08560	3,56394	0,023503	0,542800
F : Peptone	-0,087400	-2,86928	0,045502	-0,437000
G : Caséine	-0,36480	-1,19761	0,297183	-0,182400
H : Dummy	-	-	-	-
I : Tryptone	-0,67400	-2,21269	0,091352	-0,337000
J : Extrait de levure	-1,95500	-6,41812	0,003029	-0,977500
K : Sulfate d’ammonium	-0,14760	-0,48456	0,653326	-0,073800
L : Dummy	-	-	-	-
M : PO₄	1,21000	3,97234	0,016506	0,605000
N : Trace éléments	0,96360	3,16343	0,034072	0,481800
O : Ecrevisse	0,88980	2,92115	0,043194	0,444900
P: Dummy	-	-	-	-
Q : Champignon	1,03940	3,41227	0,026971	0,519700
R : Crevette	-0,08680	-0,28496	0,789822	-0,043400
S : NaCl	0,90320	2,96514	0,041343	0,451600

$R^2 = 0,98429$, Adj. $R^2 = 0,92537$.

Les valeurs de p inférieures à 0,02, indiquent que les coefficients sont très significatifs. Le coefficient de régression et le coefficient de détermination (R^2) montrent que

notre modèle est hautement significatif ($P < 0,02$) et $R^2 = 0,98429$, ce qui indique que 98,4% de la réponse pourrait être expliquée par ce modèle. Selon Prajapati *et al.*, (2015), le coefficient de détermination est une mesure globale pour la qualité du modèle (Prajapati et al. 2015). La valeur élevée de t et la valeur faible de p indiquent une grande signification du coefficient correspondant. Ainsi, les variables ayant des coefficients négligeables ($P > 0,02$) ont été omises. La production des chitinases par *S. griseorubens* C9 est significativement influencée par 4 principaux facteurs : la mélasse de datte ($P = 0,000552$), l'extrait de levure ($P = 0,003029$), les PO_4 (K_2HPO_4 , KH_2PO_4) ($P = 0,016506$) et la chitine colloïdale ($P = 0,015921$). Parmi eux, la mélasse de datte et les PO_4 exercent un effet positif sur la production enzymatique, tandis que les deux autres variables entraînent des effets négatifs. Compte tenu des résultats obtenus et après exclusion des variables non significatives (valeurs de $P > 0,02$), l'équation de l'effet des variables sur la production de la chitinase s'écrit comme suite :

$$Y = 3.984 - 1.22B + 3.06C - 1.95J + 1.21M \quad (4)$$

Où B = chitine colloïdale, C = mélasse de datte, J = extrait de levure et M = PO_4 .

Les plans d'expérience de Plackett-Burman sont bien établis et largement utilisés dans les modèles statistiques, pour la mise en évidence des variables importantes et leurs niveaux de signification (Box 1952). Et par conséquent, la sélection des composants des milieux de culture nécessaires pour la production de métabolites ciblés. Les résultats des expériences de Plackett-Burman ont révélé que la chitine colloïdale ; la mélasse de datte ; les PO_4 (K_2HPO_4 , KH_2PO_4) et l'extrait de levure ont des effets significatifs sur la production de chitinases par *Streptomyces griseorubens* C9.

Les sources de carbone sont des facteurs importants pour la production enzymatique, en particulier lorsqu'elles jouent le rôle d'inducteur d'enzyme. Des études ont démontré que la chitine colloïdale est le meilleur substrat pour la production de chitinases chez *Microbispora* sp. (Nawani and Kapadnis 2005). Andronopoulou et Vorgias (2004) ont également rapporté que la chitine colloïdale est la meilleure source de chitine pour la production de chitinase par *Thermococcus chitonophagus* (Andronopoulou and Vorgias 2004). Aussi, on a constaté une faible production de chitinases lors de l'utilisation de certaines sources de chitine (à partir d'insectes ou de champignons), ce qui est en accord avec nos observations. Par contre, chez *Metarrhizium anisopliae*, une bonne production de chitinases a été trouvée en utilisant des flocons de chitine plutôt que la chitine colloïdale (St Leger et al. 1986). L'importance de la

nature de la chitine dans l'obtention de rendements élevés de chitinases chez *Serratia marcescens* a été documentée par Monreal et Reese (Monreal and Reese 1969).

La mélasse de datte a été utilisée comme une autre source de carbone dans cette étude. Elle a montré un effet positif significatif sur la production de chitinases par *Streptomyces griseorubens* C9. Les dattes sont connues pour être riches en glucides (principalement le glucose et le fructose) ainsi qu'en minéraux et en vitamines, mais leur teneur en protéines est faible (1,5-3%, p/p) (Kamel 1979; Nancib et al. 2001). La mélasse de datte a déjà été utilisée pour optimiser la production d'acide citrique par fermentation (Roukas and Kotzekidou 1997), mais jamais pour la production de chitinase.

Les sources d'azote peuvent aussi affecter la production des chitinases, dans notre étude, l'ajout du sulfate d'ammonium au milieu de culture n'a pas eu d'effet sur la production des chitinases. Cependant, cette production semble être affectée par l'addition d'extrait de levure, son effet est négatif et significatif. Cet effet négatif est dû probablement à une concentration excessive de l'extrait de levure, qui peut inhiber la production de l'enzyme lorsque la concentration est supérieure à une valeur critique (Pedersen and Nielsen 2000). Chez *Streptomyces* sp., Nawani et Kapadnis ont indiqué que la diminution de la concentration d'extrait de levure et du sulfate d'ammonium peut favoriser la production de chitinase (Nawani and Kapadnis 2005). D'autres études ont montré que la production des chitinases peut être améliorée par l'addition d'extrait de levure chez *Serratia marcescens* (Monreal and Reese 1969), *Aspergillus carneus* (Sherief et al. 1991), *Alcaligenes xylosoxydans* et *Paenibacillus sabina* souche JD2 (Vaidya et al. 2001; Patel et al. 2007). L'ajout de la peptone et du lactosérum n'a pas montré d'effet sur la production des chitinases. Ce qui est en accord avec les travaux de Singh *et al.*, qui ont découvert que la production de chitinase par *Paenibacillus* sp. D1 été réduite en présence de peptone (Singh et al. 2009). Des observations similaires ont aussi été décrites par Han *et al.*, (2009) chez *Streptomyces* sp. Da11 (Han et al. 2009). Alors que Gohel *et al.*, (2007) ont rapporté un effet significatif de l'urée, l'extrait de levure et la peptone sur la production de chitinase par *Pantoea dispersa* (Gohel and Naseby 2007).

Les oligo-éléments n'ont pas d'effet sur la production des chitinases. Ces résultats sont probablement dus à la quantité excessive d'oligo-éléments à laquelle s'ajoute celle apportée par le lactosérum.

Les sels minéraux sont non seulement importants pour la croissance des microorganismes, mais aussi pour la production des enzymes et leur activité. L'anion PO_4^{3-}

joue un rôle régulateur important dans la synthèse des métabolites primaires et secondaires chez les microorganismes (Dean 1972). Nos résultats ont montré que les concentrations des PO_4 (KH_2PO_4 , K_2HPO_4) régulent positivement la production des chitinases chez *Streptomyces griseorubens* C9. Les ions K^+ sont connus pour être nécessaires aux différentes activités physiologiques. En plus de l'effet tampon de KH_2PO_4 et K_2HPO_4 , ils sont utilisés comme source de PO_4^{3-} et d'ions K^+ (Prescott 2010). Le K_2HPO_4 a été identifié comme étant la meilleure source de phosphore pour la production de chitinases par *Paenibacillus* sp. D1. (Singh et al. 2009). Nawani et Kapadine ont décrit que des concentrations peu élevées des PO_4 étaient plus favorables à la production de chitinase chez *Streptomyces* sp. (Nawani and Kapadnis 2005), ce qui a été démontré dans le tracé des surfaces de réponse de cette étude (figure 24). Les résultats ci-dessus indiquent que le plan de Plackett-Burman est un outil approprié pour examiner les effets des constituants du milieu de culture sur la production des chitinases.

5.2. Détermination des optima

L'étude des effets de l'interaction entre les facteurs est réalisée par le plan composite centré (CCD) de Box et Wilson (1951) couplé à la méthodologie de surface de réponse (RSM). Ceux sont des outils efficaces et considérablement utilisés au niveau industriel. Leur rôle dans l'optimisation des milieux de culture est de définir les concentrations optimales des variables importantes préalablement déterminées par le plan de Plackett-Burman (Wang and Liu 2008; He et al. 2009). Ces méthodes ont été largement utilisés pour optimiser le processus de fermentation où de nombreux facteurs et leurs interactions affectent la réponse souhaitée, tels que la production de l'hirudine par de *Saccharomyces cerevisiae* (Rao et al. 2000), la production d'enzyme (Zhang et al. 2001; Prajapati et al. 2015; Oussadi and Kitouni 2015; Gasmi and Kitouni 2017), la production de l'acide citrique (Bari et al. 2009) ou encore, l'optimisation des milieux de culture pour la croissance de *Haematococcus plu vialis* (Gong and Chen 1997).

Le tableau 13 montre les valeurs réelles et codées des variables sélectionnées pour le plan des composites centrés. Aussi, le tableau 23 décrit les valeurs prédites et observées de la réponse (activité de chitinase) générée par ce plan.

Une analyse de régression multiple a été appliquée sur les données expérimentales (tableau 24), et une équation polynomiale du second degré a été déterminée pour expliquer la production de la chitinase par *Streptomyces griseorubens* C9 :

$$Y = 1,557 + 0,062A + 1,295B - 0,411C - 2,208D + 0,468A^2 + 1,051B^2 + 0,677C^2 + 1,264D^2 - 0,034 AB - 0,191AC - 0,058AD + 0,049BC + 0,362 BD - 0,040CD \quad (5)$$

Où A= chitine colloïdale, B = mélasse de datte, C= extrait de levure et D = PO₄ (K₂HPO₄, KH₂PO₄).

Tableau 23 : Matrice du plan composite centré de Box et Wilson à quatre facteurs (valeurs codées), avec l'activité chitinolytique de la souche C9 comme réponse.

N° d'essai	Variables				Activité chitinolytique (U/ml)	
	X1	X2	X3	X4	Observée	Prédite
1	-1	-1	-1	-1	7,421	6,368
2	1	-1	-1	-1	9,226	7,061
3	-1	1	-1	-1	9,358	8,204
4	1	1	-1	-1	9,785	8,758
5	-1	-1	1	-1	6,987	5,908
6	1	-1	1	-1	6,206	5,837
7	-1	1	1	-1	9,752	7,944
8	1	1	1	-1	9,456	7,732
9	-1	-1	-1	1	1,855	1,426
10	1	-1	-1	1	1,786	1,884
11	-1	1	-1	1	6,051	4,710
12	1	1	-1	1	6,104	5,029
13	-1	-1	1	1	1,487	0,804
14	1	-1	1	1	1,497	0,497
15	-1	1	1	1	4,275	4,287
16	1	1	1	1	4,498	3,841
17	-2	0	0	0	1,471	3,306
18	2	0	0	0	1,527	3,553
19	0	-2	0	0	1,763	3,171
20	0	2	0	0	5,897	8,351
21	0	0	-2	0	2,948	5,089
22	0	0	2	0	1,720	3,442
23	0	0	0	-2	7,775	11,033
24	0	0	0	2	1,596	2,200
25	0	0	0	0	1,546	1,557
26	0	0	0	0	1,563	1,557
27	0	0	0	0	1,582	1,557
28	0	0	0	0	1,537	1,557

Tableau 24 : Effets estimés des variables et coefficient de régression de la production de la chitinase par la souche *Streptomyces griseorubens* C9.

Variabiles	Effets	valeur- <i>t</i>	valeur - <i>P</i>	Coefficients de régression
Constante	1,557	1,517	0,153	1,557
A	0,124	0,147	0,884	0,062
B	2,590	3,090	0,008	1,295
C	-0,823	-0,982	0,343	-0,411
D	-4,416	-5,269	0,0001	-2,208
A*A	0,936	1,117	0,284	0,468
B*B	2,102	2,508	0,026	1,051
C*C	1,354	1,616	0,130	0,677
D*D	2,529	3,018	0,009	1,264
A*B	-0,069	-0,067	0,946	-0,034
A*C	-0,382	-0,372	0,715	-0,191
A*D	-0,117	-0,114	0,910	-0,058
B*C	0,099	0,096	0,924	0,049
B*D	0,724	0,705	0,492	0,362
C*D	-0,081	-0,079	0,938	-0,040

L'analyse statistique des variables présente un coefficient de détermination $R^2 = 0,79899$. Cela signifie que 79,89 % de la variation de la production de la chitinase peut être expliquée par ce modèle. Donc, ce modèle confirme la forte relation qui existe entre la production de la chitinase et les variables sélectionnées. Le tableau 25 montre que R^2 prédit concorde plus ou moins avec R^2 ajusté (58,25%). L'analyse de la variance confirme les résultats de R^2 et le Test *F* de Fisher montre une faible valeur de *P* (<0,01) seulement pour deux facteurs (mélasse de datte et PO_4). De ce faite, une seconde analyse de régression multiple a été appliquée sur les données expérimentales, et ne prenant en compte que les effets significatifs du modèle. Ce qui a donné une seconde équation polynomiale du second degré afin d'expliquer la production de la chitinase par *Streptomyces griseorubens* C9 :

$$Y = 2.93 + 1.295B - 2.208D + 0.362 B * D + 0.822B^2 + 1.035D^2 \quad (6)$$

Où B = mélasse de datte et D = PO_4 (K_2HPO_4 , KH_2PO_4).

L'analyse statistique des variables les plus significatives indique un coefficient de détermination $R^2 = 0,7323$. Cela signifie que 73,23% de la variation de la production de la chitinase peut être expliqué par ce modèle, que ce modèle est représentatif du système et confirme la forte relation qui existe entre la production de la chitinase et les deux facteurs

sélectionnés. Le R^2 prédit concorde avec le R^2 ajusté (67,14%) indiquant un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites pour la production de l'enzyme (Bari et al. 2009).

Tableau 25 : Analyse de la variance pour l'activité chitinolytique du plan de composite centré.

Modèle	SC	dl	MC	valeur-F	valeur -P
A	0,091	1	0,091	0,021	0,088
B	40,256	1	40,256	9,553	0,008
C	4,070	1	4,070	0,956	0,343
D	117,023	1	117,023	27,772	0,0001
A*A	5,262	1	5,262	1,248	0,284
B*B	26,516	1	26,516	6,293	0,026
C*C	11,005	1	11,005	2,611	0,130
D*D	38,398	1	38,398	9,112	0,009
A*B	0,019	1	0,019	0,004	0,946
A*C	0,585	1	0,585	0,138	0,715
A*D	0,055	1	0,055	0,013	0,910
B*C	0,039	1	0,039	0,009	0,924
B*D	2,096	1	2,096	0,497	0,492
C*D	0,026	1	0,026	0,006	0,938
Erreur résiduelle	54,777	13	4,21		

SC: somme des carrés; dl: degré de liberté; MC: moyenne des carrés; $R^2 = 0.79899$; R^2 ajusté = 0.58252.

L'analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle réduit confirme les résultats de R^2 et le Test F de Fisher avec une valeur très faible de P ($< 0,0001$) indiquent que le modèle est très significatif (tableau 26) et adéquat pour la production de l'enzyme chez *Streptomyces griseorubens* C9. La valeur de la probabilité (P) est utilisée comme un outil afin de déterminer l'importance de chaque facteur, qui à son tour est nécessaire pour comprendre la signification des interactions entre les variables. Plus la valeur de P est faible, plus le coefficient correspondant est significatif.

Le tableau 26 montre que les effets linéaires des variables (mélasse de datte et les PO_4) sont forts et leurs effets quadratiques sont importants et significatifs pour la production de la chitinase par *S. griseorubens* C9. L'interaction des deux paramètres n'a aucun effet sur la production de l'enzyme. Les deux autres variables (chitine colloïdale et extrait de levure) n'ont aucun effet significatif sur la production de la chitinase par *S. griseorubens* C9.

Les résultats montrent également que la valeur de Fisher et celle de P pour le test de manque d'ajustement (lack of fit) est de 40.9865 et 1.708×10^{-8} , respectivement (tableau 27). Ces valeurs suggèrent également que les données expérimentales obtenues sont en bonne adéquation avec le modèle.

Tableau 26 : Effets estimés des variables et coefficients de régression de la production de la chitinase du modèle réduit.

Variables	Effets	valeur- t	valeur - P	Coefficients de régression
Constante	2,93170	5,0909	4,229e-05	2,93170
B	2,59024	3,4841	0,002103	1,29512
D	-4,41633	-5,9403	5,602e-06	-2,20816
B*D	0,72402	0,7952	0,435014	0,36201
B*B	1,64410	2,3311	0,029313	0,82205
D*D	2,07161	2,9372	0,007624	1,03580

Tableau 27 : Analyse de la variance (ANOVA) pour l'activité chitinolytique du modèle réduit.

Model	SC	dl	MC	F-value	P-value
B	40,2562	1	40,2562	12,13898	0,002103
B*B	18,0203	1	18,0203	5,43391	0,029313
D	117,0238	1	117,0238	35,28771	0,000006
D*D	28,6104	1	28,6104	8,62727	0,007624
B*D	2,0968	1	2,0968	0,63228	0,435014
Erreur résiduelle	72,9581	22	3,3163		
Lack of fit	63.193	3	21.064	40.9865	1.708e-08
Erreur pure	9.765	19	0.514		

$R^2 = 0,7323$; R^2 ajusté = 0,6714.

5.3. Tracés des surfaces de réponse et Calcul des optima

Les surfaces de réponse 3D élaborées pour illustrer les effets des variables indépendantes les plus significatives et leur effet combiné sur la réponse (activité chitinolytique), indiquent que les réponses optimales se situent dans les limites supérieures de la conception. Les surfaces de réponse de la chitinase sont représentées dans la figure 24, montrant des effets relatifs de chacun des deux facteurs étudiés lorsque les deux autres facteurs sont maintenus à leur niveau central. La méthodologie RSM est très efficace dans la

détermination des conditions optimales pour la production des enzymes (Abdel-Fattah et al. 2013; Dave 2015).

Dans la figure 24 (E) où on a fixé les variables : chitine colloïdale et extrait de levure et fait varier la mélasse de datte et les PO_4 . Nous constatons qu'il existe deux effets significatifs : un effet linéaire de la mélasse de datte et des PO_4 et un effet quadratique. Cependant, nous notons l'absence de l'effet d'interaction entre la mélasse de datte et les PO_4 . Nous pouvons également observer une augmentation de la production de la chitinase avec la hausse des concentrations de la mélasse de datte. Contrairement aux PO_4 , où leur addition à de faibles concentrations permet d'augmenter la production de l'enzyme. L'augmentation des concentrations des PO_4 a montré une faible diminution dans la production des chitinasés, ce qui est peut-être dû à l'effet négatif de l'augmentation de la pression osmotique cytoplasmique (Pan et al. 2008). La forme circulaire du tracé de contour indique qu'il n'existe aucune interaction significative entre ces variables (figure 24).

La forme concave de la surface de réponse, indique que nous pouvons trouver une valeur optimale pour la réponse dans la gamme des variables étudiées, ce qui pourrait être due à la signification statistique des effets quadratiques de ces variables.

Les optima des facteurs utilisés sont obtenus par le calcul des dérivées partielles de l'équation (6), ce qui permet de déterminer les coordonnées codées des extremums qui sont ensuite convertis en valeurs réelles traduisant les valeurs optimales des facteurs retenus (mélasse de datte et PO_4) (tableau 28). Les deux autres facteurs ont été maintenus à leur niveau zéro respectif. D'après cette étude statistique, la valeur optimale prédit une activité chitinolytique de 0,902 U / ml. L'essai en conditions optimales a permis l'obtention d'une activité chitinolytique de 1,53 U / ml. Ce qui indique que le modèle utilisé est adéquat pour la production de l'enzyme.

Tableau 28 : Coordonnées codées des extremums des facteurs étudiés et leurs valeurs réelles.

Facteurs	Valeurs codées	Valeurs réelles
Mélasse de datte	-1,064	0,47%
PO_4 (K_2HPO_4 , KH_2PO_4)	1,252	1,81 (g / l),

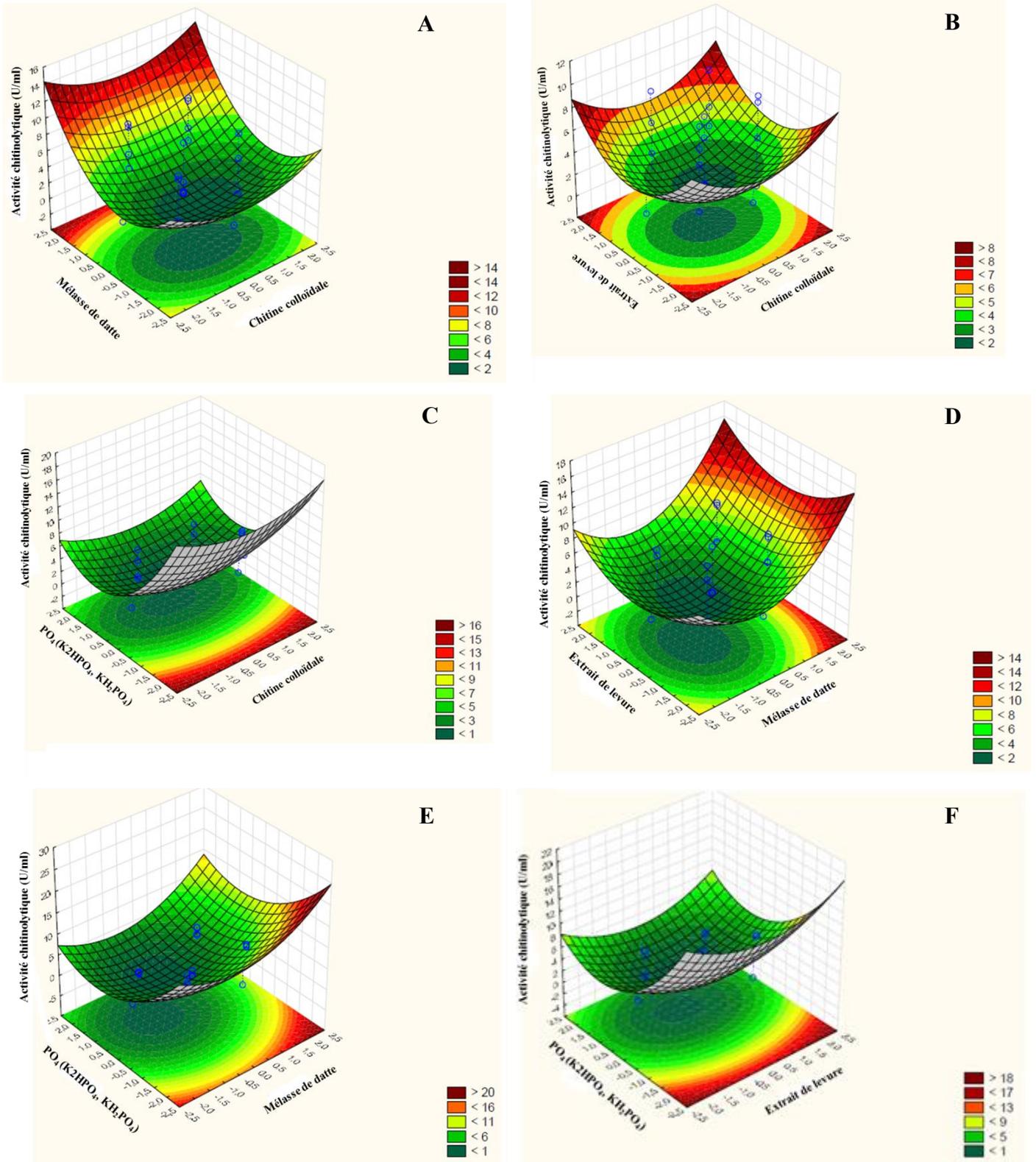


Figure 24 : Tracé des surfaces de réponse de l'activité chitinolytique de *S. griseorubens* C9

5.4. La validation de la conception expérimentale

Les résultats de l'optimisation sont confirmés par des cultures en erlenmeyers. La valeur maximale de production de la chitinase par *Streptomyces griseorubens* C9 a atteint 1,53 U / ml (figure 25). Ce qui est en étroite accord avec le modèle statistique, qui évalue l'activité chitinolytique à 0,902 U / ml.

5.5. Etude des cinétiques de croissance et de production de la chitinase de *Streptomyces griseorubens* C9

La cinétique de la croissance de *Streptomyces griseorubens* C9, sur le milieu optimisé à base de mélasse de datte, est similaire aux cinétiques classiques de la croissance des microorganismes avec une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire. Notant que la phase de déclin n'a pas été atteinte après 08 jours d'incubation (figure 25).

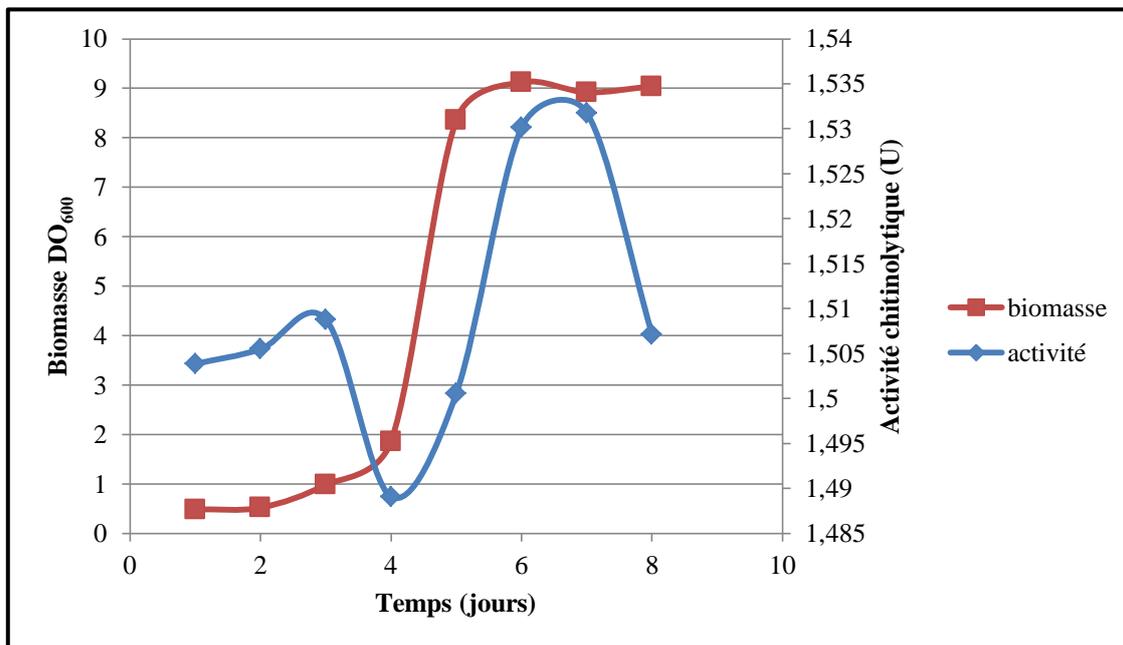


Figure 25 : Cinétique de croissance et de production de la chitinase par *S. griseorubens* C9.

D'après la figure 25, la phase de latence paraît relativement courte, ceci est probablement dû au fait que l'ensemencement du milieu provenant d'une pré-culture de 5 jours. Cet inoculum a permis aux cellules bactériennes de mieux s'adapter au nouveau milieu. La phase exponentielle dure 48 d'heures. La multiplication cellulaire augmente exponentiellement en fonction du temps du 4^{ème} au 6^{ème} jour, puis devient stationnaire jusqu'au 8^{ème} jour. L'activité chitinolytique apparaît dès le début de la fermentation. Cela peut être dû à la production de l'enzyme par *S. griseorubens* C9 au cours du développement de l'inoculum (Wiwat et al. 1999). Cependant, on remarque que cette activité diminue nettement

entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour, puis elle augmente progressivement pour atteindre sa valeur maximale au bout de 7 jours d'incubation (1,53 U / ml), qui correspond à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Les courbes de croissance cellulaire et de production de la chitinase sont superposables. La production de l'enzyme est donc associée à la croissance.

Nawani et Kapadnis (2005) ont rapporté que la production de chitinases par *Streptomyces* sp. Nk 1057 atteint son maximum après 5 jours (Nawani and Kapadnis 2005), alors que Subramanian *et al.* (2012), ont noté un maximum de production de chitinases de la souche *Streptomyces* sp. CDB20 après 8 jours d'incubation (Kumaran et al. 2012). D'autre part, Nawani *et al.* (2002), ont trouvé que le maximum de production de l'enzyme chez *Microspora* sp.V2 est de 48 h (Nawani et al. 2002). Tandis que Joo (2005) a trouvé un maximum de production chez *Streptomyces halstedii* après 72 heures d'incubation (Joo 2005). De ce faite, on peut conclure que le temps d'incubation pour une production optimale des chitinases varie d'une souche à l'autre selon la spécificité métabolique de chacune d'elle.

6. Purification de la chitinase

Afin de purifier les chitinases extracellulaires produites par la souche *Streptomyces griseorubens* C9, une culture sur milieu optimisé a été réalisée. Après une incubation de 7 jours à 40 °C, l'extrait enzymatique brut a été récupéré par centrifugation et filtration.

La purification de la chitinase a été effectuée selon la méthode de Mukherjee et Sen (2006) en trois étapes : Une précipitation par le sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie d'affinité à base de chitine colloïdale et enfin une chromatographie échangeuse d'ions DEAE-sephadex. Les résultats obtenus pour chacune des étapes de purification sont présentés dans le tableau 29.

Tableau 29 : Purification de la chitinase produites par *Streptomyces griseorubens* C9.

Étapes de purification	Extrait enzymatique (ml)	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Degré de purification	Rendement (%)
Extrait brut	150	192,761	19,849	0,102	1	100
Précipitation par (NH ₄) ₂ SO ₄	7	9,808	1,151	0,117	1,140	5,8
Chromatographie d'affinité	2	2,322	1,188	0,511	4,969	6
Chromatographie DEAE-Sephadex	1	2,463	5,895	2,393	23,241	29,7

La précipitation au sulfate d'ammonium est une méthode pratique, non dénaturante pour la séparation et la concentration des protéines (Scopes 1994; Rosenberg 2005). Elle est traditionnellement utilisée dans la précipitation des chitinases (Wahyuni et al. 2016; Han et al. 2016b). Selon Gomes *et al.*(2000), une saturation en sulfate d'ammonium entre 50-80% est l'intervalle le plus favorable pour la précipitation des chitinases à partir d'un extrait enzymatique brut (Gomes et al. 2000). Dans notre étude, nous avons utilisé une saturation de 80%. Ce pourcentage de saturation a également été utilisé par Gomes *et al.*(2000), Afin de purifier les chitinase produites par *Streptomyces* sp. Halder *et al.*(2016) ont également utilisé cette saturation afin de purifier une chitinase produite par *Aeromonas hydrophila* SBK1(Halder et al. 2016). Cependant, une grande quantité de chitinase est perdue après ce stade. La réduction de la teneur en protéines à ce stade est due aux propriétés hydrophobe de la protéine et des fractions de glucose ou de lipide qui étaient liées à la protéine (Andronopoulou and Vorgias 2004). Le culot formé durant la précipitation est par la suite soumis à une dialyse, afin de prévenir l'inhibition de l'enzyme par les sels d'ammonium (Liu 2016). La dialyse est généralement utilisée pour éliminer le sulfate d'ammonium résiduel et concentrer la protéine (Liu 2016). A ce stade, L'activité spécifique est passée de 0,102 à 0,117 U/mg avec un rendement de 5,8.

Récemment, la stratégie de précipitation au sulfate d'ammonium combinée à la chromatographie a été utilisée avec succès pour la purification des chitinases à partir de différents microorganismes comme *S. marcescens* NK1 (Nawani and Kapadnis 2001), *Bacillus cereus* YQ 308 (Chang et al. 2003) et *Streptomyces* sp. (Karthik et al. 2015). La chromatographie d'affinité est une procédure qui implique une interaction spécifique entre la protéine d'intérêt et la matrice d'affinité (Rosenberg 2005). La purification par Chromatographie d'affinité est une procédure de gain de temps et l'effet de concentration permet de traiter de gros volumes. Dans notre étude, le dialysat obtenu est soumis à une chromatographie d'affinité utilisant la chitine colloïdale comme substrat spécifique et le surnageant obtenu par la suite est de nouveau soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium (80%) et à une dialyse (Han et al. 2009). A ce niveau de purification, l'activité spécifique a augmenté jusqu'à 0,511 et le rendement a atteint 6%. Enfin, la dernière étape de purification est réalisée sur une colonne échangeuse d'anion (DEAE-Sephadex). Le profile chromatographique sur DEAE-Sephadex indique l'élution de 2 pics protéiques (1 pic après lavage de la colonne, et un autre pic après élution avec un gradient linéaire de NaCl [0,5-1,5 M] qui correspond à la fraction 44 (figure 26). Le rendement a atteint 29,7% avec une activité

spécifique égale à 2,393, donc l'activité enzymatique a été augmentée 23,241 fois. Ce qui concorde avec les travaux de Roberts et Cabib (1982) qui ont obtenu un rendement de 27,4% chez *S. marcescens* (Roberts and Cabib 1982). Tanabe et al.(2000), ont obtenu un degré de purification égal à 16,6 chez *Streptomyces griseus* en utilisant une colonne gel filtration Sephadex G-100 alors que Gomes et al.(2000), ont obtenu un degré de purification de 28 chez *Streptomyces sp.*(Tanabe et al. 2000; Gomes et al. 2000). Ce qui confirme nos résultats. Par contre les résultats obtenus par Lee et al. (2000), sont inférieurs aux nôtres, car ils ont obtenus un degré de purification de 12,8 chez *Pseudomonas sp* YHS-A2 (Lee et al. 2000).

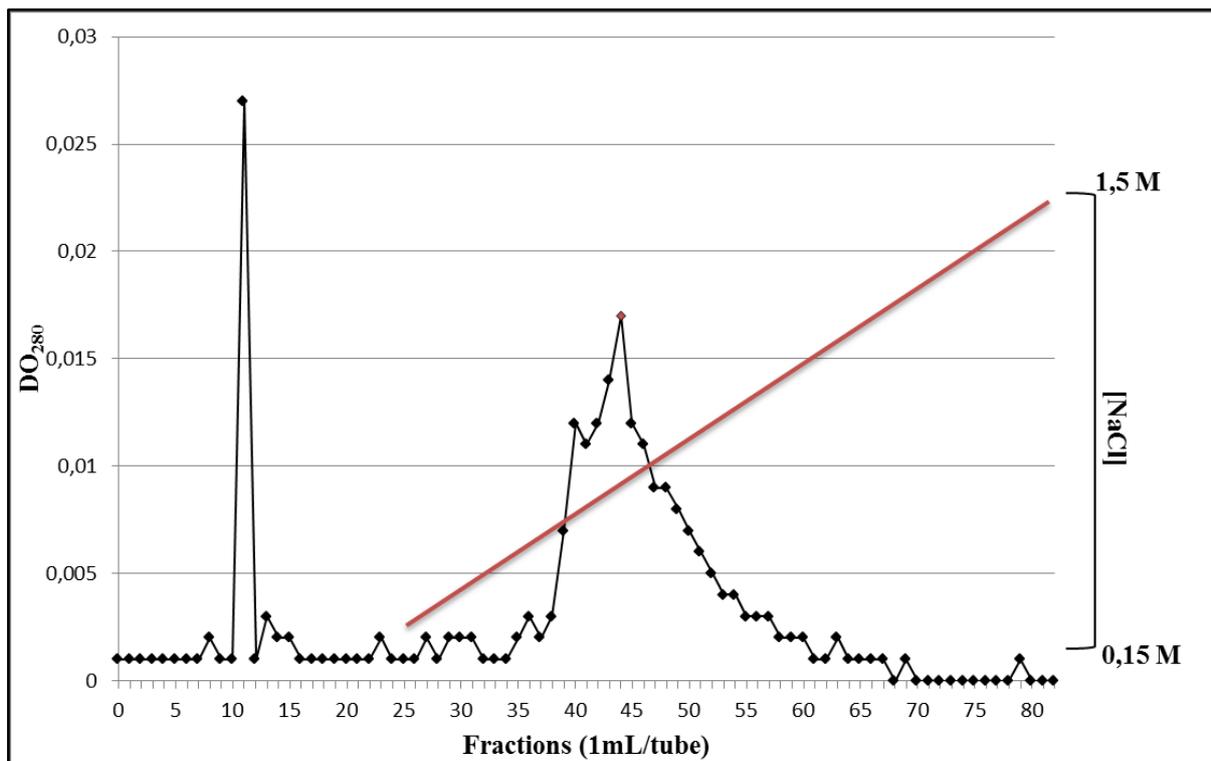


Figure 26 : Profil chromatographique de la chitinase de *S. griseorubens* C9 purifiée sur colonne échangeuse d'ion (DEAE- Sephadex).

7. Caractérisation partielle de l'enzyme purifiée

La caractérisation partielle de la chitinase purifiée a été réalisée en se basant sur l'analyse des effets et de la stabilité du pH et de la température.

7.1. Effet du pH sur la chitinase de *S. griseorubens* C9

Le pH optimal de la chitinase purifiée a été déterminé en incubant la chitinase purifiée à différents pH (3,0-10,0) à 50 °C. Le pH optimal de l'activité chitinase a été observé à pH 5 (figure 27). Il est connu que le pH influe sur les groupes accepteurs de protons (ionisation) dans le site actif de la chitinase, ce qui affecte son activité catalytique (Shuler and

Kargi 2002). Selon Gerhartz (1990), l'enzyme pourrait se dénaturer après une incubation prolongée à des conditions de pH inadaptées (Gerhartz 1990). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus chez la chitinase de *Thermococcus chitonophagus* (Andronopoulou and Vorgias 2004), *Streptomyces* (Hoster et al. 2005b; Nagpure and Gupta 2013) et *Bacillus* sp. DAU101 (Lee et al. 2007). Chez d'autres espèces de *Streptomyces*, Le pH optimal de l'activité chitinolytique était compris entre 3,3 et 7,5 (Carrillo and Gómez Molina 1998; Gomes et al. 2001; Rabeeth et al. 2011; Gangwar et al. 2016).

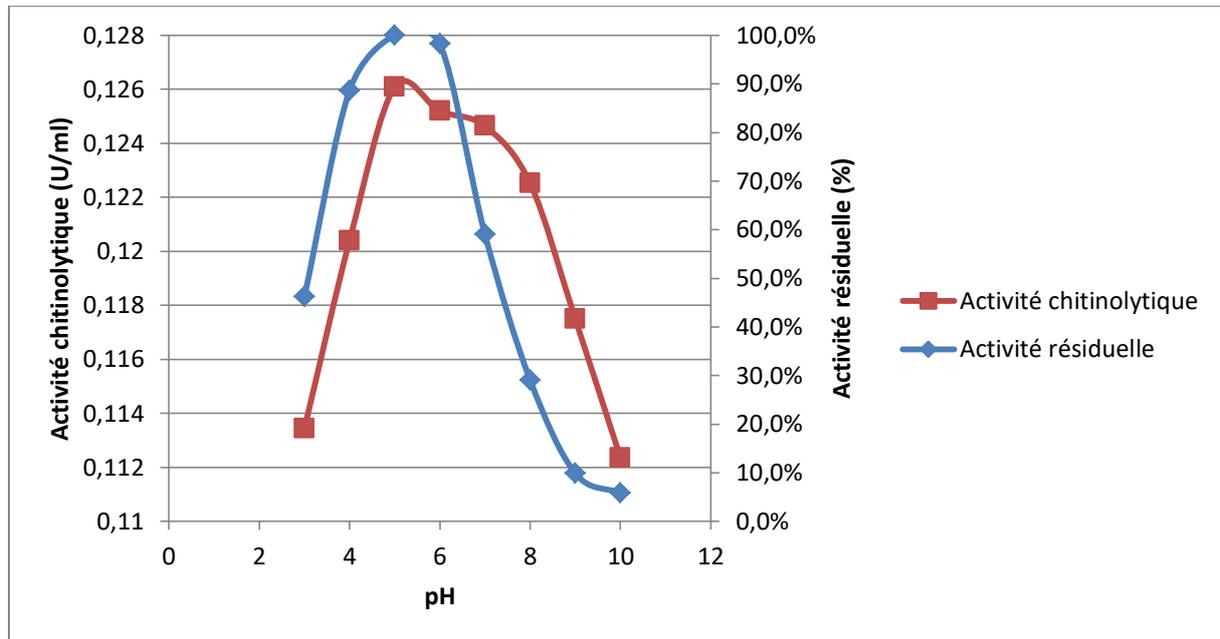


Figure 27 : Effet du pH sur l'activité de la chitinase purifiée et stabilité de l'activité à différents pH.

La stabilité au pH a été identifiée sur la base de l'activité résiduelle de la chitinase après incubation à 50 °C dans une gamme de pH allant de 3,0 à 10,0 pendant 1 heure. La stabilité de la chitinase à différents pH est décrite dans la figure 27. A partir du graphique, la chitinase maintient 60% de sa stabilité à un pH compris entre 4,0 et 7,0 et chute brutalement à moins de 10% à pH 9,0 et 10,0. Ce qui correspond aux résultats trouvés par Nagpure et Gupta (2013) chez *Streptomyces violaceusniger* où le pH optimum était de 5,0 et la stabilité était dans un intervalle de pH entre 3,0 et 10,0 (Nagpure and Gupta 2013). Aussi, Mukherjee et Sen (2006) ont trouvé des résultats similaires chez *Streptomyces venezuelae* P10 (Mukherjee and Sen 2006).

7.2. Effet de la température sur la chitinase de *S. griseorubens* C9

L'influence de la température sur l'activité chitinolytique avec la chitine colloïdale comme substrat, est déterminée par la mesure des activités à différentes températures (dans 0,2M de tampon acétate de sodium pH 5,0). La température optimale de la chitinase purifiée est indiquée sur la figure 28.

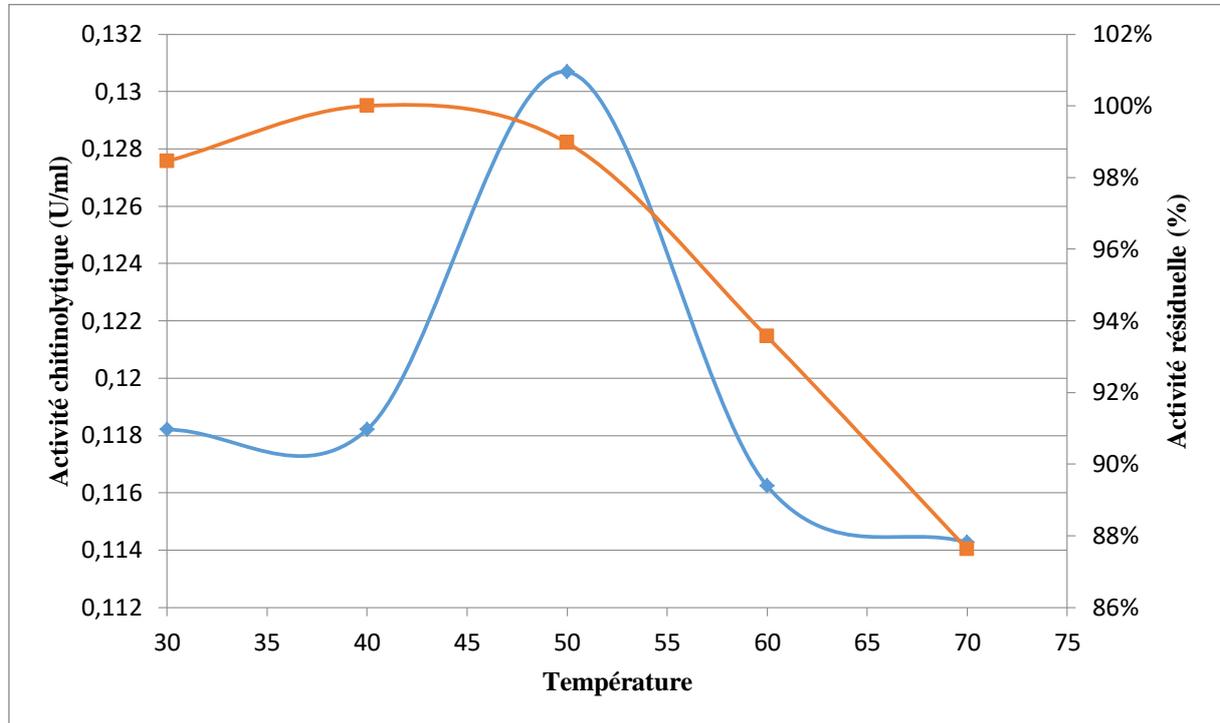


Figure 28 : Effet de la température sur l'activité de la chitinase purifiée et stabilité de la température à différentes températures.

On remarque que l'activité augmente avec la température et atteint son maximum à 50 °C (0,130 U/ml), puis diminue brutalement à 60 et 70 °C. Donc, l'activité de l'enzyme est fortement dépendante de la température. Ces résultats concordent avec ceux obtenus sur d'autres microorganismes (Halder et al. 2016; Farag et al. 2016). Watanabe *et al.*, (1999) et Wiwat *et al.*, (1999) ont également eu des résultats semblables sur des chitinases de *Streptomyces* mésophiles et sur des espèces de *Bacillus* (Wiwat et al. 1999; Watanabe et al. 1999). Chez *Streptomyces* sp. DA11 isolée d'une éponge marine, l'activité chitinolytique maximale a été trouvée à 50 °C (Han et al. 2009). Cependant, Selon Carrillo et Gomez (1998), Gomes *et al.*, (2001) et Rabeeth *et al.*, (2011), la température optimale pour les chitinases de *Streptomyces* s'est révélé être de 40 °C. ces observations indiquent que les chitinases des *Streptomyces* isolés d'environnements différents montrent une sensibilité différente aux changements de température (Carrillo and Gómez Molina 1998; Gomes et al. 2000; Rabeeth

et al. 2011). L'enzyme a maintenu une activité résiduelle supérieure à 90 % de 30 à 60 °C, ce qui est similaire aux résultats obtenus par Hoster *et al.*, (2005) sur une chitinase d'une nouvelle souche de *Streptomyces* isolée de sédiments marins. Cette dernière était active à des températures comprises entre 20 et 65 °C, avec une activité optimale entre 45 et 50 °C (Hoster et al. 2005b). Une chitinase thermostable purifiée à partir de *Bacillus pumilus* JUBHo8 a montré une activité maximale à 70 °C et été stable entre 50 et 80 °C (Bhattacharya et al. 2016). Chez *Streptomyces anulatus* CS242, l'enzyme purifié a montré une température optimale à 50 °C et l'enzyme été stable à des températures entre 30 et 60 °C (Mander et al. 2016).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans ce présent travail de thèse, qui entre dans le cadre de l'axe de recherche de l'équipe biotechnologie et valorisation microbienne des écosystèmes extrêmes du laboratoire de génie microbiologique et applications de l'Université des Frères Mentouri Constantine1, nous, nous sommes intéressés à la mise en évidence des actinobactéries productrices de chitinases, ainsi qu'à l'optimisation d'un milieu de culture pour la production de cet enzyme, à l'aide de méthodes statistiques. De ce fait, trois grandes parties ont été développées :

Au cours de la première partie, nous avons axé nos travaux de recherche sur l'isolement, l'identification et la mise en évidence d'actinobactéries productrices de chitinases à partir d'un sol aride de la région de Laghouat (Algérie), ce qui nous a permis de mettre en évidence l'abondance des actinobactéries dans ce biotope. En effet, nous avons utilisé deux milieux de culture pour l'isolement des actinobactéries (le milieu de Bennett et le milieu MCC). 40 isolats ont ainsi été obtenus purifiés et testés pour leur capacité à produire des chitinases dans différentes conditions de pH (5, 7 et 9) et de températures (30, 35, 40, 45 et 50 °C)

Nous avons observé qu'à pH neutre, toutes les souches étaient capables de croître et de dégrader la chitine colloïdale, alors qu'à pH 9, hormis les isolats C33, C36, C37, qui ont pu se développer sans former d'halo transparent, tous les isolats ont pu croître et hydrolyser la chitine colloïdale du milieu. Nous avons constaté par ailleurs l'amélioration de l'activité chitinolytique de plusieurs souches à ce pH par rapport au pH7, tel que la souche C6. Enfin, 38,88 % des souches ont poussé à pH acide sans avoir d'activité chitinolytique.

Concernant les températures, nous avons pu relever qu'à 50 °C, seule la souche C9 était en mesure de pousser sans dégrader la chitine colloïdale, mais à 45 °C, 69,44% des souches étaient en mesure de croître et de dégrader la chitine. La souche C37 a montré la plus forte activité à 45 °C et la souche C33 est la souche la plus active à 40 °C, mais pas significativement différente de 30 °C. Toutes les souches avaient la capacité de croître à 40, 35 et 30 °C.

Après la mise en évidence des différentes conditions de production des chitinases par les souches isolées, des études phylogéniques ont été réalisées sur tous les isolats. D'abord, une BOX-PCR a été effectuée afin d'estimer la diversité globale des échantillons et d'éliminer les groupes clonaux. Ce premier criblage a abouti à la sélection de 36 isolats classés en quatre clades. Dans chaque clade, nous avons sélectionné certaines souches représentatives

afin d'analyser les séquences nucléotidiques de leur ADNr 16S et de construire un arbre phylogénétique par le biais de programmes informatiques spécifiques. Cette analyse a permis l'affiliation des 20 isolats au genre *Streptomyces* et *Micromonospora* et la suggestion de la présence potentielle de 8 nouvelles espèces bactériennes. Ce résultat reflète la diversité des actinobactéries de cette région.

Les souches chitinolytiques ont été ensuite analysées pour leur antagonisme *in vitro* contre deux champignons phytopathogènes *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum* sur la base d'un dosage de l'activité chitinase, induite par la chitine colloïdale ou réprimée par répression catabolique du glucose. Une souche (C31) présentait un potentiel intéressant réduisant la croissance fongique seulement après l'état d'induction de la chitinase par la chitine colloïdale. Ce qui témoigne du potentiel des actinobactéries à produire la chitinase pour des applications de bio-contrôle.

L'étude du spectre d'inhibition des isolats a révélé qu'ils présentaient en plus de l'activité antifongique une activité antibactérienne. Cette dernière a été vérifiée contre six souches d'importance clinique (*S. aureus* ATCC 25923 ; *S. aureus* ATCC 43300 ; *B. cereus* ; *E. coli* ATCC 25922 ; *K. pneumoniae* ATCC 70603 et *Enterobacter* sp.). 72,22% des 36 actinobactéries étudiées sont actives sur au moins une des bactéries-tests étudiées.

La seconde partie de ces travaux de recherche s'est accentuée sur l'optimisation d'un milieu de culture afin d'augmenter la production enzymatique de la chitinase par la souche *S. griseorubens* C9, en utilisant les plans d'expérience et les méthodes des surfaces de réponse.

Un premier plan statistique de Plackett-Burman a permis d'identifier les facteurs qui ont un effet significatif sur la production de la chitinase par *S. griseorubens* C9. Parmi les 19 facteurs étudiés, seuls quatre (la mélasse de dattes ($P = 0,000552$), l'extrait de levure ($P = 0,003029$), les PO_4 (K_2HPO_4 , KH_2PO_4) ($P = 0,016506$) et la chitine colloïdale ($P = 0,015921$)) ont montré un effet significatif, ils ont été sélectionnés et fait l'objet d'une optimisation par le biais d'un deuxième plan d'expérience de Box-Wilson basé sur les composites centrés, afin de tracer les surfaces de réponse et de déterminer les valeurs optimales de ces facteurs.

La production maximale de l'enzyme (0,902 U/ml) a été prédite dans un milieu contenant 2% de chitine colloïdale, 0,47% de mélasse de dattes, 0,25 g/l d'extrait de levure et 1,81 g / l de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 . Ce qui a été confirmé par des cultures en erlenmeyers où la production de la chitinase par *Streptomyces griseorubens* C9 a atteint 1,53 U / ml. Le

rendement de la production de l'enzyme a été augmenté de 26,38% après optimisation par la méthode des surfaces de réponse.

Dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes focalisé sur la purification et la caractérisation partielle de la chitinase produite après optimisation de son milieu de culture.

Tout au long des étapes de purification, la chitinase a été purifiée 23,241 fois avec un rendement de 29,7 % et une activité spécifique de 2,393 U/mg. L'activité de la chitinase purifiée était maximale à 50 °C et à pH 5,0. La chitinase a conservé plus de 90% de son activité entre 30 °C et 60 °C et 60 % à un pH compris entre 4,0 à 7,0. Par conséquent, la chitinase devient potentiellement utile pour des applications industrielles.

Cependant, d'autres travaux peuvent être réalisés telle qu'une électrophorèse SDS-PAGE afin de connaître le poids moléculaire de cette chitinase purifiée. Des caractérisations supplémentaires de l'enzyme sont nécessaires, tels que l'étude de l'effet du NaCl et des ions métalliques sur l'activité de la chitinase purifiée, ainsi que l'activité cinétique envers différents substrats.

Des études complémentaires sur la chitinase purifiée permettront de mieux comprendre l'enzyme. Aussi, une production et purification à une plus grande échelle pourrait être envisagée, pour obtenir un plus grand volume de chitinase purifiée et pouvoir tester son antagonisme contre les champignons phytopathogènes étudiés (*Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*) et établir son rôle dans le bio-control. Ce travail est le point de départ d'analyses poussées et de nombreuses expériences sur les chitinases des microorganismes d'environnements extrêmes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Fattah YR, Soliman NA, El-Toukhy NM, et al (2013) Production, Purification, and Characterization of Thermostable α -Amylase Produced by *Bacillus licheniformis* Isolate AI20. *J Chem* 2013:1–11. doi: 10.1155/2013/673173
- Adhi TP, Korus RA, Crawford DL (1989) Production of Major Extracellular Enzymes during Lignocellulose Degradation by Two Streptomycetes in Agitated Submerged Culture. *Appl Environ Microbiol* 55:1165–1168.
- Adinarayana K, Ellaiah P (2002) Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp.* *J Pharm Pharm Sci* 5:272–278.
- Adrangi S, Faramarzi MA (2013) From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnol Adv* 31:1786–1795. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.012
- Aharonowitz Y, Demain AL (1978) Carbon Catabolite Regulation of Cephalosporin Production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 14:159–164. doi: 10.1128/AAC.14.2.159
- Al-Dhabi NA, Esmail GA, Duraipandiyar V, et al (2016) Isolation, identification and screening of antimicrobial thermophilic *Streptomyces sp.* Al-Dhabi-1 isolated from Tharban hot spring, Saudi Arabia. *Extremophiles* 20:79–90. doi: 10.1007/s00792-015-0799-1
- Alferova I, Terekhova L (1988) Use of the method of enriching of soil samples with calcium carbonate for isolation of Actinomycetes. *Antibiot Khimioterapiia Antibiot Chemoterapy Sic* 33:888–890.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Ancillo G, Witte B, Schmelzer E, Kombrink E (1999) A distinct member of the basic (class I) chitinase gene family in potato is specifically expressed in epidermal cells. *Plant Mol Biol* 39:1137–1151.
- Anderson AS, Wellington E (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:797–814. doi: 10.1099/00207713-51-3-797
- Andronopoulou E, Vorgias CE (2004) Multiple components and induction mechanism of the chitinolytic system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:694–702. doi: 10.1007/s00253-004-1640-4
- Aouar L, Lerat S, Ouffroukh A, et al (2012) Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Can J Plant Pathol* 34:165–176.
- Aranaz I (2009) Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol* 3:203–230.
- Attwood MM, Zola H (1967) The association between chitin and protein in some chitinous tissues. *Comp Biochem Physiol* 20:993–998. doi: 10.1016/0010-406X(67)90069-2

- Awad HM, El-Enshasy HA, Hanapi SZ, et al (2014) A new chitinase-producer strain *Streptomyces glauciniger* WICC-A03: isolation and identification as a biocontrol agent for plants phytopathogenic fungi. *Nat Prod Res* 28:2273–2277. doi: 10.1080/14786419.2014.939083
- Aydi Ben Abdallah R, Hayfa J-K, Ahlem N, et al (2016) Endophytic bacteria from *Datura metel* for plant growth promotion and bioprotection against *Fusarium* wilt in tomato. *Biocontrol Sci Technol* 26:1139–1165. doi: 10.1080/09583157.2016.1188264
- Badji B, Zitouni A, Mathieu F, et al (2006) Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can J Microbiol* 52:373–382. doi: 10.1139/w05-132
- Bai Y, Eijsink VGH, Kielak AM, et al (2016) Genomic comparison of chitinolytic enzyme systems from terrestrial and aquatic bacteria: Comparison of bacterial chitinolytic systems. *Environ Microbiol* 18:38–49. doi: 10.1111/1462-2920.12545
- Baldrian P (2009) Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil Env* 55:370–378.
- Bari MN, Alam MZ, Muyibi SA, et al (2009) Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches: optimization of media by statistical experimental designs. *Bioresour Technol* 100:3113–3120. doi: 10.1016/j.biortech.2009.01.005
- Beckers HJ, van der Hoeven JS (1982) Growth rates of *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* during early colonization of tooth surfaces in gnotobiotic rats. *Infect Immun* 35:583–587.
- Beier S, Bertilsson S (2013) Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2013.00149
- Benhamou N, Asselin A (1989) Attempted localization of a substrate for chitinases in plant cells reveals abundant N-acetyl-d-glucosamine residues in secondary walls. *Biol Cell* 67:341–350. doi: 10.1111/j.1768-322X.1989.tb00880.x
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga A-M, et al (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417:141–147. doi: 10.1038/417141a
- Bhattacharya S, Das A, Samadder S, Rajan SS (2016) Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus pumilus* JUBCH08 displaying antagonism against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. *3 Biotech*. doi: 10.1007/s13205-016-0406-x
- Bhattacharyya PN, Tanti B, Barman P, Jha DK (2014) Culture-independent metagenomic approach to characterize the surface and subsurface soil bacterial community in the Brahmaputra valley, Assam, North-East India, an Indo-Burma mega-biodiversity hotspot. *World J Microbiol Biotechnol* 30:519–528. doi: 10.1007/s11274-013-1467-1
- Blaak H, Schnellmann J, Walter S, et al (1993) Characteristics of an exochitinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and

- relationship to other chitinases. *Eur J Biochem* 214:659–669. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17966.x
- Blackwell J (1969) Structure of β -chitin or parallel chain systems of poly- β -(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine. *Biopolymers* 7:281–298. doi: 10.1002/bip.1969.360070302
- Boot RG, Renkema GH, Strijland A, et al (1995) Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem* 270:26252–26256.
- Bortone K, Monzingo AF, Ernst S, Robertus JD (2002) The Structure of an Allosamidin Complex with the *Coccidioides immitis* Chitinase Defines a Role for a Second Acid Residue in Substrate-assisted Mechanism. *J Mol Biol* 320:293–302. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00444-8
- Boudemagh A, Kitouni M, Boughachiche F (2005) Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J Med Mycol* 15:39–44.
- Boughachiche F, Reghioia S, Oulmi L, et al (2005) Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes a partir de la sebkha de Ain Milila. *Sci Technol C* 0:5–10.
- Box GE, Wilson KB (1951) On the experimental attainment of optimum conditions. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 13:1–45.
- Box GEP (1952) Multi-factor designs of first order. *Biometrika* 39:49–57. doi: 10.1093/biomet/39.1-2.49
- Brückner R, Titgemeyer F (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett* 209:141–148. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11123.x
- Buchanan RE (1917) Studies in the Nomenclature and Classification of the Bacteria. *J Bacteriol* 2:155–164.
- Buchmann A, Eitel M, Koch P, et al (2016) High-Quality Draft Genome Sequence of the Actinobacterium *Nocardia terpenica* IFM 0406, Producer of the Immunosuppressant Brasilicardins, Using Illumina and PacBio Technologies. *Genome Announc* 4:e01391-16. doi: 10.1128/genomeA.01391-16
- Buckley DH, Schmidt TM (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environ Microbiol* 5:441–452. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00404.x
- Burke R, Cairney J (2002) Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 12:105–116. doi: 10.1007/s00572-002-0162-0
- Busarakam K, Brown R, Bull AT, et al (2016) Classification of thermophilic actinobacteria isolated from arid desert soils, including the description of *Amycolatopsis deserti* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 109:319–334. doi: 10.1007/s10482-015-0635-8

- Busti E (2006) Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology* 152:675–683. doi: 10.1099/mic.0.28335-0
- Campbell LL, Williams OB (1951) A Study of Chitin-decomposing Micro-organisms of Marine Origin. *J Gen Microbiol* 5:894–905. doi: 10.1099/00221287-5-5-894
- Carlini CR, Grossi-de-Sá MF (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology* 40:1515–1539.
- Carrillo L, Gómez Molina SE (1998) Chitinase production by a strain of *Streptomyces griseoruber* isolated from the rhizosphere of sugar cane. *Rev Argent Microbiol* 30:73–78.
- Cattoir V, Daurel C (2010) Quelles nouveautés en antibiothérapie ? *Médecine Mal Infect* 40:135–154. doi: 10.1016/j.medmal.2009.10.009
- Cavalcanti M (2004) Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiosis* sp. *Bioresour Technol* 93:29–35. doi: 10.1016/j.biortech.2003.10.003
- Chang W-T, Chen C-S, Wang S-L (2003) An Antifungal Chitinase Produced by *Bacillus cereus* with Shrimp and Crab Shell Powder as a Carbon Source. *Curr Microbiol* 47:102–108. doi: 10.1007/s00284-002-3955-7
- Chargaff E, Zamenhof S, Green C (1950) Composition of human desoxypentose nucleic acid. *Nature* 165:756–757.
- Charpentier M, Percheron F (1983) The chitin-degrading enzyme system of a *Streptomyces* species. *Int J Biochem* 15:289–292.
- Chater KF (2013) Curing Baldness Activates Antibiotic Production. *Chem Biol* 20:1199–1200. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.10.001
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, et al (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* 34:171–198. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x
- Cheah Y, Lee L, Chieng CC, Wong VCM (2015) Isolation, identification and screening of Actinobacteria in volcanic soil of Deception Island (the Antarctic) for antimicrobial metabolites. *Pol Polar Res*. doi: 10.1515/popore-2015-0001
- Chen L, Chen J, Jiang Y, et al (2009) Transcriptomics analyses reveal global roles of the regulator AveI in *Streptomyces avermitilis*. *FEMS Microbiol Lett* 298:199–207. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01721.x
- Chodok P, Kanjana-Opas A, Kaewsuwan S (2010) The Plackett–Burman Design for Evaluating the Production of Polyunsaturated Fatty Acids by *Physcomitrella patens*. *J Am Oil Chem Soc* 87:521–529. doi: 10.1007/s11746-009-1532-y
- Choquer M, Boccara M, Gonçalves IR, et al (2004) Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes: The chitin synthases of *Botrytis cinerea*. *Eur J Biochem* 271:2153–2164. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04135.x

- Chun J, Lee J-H, Jung Y (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2259–2261.
- Cohen-Kupiec R, Chet I (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol* 9:270–277. doi: 10.1016/S0958-1669(98)80058-X
- Cohn F (1872) Untersuchungen über Bacterien: I.
- Coombs JT, Franco CMM (2003) Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots. *Appl Environ Microbiol* 69:5603–5608. doi: 10.1128/AEM.69.9.5603-5608.2003
- Crawford DL, Lynch JM, Whipps JM, Ousley MA (1993) Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a Fungal Root Pathogen. *Appl Environ Microbiol* 59:3899–3905.
- Crini G, Badot P-M, Guibal É (2009) Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application. Presses Univ. Franche-Comté
- Cross T, Goodfellow M (1973) Taxonomy and classification of the actinomycetes. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 2:11–112.
- Curtis TP, Sloan WT, Scannell JW (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci* 99:10494–10499. doi: 10.1073/pnas.142680199
- Dackman C, Chet I, Nordbring-Hertz B (1989) Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: infection and enzymatic activity. *FEMS Microbiol Lett* 62:201–208. doi: 10.1111/j.1574-6968.1989.tb03694.x
- Dave BR (2015) Optimization of Process Parameters for Cellulase Production by *Bacillus licheniformis* MTCC 429 using RSM and Molecular Characterization of Cellulase Gene. *J Bioprocess Biotech.* doi: 10.4172/2155-9821.1000212
- Dean ACR (1972) Influence of environment on the control of enzyme synthesis. *J Appl Chem Biotechnol* 22:245–259. doi: 10.1002/jctb.2720220207
- Debnath R, Saikia R, Sarma RK, et al (2013) Psychrotolerant antifungal *Streptomyces* isolated from Tawang, India and the shift in chitinase gene family. *Extremophiles* 17:1045–1059.
- Delic I, Robbins P, Westpheling J (1992) Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc Natl Acad Sci U A* 89:1885–1889.
- Demain AL (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:455–463. doi: 10.1007/s002530051546
- Desbrieres J (2002) Chitine et chitosane. *Actual Chim* 39–44.

- Dhanya RPN, Parvathi CG, Gayathri N, et al (2014) Isolation And Characterization Of Chitinolytic Actinomycetes From Estuarine Origin. South India Blue Biotechnol J 3:83.
- Dickinson K, Keer V, Hitchcock CA, Adams DJ (1991) Microsomal chitinase activity from *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj 1073:177–182. doi: 10.1016/0304-4165(91)90199-Q
- Djigal D (2003) Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorrhiziens) et les nématodes bactérivores : effets sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. UCAD
- Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, Sadowsky MJ (2000) Use of Repetitive DNA Sequences and the PCR to Differentiate *Escherichia coli* Isolates from Human and Animal Sources. Appl Environ Microbiol 66:2572–2577. doi: 10.1128/AEM.66.6.2572-2577.2000
- Domon J-M, Neutelings G, Roger D, et al (2000) A Basic Chitinase-like Protein Secreted by Embryogenic Tissues of *Pinus caribaea* acts on Arabinogalactan Proteins Extracted from the same Cell Lines. J Plant Physiol 156:33–39. doi: 10.1016/S0176-1617(00)80269-2
- Donadio S, Monciardini P, Alduina R, et al (2002) Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. J Biotechnol 99:187–198.
- Dua A, Joshi S, Satyanarayana T (2016) Recombinant exochitinase of the thermophilic mould *Myceliophthora thermophila* BJA: Characteristics and utility in generating *N*-acetyl glucosamine and in biocontrol of phytopathogenic fungi. Biotechnol Prog. doi: 10.1002/btpr.2370
- Edwards C (1993) Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. Appl Biochem Biotechnol 42:161–179. doi: 10.1007/BF02788050
- Ehrlich H, Maldonado M, Spindler K, et al (2007) First evidence of chitin as a component of the skeletal fibers of marine sponges. Part I. Verongidae (demospongia: Porifera). J Exp Zool B Mol Dev Evol 308B:347–356. doi: 10.1002/jez.b.21156
- Ekborg NA, Morrill W, Burgoyne AM, et al (2007) CelAB, a Multifunctional Cellulase Encoded by *Teredinibacter turnerae* T7902T, a Culturable Symbiont Isolated from the Wood-Boring Marine Bivalve *Lyrodus pedicellatus*. Appl Environ Microbiol 73:7785–7788. doi: 10.1128/AEM.00876-07
- Elango N, Correa JU, Cabib E (1982) Secretory character of yeast chitinase. J Biol Chem 257:1398–1400.
- Eliasson Lantz A (2014) Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatases Control Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Enzyme Eng. doi: 10.4172/2329-6674.1000122
- Elibol M (2004) Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) with response surface methodology. Process Biochem 39:1057–1062.

- El-Nakeeb MA, Lechevalier HA (1963) Selective Isolation of Aerobic Actinomycetes. *Appl Microbiol* 11:75–77.
- El-Sayed E-SA, Ezzat SM, Ghaly MF, et al (2000) Purification and characterization of two chitinases from *Streptomyces albovinaceus* S-22. *World J Microbiol Biotechnol* 16:87–89. doi: 10.1023/A:1008926214392
- El-Sayed GN, Coudron TA, Ignoffo CM, Riba G (1989) Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *J Invertebr Pathol* 54:394–403.
- El-Tarabily KA, Sivasithamparam K (2006) Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem* 38:1505–1520. doi: 10.1016/j.soilbio.2005.12.017
- Ergun M, Mutlu SF (2000) Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* 73:251–255.
- Escott GM, Adams DJ (1995) Chitinase activity in human serum and leukocytes. *Infect Immun* 63:4770–4773.
- Farag AM, Abd-Elnabey HM, Ibrahim HAH, El-Shenawy M (2016) Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. *Egypt J Aquat Res* 42:185–192. doi: 10.1016/j.ejar.2016.04.004
- Felsenstein J (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39:783.
- Flach J, Pilet P-E, Jollès P (1992) What's new in chitinase research? *Experientia* 48:701–716. doi: 10.1007/BF02124285
- Freitas R de, Chuat V, Madec M-N, et al (2015) Biodiversity of dairy Propionibacterium isolated from dairy farms in Minas Gerais, Brazil. *Int J Food Microbiol* 203:70–77. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.006
- Fujii T, Miyashita K (1993) Multiple domain structure in a chitinase gene (chiC) of *Streptomyces lividans*. *J Gen Microbiol* 139:677–686. doi: 10.1099/00221287-139-4-677
- Furuhashi T, Beran A, Blazso M, et al (2009) Pyrolysis GC/MS and IR spectroscopy in chitin analysis of molluscan shells. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:93–103. doi: 10.1271/bbb.80498
- Fusetti F (2002) Structure of Human Chitotriosidase. Implications for Specific Inhibitor Design and Function of Mammalian Chitinase-Like Lectins. *J Biol Chem* 277:25537–25544. doi: 10.1074/jbc.M201636200
- Gangwar M, Singh V, Pandey AK, et al (2016) Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces violascens* NRRL B2700. *Indian J Exp Biol* 54:64–71.

- Gao J, Bauer MW, Shockley KR, et al (2003) Growth of Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* on Chitin Involves Two Family 18 Chitinases. *Appl Environ Microbiol* 69:3119–3128. doi: 10.1128/AEM.69.6.3119-3128.2003
- Gasmi M, Kitouni M (2017) Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. *Ann Microbiol* 67:175–183. doi: 10.1007/s13213-016-1249-8
- Gautier M, Lortal S, Boyaval P, et al (1993) Les bactéries propioniques laitières. *Le Lait* 73:257–263. doi: 10.1051/lait:1993224
- Georghiou PR, Doggett AM, Kielhofner MA, et al (1994) Molecular fingerprinting of *Legionella* species by repetitive element PCR. *J Clin Microbiol* 32:2989–2994.
- Gerhartz W (ed) (1990) *Enzymes in industry: production and applications*. VCH, Weinheim
- Gheshlaghi R, Scharer JM, Moo-Young M, Douglas PL (2005) Medium optimization for hen egg white lysozyme production by recombinant *Aspergillus niger* using statistical methods. *Biotechnol Bioeng* 90:754–760.
- Gibson T, Higgins D, Thompson J (1994) Clustal X program. EMBL, Heidelberg
- Gohel V, Naseby DC (2007) Thermal stabilization of chitinolytic enzymes of *Pantoea dispersa*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.009>
- Gomes RC, Semedo LTAS, Soares RMA, et al (2000) Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Lett Appl Microbiol* 30:146–150. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00687.x
- Gomes RC, Sêmedo LT, Soares RM, et al (2001) Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *J Appl Microbiol* 90:653–661.
- Gonçalves IR, Brouillet S, Soulié M-C, et al (2016) Genome-wide analyses of chitin synthases identify horizontal gene transfers towards bacteria and allow a robust and unifying classification into fungi. *BMC Evol Biol*. doi: 10.1186/s12862-016-0815-9
- Gong X, Chen F (1997) Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*. *J Appl Phycol* 9:437–444.
- Gooday GW (1999) Aggressive and defensive roles for chitinases. *EXS* 87:157–169.
- Gooday GW (1990a) The Ecology of Chitin Degradation. In: Marshall KC (ed) *Advances in Microbial Ecology*. Springer US, Boston, MA, pp 387–430
- Gooday GW (1990b) Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation* 1:177–90.
- Gooday GW, Zhu W-Y, O'Donnell RW (1992) What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiol Lett* 100:387–391. doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb14067.x

- Goodfellow M, Lacey J, Todd C (1987) Numerical Classification of Thermophilic Streptomycetes. *J Gen Microbiol* 133:3135–3149.
- Goodfellow M, Whitman WB, Bergey DH (eds) (2012) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 5 [...]: The Actinobacteria [...], 2. ed. Springer, New York, NY
- Goodfellow M, Williams ST (1983) Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 37:189–216. doi: 10.1146/annurev.mi.37.100183.001201
- Goormachtig S, Lievens S, Van de Velde W, et al (1998) Srchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. *Plant Cell* 10:905–915.
- Graham LS, Sticklen MB (1994) Plant chitinases. *Can J Bot* 72:1057–1083. doi: 10.1139/b94-132
- Grigorevski de Lima AL, Pires do Nascimento R, da Silva Bon EP, Coelho RRR (2005) *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme Microb Technol* 37:272–277. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.03.016
- Gupta R, Saxena RK, Chaturvedi P, Viridi JS (1995) Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *J Appl Bacteriol* 78:378–383.
- Halder SK, Jana A, Paul T, et al (2016) Purification and biochemical characterization of chitinase of *Aeromonas hydrophila* SBK1 biosynthesized using crustacean shell. *Biocatal Agric Biotechnol* 5:211–218. doi: 10.1016/j.bcab.2015.11.003
- Han B, Zhou K, Li Z, et al (2016a) Characterization of the First Fungal Glycosyl Hydrolase Family 19 Chitinase (NbchiA) from *Nosema bombycis* (Nb). *J Eukaryot Microbiol* 63:37–45. doi: 10.1111/jeu.12246
- Han P, Yang C, Liang X, Li L (2016b) Identification and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from “Baozhu” pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.). *Food Chem* 196:808–814. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.006
- Han Y, Yang B, Zhang F, et al (2009) Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with South China Sea sponge *Craniella australiensis*. *Mar Biotechnol N Y N* 11:132–140. doi: 10.1007/s10126-008-9126-5
- Hatano K (2003) Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly Streptoverticillium) species by using phenotypes, DNA-DNA hybridization and sequences of gyrB, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Katoh and Arai 1957) corrig., sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1519–1529. doi: 10.1099/ijs.0.02238-0
- Hawker LE, Linton AH (1971) *Microorganisms, Function, Form and Environment*. London, UK, Edward Arnold Ltd.
- Hawtin RE, Arnold K, Ayres MD, et al (1995) Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* 212:673–685.

- Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, et al (1997) Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238:243–253. doi: 10.1006/viro.1997.8816
- He J, Zhen Q, Qiu N, et al (2009) Medium optimization for the production of a novel bioflocculant from *Halomonas* sp. V3a' using response surface methodology. *Bioresour Technol* 100:5922–5927.
- Helleboid S, Hendriks T, Bauw G, et al (2000) Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. *J Exp Bot* 51:1189–1200.
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280:309–316. doi: 10.1042/bj2800309
- Henrissat B, Bairoch A (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 316 (Pt 2):695–696.
- Heyndrickx M, Vauterin L, Vandamme P, et al (1996) Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J Microbiol Methods* 3:247–259.
- Hideyuki S, Yasushi T, Katsukiyo Y, et al (1996) Brasilinolide A, new immunosuppressive macrolide from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *Tetrahedron* 52:9031–9034. doi: 10.1016/0040-4020(96)00464-4
- Hillman K, Gooday GW, Prosser JI (1989) The mineralization of chitin in the sediments of the Ythan estuary, aberdeenshire, Scotland. *Estuar Coast Shelf Sci* 29:601–612. doi: 10.1016/0272-7714(89)90013-9
- Hiltner JK, Hunter IS, Hoskisson PA (2015) Tailoring Specialized Metabolite Production in *Streptomyces*. In: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp 237–255
- Hirsch AM, Valdés M (2010) *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol Biochem* 42:536–542. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.11.023
- Hoell IA, Dalhus B, Heggset EB, et al (2006) Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. *FEBS J* 273:4889–4900. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05487.x
- Hoondal G, Tiwari R, Tewari R, et al (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:409–418. doi: 10.1007/s00253-002-1061-1
- Hopwood DA (2007) *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. Oxford University Press, USA
- Hoster F, Schmitz JE, Daniel R (2005a) Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:434–442.

- Hoster F, Schmitz JE, Daniel R (2005b) Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:434–442. doi: 10.1007/s00253-004-1664-9
- Huang X, Wang Y, Cui Y, Hua X (2010) Optimization of Antifungal Effect of Surfactin and Iturin to *Penicillium notatum* in Syrup of Peach by RSM. *Int J Pept Res Ther* 16:63–69.
- Huber M, Cabib E, Miller LH (1991) Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2807–2810.
- Hunt DE, Gevers D, Vahora NM, Polz MF (2008) Conservation of the Chitin Utilization Pathway in the Vibrionaceae. *Appl Environ Microbiol* 74:44–51. doi: 10.1128/AEM.01412-07
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, et al (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21:526–531. doi: 10.1038/nbt820
- Ilayaraja S, Rajkumar J, S. Swarnakumar N, et al (2014) Isolation of two thermophilic actinobacterial strains mud volcano of the Baratang Island, India. *Afr J Microbiol Res* 8:40–45. doi: 10.5897/AJMR09.126
- Imada C, Koseki N, Kamata M, et al (2007) Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica* 21:27–31. doi: 10.3209/saj.SAJ210104
- Inbar J, Chet I (1991) Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacterium. *Soil Biol Biochem* 23:973–978. doi: 10.1016/0038-0717(91)90178-M
- Itoh Y, Kawase T, Nikaidou N, et al (2002) Functional analysis of the chitin-binding domain of a family 19 chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037: substrate-binding affinity and cis-dominant increase of antifungal function. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:1084–1092.
- Itoh Y, Takahashi K, Takizawa H, et al (2003) Family 19 chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:847–855. doi: 10.1271/bbb.67.847
- Iverson KL, Bromel MC, Anderson AW, Freeman TP (1984) Bacterial Symbionts in the Sugar Beet Root Maggot, *Tetanops myopaeformis* (von Röder). *Appl Environ Microbiol* 47:22–27.
- Jackson S, Place AR (1992) Chitin Digestion and Assimilation by Seabirds. *The Auk* 109:758–770. doi: 10.2307/4088151
- Jacob N, Ashapoorna C, Prema P (2008) Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresour Technol* 99:6697–6701. doi: 10.1016/j.biortech.2007.10.002

- Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, et al (2011) Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv* 29:322–337. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.005
- Jensen PR, Moore BS, Fenical W (2015) The Marine Actinomycete Genus *Salinispora*: A Model Organism for Secondary Metabolite Discovery. *Nat Prod Rep* 32:738–751. doi: 10.1039/c4np00167b
- Jeuniaux C (1963) Chitine et chitinolyse: un chapitre de la biologie moléculaire, Masson et Cie. Impr. G. Thone, Paris
- Jeuniaux C, Voss-Foucart MF, Bussers JC (1993) La production de chitine par les crustacés dans les écosystèmes marins. *Aquat Living Resour* 6:331–341.
- Jones D, Wache S, Chhokar V (1996) Toxins produced by arthropod parasites: salivary gland proteins of human body lice and venom proteins of chelonine wasps. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology* 34:1421–1429.
- Joo G-J (2005) Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*. *Biotechnol Lett* 27:201–205. doi: 10.1007/s10529-004-7879-0
- Kaiser K, Benner R (2008) Major bacterial contribution to the ocean reservoir of detrital organic carbon and nitrogen. *Limnol Oceanogr* 53:99–112. doi: 10.4319/lo.2008.53.1.0099
- Kakizaki H, Ikeda M, Fukushima H, Matsumiya M (2015) Distribution of Chitinolytic Enzymes in the Organs and cDNA Cloning of Chitinase Isozymes from the Stomach of Two Species of Fish, Chub Mackerel (*Scomber japonicus*) and Silver Croaker (*Pennahia argentata*). *Open J Mar Sci* 5:398–411. doi: 10.4236/ojms.2015.54032
- Kamel BS (1979) Dates as a potential substrate for single cell protein production. *Enzyme Microb Technol* 1:180–182.
- Kanini GS, Katsifas EA, Savvides AL, et al (2013) Greek indigenous streptomycetes as biocontrol agents against the soil-borne fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *J Appl Microbiol* 114:1468–1479. doi: 10.1111/jam.12138
- Karlsson M, Stenlid J (2009) Evolution of Family 18 Glycoside Hydrolases: Diversity, Domain Structures and Phylogenetic Relationships. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16:208–223. doi: 10.1159/000151220
- Karrer P, Hofmann A (1929) Polysaccharide XXXIX. Über den enzymatischen Abbau von Chitin und Chitosan I. *Helv Chim Acta* 12:616–637. doi: 10.1002/hlca.19290120167
- Karthik N, Binod P, Pandey A (2015) Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. *Bioresour Technol* 188:195–201. doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.006
- Kashyap D., Vohra P., Chopra S, Tewari R (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol* 77:215–227. doi: 10.1016/S0960-8524(00)00118-8

- Kasprzewska A (2003) Plant chitinases--regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* 8:809–824.
- Kawase T, Saito A, Sato T, et al (2004) Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinases in Actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* 70:1135–1144.
- Kawase T, Yokokawa S, Saito A (2006) Comparison of Enzymatic and Antifungal Properties between Family 18 and. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:988–998.
- Kennedy AC, Smith KL (1995) Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. In: Collins HP, Robertson GP, Klug MJ (eds) *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 75–86
- Keyhani N, Roseman S (1999) Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 1473:108–122. doi: 10.1016/S0304-4165(99)00172-5
- Keyhani NO, Roseman S (1996) The Chitin Catabolic Cascade in the Marine Bacterium *Vibrio furnissii*: Molecular Cloning, Isolation, And Characterization Of A Periplasmic Chitodextrinase. *J Biol Chem* 271:33414–33424. doi: 10.1074/jbc.271.52.33414
- Kezuka Y, Ohishi M, Itoh Y, et al (2006) Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J Mol Biol* 358:472–484. doi: 10.1016/j.jmb.2006.02.013
- Khan FI, Bisetty K, Singh S, et al (2015) Chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP and its biotechnological applications. *Extremophiles* 19:1055–1066. doi: 10.1007/s00792-015-0792-8
- Khatabi A, Hilali L, Dari K, et al (2002) Isolement de microorganismes d'origine marine (Maroc) antagonistes de *Yersinia ruckeri* et *Yersinia pseudotuberculosis*. *Rev Biol Biotech* 2:28–32.
- Khoushab F, Yamabhai M (2010) Chitin Research Revisited. *Mar Drugs* 8:1988–2012. doi: 10.3390/md8071988
- Kieser T, Bibb M, Chater K, Hopwood D (2000) *Practical Streptomyces Genetics* (The John Innes Foundation. United Kingdom, Norwich
- Kikani BA, Shukla RJ, Singh S (2010) Biocatalytic Potential Of Thermophilic Bacteria And Actinomycetes. *Current Research, Technology And Education Topics In Applied Microbiology And Microbial. Biotechnology* 2:P.
- Kim K-J, Yang Y-J, Kim J-G (2003) Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *J Biochem Mol Biol* 36:185–189.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Molec Evol* 16:111–120.
- Kirchman D, White J (1999) Hydrolysis and mineralization of chitin in the Delaware Estuary. *Aquat Microb Ecol* 18:187–196. doi: 10.3354/ame018187

- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, et al (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* 58:169–188.
- Kitouni M (2007) Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes, identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Université Mentouri-Constantine. Faculté des sciences de la nature et de la vie (Alger)
- Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, et al (2005) Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J Mycol Médicale* 15:45–51.
- Kluyver AJ, van Niel CB (1936) Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde. Infekt Hyg* 94:369–403.
- Kolosova N, Breuil C, Bohlmann J (2014) Cloning and characterization of chitinases from interior spruce and lodgepole pine. *Phytochemistry* 101:32–39. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.02.006
- Koneman EW (2006) *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins
- Kono M, Matsui T, Shimizu C, Koga D (1990) Purification and some properties of chitinase from the stomach of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Agric Biol Chem* 54:973–978. doi: 10.1271/bbb1961.54.973
- Kramer KJ, Koga D (1986) Insect chitin. *Insect Biochem* 16:851–877. doi: 10.1016/0020-1790(86)90059-4
- Krishnan A, Nair PN, Jones D (1994) Isolation, cloning, and characterization of new chitinase stored in active form in chitin-lined venom reservoir. *J Biol Chem* 269:20971–20976.
- Kumaran S, Deivasigamani B, Vairagkar U, et al (2012) Evaluation of Chitinase producing and antimicrobial properties of *Streptomyces* isolated from shrimp shell disposable area. *Asian Pac J Trop Dis* 2:S861–S864. doi: 10.1016/S2222-1808(12)60280-1
- Kuranda MJ, Robbins PW (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266:19758–67.
- Labeda DP (1992) DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces*. *Gene* 115:249–253.
- Langner T, Göhre V (2016) Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Curr Genet* 62:243–254. doi: 10.1007/s00294-015-0530-x
- Larparent J-P, Larparent-Gourgaud M (1990) *Mémento technique de microbiologie: microorganismes eucaryotes et procaryotes, structure, métabolisme, systématique, applications industrielles, milieux de culture et réactifs*. Technique et documentation - Lavoisier, Paris
- Larparent JP, Sanglier JJ (eds) (1989) *Biotechnologie des antibiotiques*.

- Latge JP, Boucias D (2014) Fungal Cell Wall and Immune Response: Proceeding of the NATO Advanced Research Workshop on Fungal Cell Wall and Immune Response, held in Eloudia, Greece, September 29–October 5, 1990. Springer
- Le Roux K (2012) Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*. Caractérisations des produits et optimisation du procédé. Université de Nantes
- Lechevalier HA, Lechevalier MP (1981) Introduction to the order Actinomycetales. The prokaryotes 2:1915–1922.
- Leclair GR, Buchan A, Hollibaugh JT (2004) Chitinase Gene Sequences Retrieved from Diverse Aquatic Habitats Reveal Environment-Specific Distributions. *Appl Environ Microbiol* 70:6977–6983. doi: 10.1128/AEM.70.12.6977-6983.2004
- Lee HS, Han DS, Choi SJ, et al (2000) Purification, characterization, and primary structure of a chitinase from *Pseudomonas* sp. YHS-A2. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:397–405.
- Lee JY, Hwang BK (2002) Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can J Microbiol* 48:407–417. doi: 10.1139/w02-025
- Lee Y-S, Park I-H, Yoo J-S, et al (2007) Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. *Bioresour Technol* 98:2734–2741. doi: 10.1016/j.biortech.2006.09.048
- Leger RJS, Cooper RM, Charnley AK (1991) Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 58:415–426.
- Leisner JJ, Larsen MH, Jorgensen RL (2008) Brondsted L, Thomsen LE, Ingmer H. *Appl Environ Microbiol* 74:3823–3830.
- Lemriss S, Laurent F, Couble A, et al (2003) Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol* 49:669–674. doi: 10.1139/w03-088
- Li H-Y (2005) Colonization by the *Arbuscular Mycorrhizal* Fungus *Glomus versiforme* Induces a Defense Response Against the Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita* in the Grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), Which Includes Transcriptional Activation of the Class III Chitinase Gene VCH3. *Plant Cell Physiol* 47:154–163. doi: 10.1093/pcp/pci231
- Li Y, Wilson DB (2008) Chitin binding by *Thermobifida fusca* cellulase catalytic domains. *Biotechnol Bioeng* 100:644–652. doi: 10.1002/bit.21808
- Liu B, Wu H, Pan S (2016) *Saccharopolyspora subtropica* sp. nov., a thermophilic actinomycete isolated from soil of a sugar cane field. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1990–1995. doi: 10.1099/ijsem.0.000976
- Liu S (2016) *Bioprocess engineering: kinetics, biosystems, sustainability, and reactor design*, Second edition. Elsevier, Amsterdam Boston Heidelberg

- Locci R, Sharples and GP (1984) Morphology. In *The Biology of the Actinomycetes*. Academic Press, London
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, Bruijn FJ de (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas pathovars* and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol* 60:2286–2295.
- Luo Q, Hiessl S, Steinbüchel A (2014) Functional diversity of *Nocardia* in metabolism: Metabolism of *Nocardia*. *Environ Microbiol* 16:29–48. doi: 10.1111/1462-2920.12221
- Lupski JR, Weinstock GM (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* 174:4525–4529.
- Mahadevan B, Crawford DL (1997) Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme Microb Technol* 20:489–493.
- Malecki PH, Rypniewski W (2013) Survival in extremes. *BioTechnologia*.
- Mander P, Cho SS, Choi YH, et al (2016) Purification and characterization of chitinase showing antifungal and biodegradation properties obtained from *Streptomyces anulatus* CS242. *Arch Pharm Res* 39:878–886. doi: 10.1007/s12272-016-0747-3
- Manjeet K, Purushotham P, Neeraja C, Podile AR (2013) Bacterial chitin binding proteins show differential substrate binding and synergy with chitinases. *Microbiol Res* 168:461–468. doi: 10.1016/j.micres.2013.01.006
- Manson FDC, Fletcher TC, Gooday GW (1992) Localization of chitinolytic enzymes in blood of turbot, *Scophthalmus maximus*, and their possible roles in defence. *J Fish Biol* 40:919–927. doi: 10.1111/j.1095-8649.1992.tb02637.x
- Marmur J, Doty P (1961) Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol* 3:585–594.
- Masuda T, Zhao G, Mikami B (2015) Crystal structure of class III chitinase from pomegranate provides the insight into its metal storage capacity. *Biosci Biotechnol Biochem* 79:45–50. doi: 10.1080/09168451.2014.962475
- Mathur NK, Narang CK (1990) Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *J Chem Educ* 67:938. doi: 10.1021/ed067p938
- McNab R, Glover LA (1991) Inhibition of *Neurospora crassacytosolic* chitinase by allosamidin. *FEMS Microbiol Lett* 82:79–82. doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04843.x
- Meier-Kolthoff JP, Göker M, Spröer C, Klenk H-P (2013) When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Arch Microbiol* 195:413–418.
- Mellouli L, Ben Ameer-Mehdi R, Sioud S, et al (2003) Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res Microbiol* 154:345–352. doi: 10.1016/S0923-2508(03)00077-9

- Merzendorfer H (2006) Insect chitin synthases: a review. *J Comp Physiol B* 176:1–15. doi: 10.1007/s00360-005-0005-3
- Merzendorfer H, Zimoch L (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol* 206:4393–4412.
- Miao V, Brost R, Chapple J, et al (2006) The lipopeptide antibiotic A54145 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fradiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:129–140. doi: 10.1007/s10295-005-0028-5
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31:426–428. doi: 10.1021/ac60147a030
- Mitsutomi M, Hata T, Kuwahara T (1995) Purification and characterization of novel chitinases from *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J Ferment Bioeng* 80:153–158. doi: 10.1016/0922-338X(95)93211-2
- Miyashita K, Fujii T, Saito A (2000) Induction and Repression of a *Streptomyces lividans* Chitinase Gene Promoter in Response to Various Carbon Sources. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:39–43.
- Miyashita K, Fujii T, Sawada Y (1991) Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. *J Gen Microbiol* 137:2065–2072. doi: 10.1099/00221287-137-9-2065
- Mohagheghi A, Grohmann K, Himmel M (1986) Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 36:435–443.
- Moncheva P, Tishkov S, Dimitrova N, et al (2002) Characteristics Of Soil Actinomycetes From Antarctica.
- Monreal J, Reese ET (1969) The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol* 15:689–696.
- Moreira KA, Albuquerque BF, Teixeira MFS, et al (2002) Application Of Protease From *Nocardioopsis* sp. as a Laundry Detergent Additive. *World J Microbiol Biotechnol* 18:309. doi: 10.1023/A:1015221327263
- Morimoto K, Yoshimoto M, Karita S, et al (2006) Characterization of the third chitinase Chi18C of *Clostridium paraputrificum* M-21. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1106–1113. doi: 10.1007/s00253-006-0582-4
- Mukherjee G, Sen SK (2006) Purification, Characterization, and Antifungal Activity of Chitinase from *Streptomyces venezuelae* P10. *Curr Microbiol* 53:265–269. doi: 10.1007/s00284-005-0412-4
- Mundt JO, Hinkle NF (1976) Bacteria within ovules and seeds. *Appl Environ Microbiol* 32:694–698.

- Murry MA, Zhang D, Schneider M, De Bruijn FJ (1995) Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction (rep-PCR) to fingerprint the genomes of *Frankia* isolates. In: Symbiosis. Balaban, pp 223–240
- Murthy NKS, Bleakley BH (2012) Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used For Screening of Chitinase- Producing Microorganisms.
- Musengi A, Khan N, Le Roes-Hill M, et al (2014) Increasing the scale of peroxidase production by *Streptomyces* sp. strain BSII#1. J Appl Microbiol 116:554–562. doi: 10.1111/jam.12380
- Muzzarelli RA (1999) Native, industrial and fossil chitins. EXS 87:1–6.
- Nagpure A, Gupta RK (2013) Purification and characterization of an extracellular chitinase from antagonistic *Streptomyces violaceusniger*: Purification and characterization of an extracellular chitinase. J Basic Microbiol 53:429–439. doi: 10.1002/jobm.201100648
- Nakashima T, Takahashi Y, Ōmura S (2016) Search for new compounds from Kitasato microbial library by physicochemical screening. Biochem Pharmacol. doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.026
- Nancib N, Nancib A, Boudjelal A, et al (2001) The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *raamnosus*. Bioresour Technol 78:149–153.
- Nawani NN, Kapadnis BP (2005) Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. Process Biochem 40:651–660.
- Nawani NN, Kapadnis BP (2003) Chitin degrading potential of bacteria from extreme and moderate environment. Indian J Exp Biol 41:248–254.
- Nawani NN, Kapadnis BP (2001) One-step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate. J Appl Microbiol 90:803–808. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01308.x
- Nawani NN, Kapadnis BP, Das AD, et al (2002) Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. J Appl Microbiol 93:965–975.
- Nazari B, Kobayashi M, Saito A, et al (2013) Chitin-Induced Gene Expression in Secondary Metabolic Pathways of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Grown in Soil. Appl Environ Microbiol 79:707–713. doi: 10.1128/AEM.02217-12
- Nazari B, Saito A, Kobayashi M, et al (2011) High expression levels of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. FEMS Microbiol Ecol 77:623–635. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01143.x
- Neeraja C, Anil K, Purushotham P, et al (2010) Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. Crit Rev Biotechnol 30:231–241. doi: 10.3109/07388551.2010.487258
- Neuhaus JM (1999) Plant chitinases. CRC Press,

- Neuhaus J-M, Fritig B, Linthorst HJM, et al (1996) A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol Biol Report* 14:102–104. doi: 10.1007/BF02684897
- Nguyen-Thi N, Doucet N (2016) Combining chitinase C and N-acetylhexosaminidase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) provides an efficient way to synthesize N-acetylglucosamine from crystalline chitin. *J Biotechnol* 220:25–32. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.12.038
- Nielsen MN, Sørensen J (1999) Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 30:217–227.
- Niladevi KN, Prema P (2005) Mangrove Actinomycetes as the Source of Ligninolytic Enzymes. *Actinomycetologica* 19:40–47. doi: 10.3209/saj.19.40
- Noishiki Y, Nishiyama Y, Wada M, Kuga S (2005) Complexation of α -Chitin with Aliphatic Amines. *Biomacromolecules* 6:2362–2364. doi: 10.1021/bm0500446
- Normand P, Benson DR, Berry AM, Tisa LS (2014) The Family Frankiaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. (eds) *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, pp 339–356
- Ogawa M, Kumamaru T, Satoh H, et al (1987) Purification of Protein Body-I of Rice Seed and its Polypeptide Composition. *Plant Cell Physiol* 28:1517–1527. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a077446
- Ohno M, Kimura M, Miyazaki H, et al (2016) Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system. *Sci Rep* 6:37756. doi: 10.1038/srep37756
- Ohno M, Togashi Y, Tsuda K, et al (2013) Quantification of Chitinase mRNA Levels in Human and Mouse Tissues by Real-Time PCR: Species-Specific Expression of Acidic Mammalian Chitinase in Stomach Tissues. *PLoS ONE* 8:e67399. doi: 10.1371/journal.pone.0067399
- Ohno T, Armand S, Hata T, et al (1996) A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J Bacteriol* 178:5065–5070.
- Ohnuma T, Numata T, Osawa T, et al (2011) A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta* 234:123–137. doi: 10.1007/s00425-011-1390-3
- O’Neil SE, Heinrich TK, Hales BJ, et al (2006) The chitinase allergens Der p 15 and Der p 18 from *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 36:831–839. doi: 10.1111/j.1365-2222.2006.02497.x
- Ordentlich A, Elad Y, Chet I (1988) The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 78:84–88.
- Orikoshi H, Nakayama S, Miyamoto K, et al (2005) Roles of Four Chitinases (ChiA, ChiB, ChiC, and ChiD) in the Chitin Degradation System of Marine Bacterium *Alteromonas* sp. Strain O-7. *Appl Environ Microbiol* 71:1811–1815. doi: 10.1128/AEM.71.4.1811-1815.2005

- O’Riordan A, McHale ML, Gallagher J, McHale AP (1989) Chitinase production following co-immobilization of *Micromonospora chalcae* with chitin in calcium alginate. *Biotechnol Lett* 11:735–738. doi: 10.1007/BF01044107
- Oskay M, Üsame T, Cem A (2004) Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol* 3:441–446. doi: 10.5897/AJB2004.000-2087
- Oussadi MI, Kitouni M (2015) Statistical optimization of cultural conditions of an halophilic alpha-amylase production by halophilic *Streptomyces* sp. grown on orange waste powder. *Biocatal Agric Biotechnol* 4:685–693. doi: 10.1016/j.bcab.2015.08.011
- Palvannan T, Sathishkumar P (2010) Production of laccase from *Pleurotus florida* NCIM 1243 using Plackett–Burman Design and Response Surface Methodology. *J Basic Microbiol* 50:325–335. doi: 10.1002/jobm.200900333
- Pan CM, Fan YT, Xing Y, et al (2008) Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2. *Bioresour Technol* 99:3146–3154.
- Parisien A, Allain B, Zhang J, et al (2007) Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol* 104:1–13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03498.x
- Passarinho PA, Van Hengel AJ, Fransz PF, de Vries SC (2001) Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3 / AtchitIV endochitinase gene. *Planta* 212:556–567. doi: 10.1007/s004250000464
- Passonneau JV, Williams CM (1953) The Moulting Fluid of the *Cecropia Silkworm*. *J Exp Biol* 30:545–560.
- Pasternak Z, Al-Ashhab A, Gatica J, et al (2013) Spatial and Temporal Biogeography of Soil Microbial Communities in Arid and Semiarid Regions. *PLoS ONE* 8:e69705. doi: 10.1371/journal.pone.0069705
- Patel B, Gohel V, Raol B (2007) Statistical optimisation of medium components for chitinase production by *Paenibacillus sabina* strain JD2. *Ann Microbiol* 57:589–597.
- Pathom-aree W, Stach JEM, Ward AC, et al (2006) Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10:181–189. doi: 10.1007/s00792-005-0482-z
- Patil null, Ghormade null, Deshpande null (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* 26:473–483.
- Patrulea V, Ostafe V, Borchard G, Jordan O (2015) Chitosan as a starting material for wound healing applications. *Eur J Pharm Biopharm* 97:417–426. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.08.004
- Pedersen H, Nielsen J (2000) The influence of nitrogen sources on the alpha-amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:278–281.

- Peela S, Kurada VB, Terli R (2005) Studies on antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal. *World J Microbiol Biotechnol* 21:583–585. doi: 10.1007/s11274-004-3493-5
- Pelmont J (2005) Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences, L'Editeur
- Peniche C, Argüelles-Monal W, Goycoolea FM (2008) Chitin and chitosan: major sources, properties and applications. Monomers, polymers and composites from renewable resources.
- Perrakis A, Wilson KS, Chet I, et al (1993) Phylogenetic relationships of chitinases. *Chitin Enzymol* 217–232.
- Peter MG, Schweikart F (1990) Chitin Biosynthesis Enhancement by the Endochitinase Inhibitor Allosamidin. *Biol Chem Hoppe Seyler* 371:471–474. doi: 10.1515/bchm3.1990.371.1.471
- Petrossian G (2012) Discovery and Isolation of Bioactive Natural Products from Actinomycete Bacteria With an Examination of Infectious Disease Drug Development and Application: A Comparison of the Developing and Developed Worlds.
- Petrosyan P (2003) *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:269–273. doi: 10.1099/ijs.0.02251-0
- Pettit GR, Tan R, Melody N, et al (1999) Antineoplastic agents. Part 409: Isolation and structure of montanastatin from a terrestrial actinomycete. *Bioorg Med Chem* 7:895–899.
- Peumans WJ (2002) The Abundant Class III Chitinase Homolog in Young Developing Banana Fruits Behaves as a Transient Vegetative Storage Protein and Most Probably Serves as an Important Supply of Amino Acids for the Synthesis of Ripening-Associated Proteins. *PLANT Physiol* 130:1063–1072. doi: 10.1104/pp.006551
- Plackett RL, Burman JP (1946) The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika* 33:305. doi: 10.2307/2332195
- Pochon J, Tardieux P (1962) Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Éditions de la Tourelle
- Poulicek M, Gaill F, Goffinet G (1998) Chitin Biodegradation in Marine Environments. In: Stankiewicz BA, van Bergen PF (eds) Nitrogen-Containing Macromolecules in the Bio- and Geosphere. American Chemical Society, Washington, DC, pp 163–210
- Pradeep GC, Choi YH, Choi YS, et al (2014) An extremely alkaline novel chitinase from *Streptomyces* sp. CS495. *Process Biochem* 49:223–229. doi: 10.1016/j.procbio.2013.12.002
- Prajapati VS, Trivedi UB, Patel KC (2015) A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation. *3 Biotech* 5:211–220. doi: 10.1007/s13205-014-0213-1

- Prauser H (1981) Nocardioform organisms: General characterisation and taxonomic relationships. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 11:17–24.
- Prescott LM (2010) *Microbiologie*. De Boeck, Bruxelles
- Qin S, Li W-J, Dastager SG, Hozzein WN (2016) Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity, Function Roles and Environmental Adaptations. *Frontiers Media SA*
- Rabeeth M, Anitha A, Srikanth G (2011) Purification of an Antifungal Endochitinase from a Potential Biocontrol Agent *Streptomyces griseus*. *Pak J Biol Sci* 14:788–797. doi: 10.3923/pjbs.2011.788.797
- Rademaker JL, de Bruijn FJ (1997) Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: *DNA markers: protocols, applications and overviews*. pp 151–171
- Rangaswami G, Bagyaraj DJ (2004) *Agricultural microbiology*, 2. ed., 6. printing. Prentice Hall of India, New Delhi
- Rao FV, Houston DR, Boot RG, et al (2003) Crystal Structures of Allosamidin Derivatives in Complex with Human Macrophage Chitinase. *J Biol Chem* 278:20110–20116. doi: 10.1074/jbc.M300362200
- Rao KJ, Kim C-H, Rhee S-K (2000) Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Process Biochem* 35:639–647.
- Renkema GH, Boot RG, Au FL, et al (1998) Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 251:504–509. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2510504.x
- Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, et al (1995) Purification and Characterization of Human Chitotriosidase, a Novel Member of the Chitinase Family of Proteins. *J Biol Chem* 270:2198–2202. doi: 10.1074/jbc.270.5.2198
- Renkema GH, Boot RG, Strijland A, et al (1997) Synthesis, Sorting, and Processing into Distinct Isoforms of Human Macrophage Chitotriosidase. *Eur J Biochem* 244:279–285. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00279.x
- Reynolds DM (1954) Exocellular chitinase from a *Streptomyces* sp. *Microbiology* 11:150–159.
- Rifaat HM, El-Said OH, Hassanein SM& S (2006) Protease activity of some mesophilic streptomycetes isolated from Egyptian habitats. *J Cult Collect* 5:16–24.
- Rifaat HM, Hassanein SM, El-Said OH, et al (2005) Purification and characterisation of extracellular neutral protease from *Streptomyces microflavus*. *Arab J Biotechnol* 9:51–60575.

- Rinaudo M (2008) Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym Int* 57:397–430. doi: 10.1002/pi.2378
- Robert N, Roche K, Lebeau Y, et al (2002) Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Sci* 162:389–400. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00576-3
- Roberts RL, Cabib E (1982) *Serratia marcescens* chitinase: One-step purification and use for the determination of chitin. *Anal Biochem* 127:402–412. doi: 10.1016/0003-2697(82)90194-4
- Robertus JD, Monzingo AF (1999) The structure and action of chitinases. *EXS* 87:125–135.
- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, et al (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* 1:283–290. doi: 10.1038/ismej.2007.53
- Romaguera A, Tschech A, Bender S, et al (1993) Protoplast formation by a mycolase from *Streptomyces olivaceoviridis* and purification of chitinases. *Enzyme Microb Technol* 15:412–417. doi: 10.1016/0141-0229(93)90128-O
- Roncero C (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet* 41:367–378. doi: 10.1007/s00294-002-0318-7
- Rong X, Huang Y (2010) Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:696–703. doi: 10.1099/ijs.0.012419-0
- Rosenberg IM (2005) *Protein Analysis and Purification*. Birkhäuser Boston, Place of publication not identified
- Roukas T, Kotzekidou P (1997) Pretreatment of date syrup to increase citric acid production. *Enzyme Microb Technol* 21:273–276.
- Rugthaworn P, Dilokkunanant U, Sangchote S, et al (2007) A search and improvement of actinomycete strains for biological control of plant pathogens. *Kasetsart J.(Nat. Sci)* 41:248–254.
- Ruiz-Herrera J, San-Blas G (2003) Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr Drug Targets Infect Disord* 3:77–91.
- Sabaou N, Hacène H, Bennadji A, et al (1992) Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can J Microbiol* 38:1066–1073. doi: 10.1139/m92-175
- Sagheer FAA, Al-Sughayer MA, Muslim S, Elsabee MZ (2009) Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydr Polym* 77:410–419. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.01.032
- Saito A, Fujii T, Yoneyama T, et al (1999) High-multiplicity of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Biosci Biotechnol Biochem* 63:710–718.

- Saito A, Ishizaka M, Francisco PB, et al (2000) Transcriptional co-regulation of five chitinase genes scattered on the *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome. *Microbiology* 146:2937–46.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec Biol Evol* 4:406–425.
- Sakuda S, Inoue H, Nagasawa H (2013) Novel Biological Activities of Allosamidins. *Molecules* 18:6952–6968. doi: 10.3390/molecules18066952
- Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S, Suzuki A (1987) Search for microbial insect growth regulators. II Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J Antibiot (Tokyo)* 40:296–300. doi: 10.7164/antibiotics.40.296
- Sakurada M, Morgavi DP, Komatani K, et al (1996) Purification and characteristics of cytosolic chitinase from *Piromyces communis* OTS1. *FEMS Microbiol Lett* 137:75–78.
- Salzer P, Bonanomi A, Beyer K, et al (2000) Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* 13:763–777. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.7.763
- Sámi L, Pusztahelyi T, Emri T, et al (2001) Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: Chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *J Gen Appl Microbiol* 47:201–211. doi: 10.2323/jgam.47.201
- Sanchez S, Demain AL (2002) Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme Microb Technol* 7:895–906.
- Sanchez-Vallet A, Mesters JR, Thomma BPHJ (2015) The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev* 39:171–183. doi: 10.1093/femsre/fuu003
- Sandor E, Pusztahelyi T, Karaffa L, et al (1998) Allosamidin inhibits the fragmentation of *Acremonium chrysogenum* but does not influence the cephalosporin-C production of the fungus. *FEMS Microbiol Lett* 164:231–236.
- Sarkonen N, Könönen E, Summanen P, et al (2000) Oral colonization with *Actinomyces* species in infants by two years of age. *J Dent Res* 79:864–867.
- Savic M, Bratic I, Vasiljevic B (2007) *Streptomyces durmitorensis* sp. nov., a producer of an FK506-like immunosuppressant. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2119–2124. doi: 10.1099/ijs.0.64913-0
- Schaefer J, Kramer KJ, Garbow JR, et al (1987) Aromatic cross-links in insect cuticle: detection by solid-state ¹³C and ¹⁵N NMR. *Science* 235:1200–1204.
- Schickler H, Chet I (1997) Heterologous chitinase gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:196–201.

- Schmidt J, Rohrig H, John M, et al (1993) Alteration of plant growth and development by *Rhizobium nodA* and *nodB* genes involved in the synthesis of oligosaccharide signal molecules. *Plant J* 4:651–658. doi: 10.1046/j.1365-313X.1993.04040651.x
- Schnellmann J, Zeltins A, Blaak H, Schrempf H (1994) The novel lectin-like protein CHB1 is encoded by a chitin-inducible *Streptomyces olivaceoviridis* gene and binds specifically to crystalline α -chitin of fungi and other organisms. *Mol Microbiol* 13:807–819. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00473.x
- Schrempf H (2001) Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79:285–289. doi: 10.1023/A:1012058205158
- Scopes RK (1994) *Protein Purification*. Springer New York, New York, NY
- Ser H-L, Zainal N, Palanisamy UD, et al (2015) *Streptomyces gilvigriseus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from mangrove forest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107:1369–1378. doi: 10.1007/s10482-015-0431-5
- Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow DC (1993) Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4266–4270.
- Shahidi F (2005) Nutraceuticals from Seafood and Seafood By-Products. In: *Asian Functional Foods*. CRC Press, pp 267–288
- Shahidi F, Abuzaytoun R (2005) Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv Food Nutr Res* 49:93–135. doi: 10.1016/S1043-4526(05)49003-8
- Sharma M (2014) Actinomycetes: source, identification, and their applications. *Int. J Curr Microbiol App Sci* 3:801–832.
- Shekhar N, Bhattacharya D, Kumar D, Gupta RK (2006) Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2. *Can J Microbiol* 52:805–808. doi: 10.1139/w06-035
- Shen Z, Jacobs-Lorena M (1999) Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates. *J Mol Evol* 48:341–347.
- Sherief AA, El-Sawah MMA, El-Naby MAA (1991) Some properties of chitinase produced by a potent *Aspergillus carneus* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:228–230.
- Shimojoh M, Fukushima K, Kurita K (1998) Low-molecular-weight chitosans derived from β -chitin : preparation, molecular characteristics and aggregation activity. *Carbohydr Polym* 35:223–231.
- Shinshi H, Neuhas JM, Ryals J, Meins F (1990) Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol Biol* 14:357–368.
- Showalter AM (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function: *Cell Mol Life Sci* 58:1399–1417. doi: 10.1007/PL00000784

- Shuler ML, Kargi F (2002) *Bioprocess engineering: basic concepts*, 2nd ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ
- Siham J, Konstantin B, Iraqui Mohammed, et al (2012) Isolation and molecular identification of antibiotic-producing actinomycetes from an old house in the medina of Fez, Morocco. *Afr J Microbiol Res* 6:7370–7376. doi: 10.5897/AJMR12.1711
- Simmons CW, Reddy AP, D’haeseleer P (2014) Metatranscriptomic analysis of lignocellulolytic microbial communities involved in high-solids decomposition of rice straw. *Biotechnol Biofuels* 31:495.
- Singh AK, Mehta G, Chhatpar HS (2009) Optimization of medium constituents for improved chitinase production by *Paenibacillus* sp. D1 using statistical approach. *Lett Appl Microbiol* 49:708–714.
- Singh R, Kumar V, Kapoor V (2014) Partial Purification and Characterization of a Heat Stable α -amylase from a Thermophilic Actinobacteria, *Streptomyces* sp. MSC702. *Enzyme Res* 2014:106363.
- Sneath PHA (1957) The Application of Computers to Taxonomy. *Microbiology* 17:201–226. doi: 10.1099/00221287-17-1-201
- Somashekar D, Joseph R (1996) Chitosanases — properties and applications: A review. *Bioresour Technol* 55:35–45. doi: 10.1016/0960-8524(95)00144-1
- Song J, Weon H-Y, Yoon S-H (2001) Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol Lett* 202:97–102.
- Spaink H, Wijffjes A, van VT, et al (1993) Rhizobial Lipo-oligosaccharide Signals and Their Role in Plant Morphogenesis; Are Analogous Lipophilic Chitin Derivatives Produced by the Plant? *Aust J Plant Physiol* 20:381. doi: 10.1071/PP9930381
- Srivibool R, Sukchotiratana M (2006) Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin J Sci Technol* 28:493–499.
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 44:846–849. doi: 10.1099/00207713-44-4-846
- St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK (1986) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Microbiology* 132:1509–1517.
- Stuessy TF, Hörandl E (2014) Evolutionary Systematics and Paraphyly: Introduction ¹. *Ann Mo Bot Gard* 100:2–5. doi: 10.3417/2012083
- Suzuki K, Sugawara N, Suzuki M, et al (2002a) Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:1075–1083.

- Suzuki M, Fujimoto W, Goto M, et al (2002b) Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastrointestinal tract of mice and chickens. *J Histochem Cytochem* 50:1081–1089.
- Suzuki S, Nakanishi E, Ohira T, et al (2006) Chitinase Inhibitor Allosamidin Is a Signal Molecule for Chitinase Production in Its Producing *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)* 59:410–417. doi: 10.1038/ja.2006.58
- Syrmis MW (2004) Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J Med Microbiol* 53:1089–1096. doi: 10.1099/jmm.0.45611-0
- Taechowisan T, Peberdy JF, Lumyong S (2003) Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Ann Microbiol* 53:447–462.
- Tahtamouni MEW, Hameed KM, Saadoun IM (2006) Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* Using Indigenous Chitinolytic Actinomycetes in Jordan. *Plant Pathol J* 22:107–114. doi: 10.5423/PPJ.2006.22.2.107
- Taira T, Hayashi H, Tajiri Y, et al (2009) A plant class V chitinase from a cycad (*Cycas revoluta*): Biochemical characterization, cDNA isolation, and posttranslational modification. *Glycobiology* 19:1452–1461. doi: 10.1093/glycob/cwp119
- Taira T, Ohnuma T, Yamagami T, et al (2002) Antifungal Activity of Rye (*Secale cereale*) Seed Chitinases: the Different Binding Manner of Class I and Class II Chitinases to the Fungal Cell Walls. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:970–977. doi: 10.1271/bbb.66.970
- Takakura Y, Ito T, Saito H, et al (2000) Flower-predominant expression of a gene encoding a novel class I chitinase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* 42:883–897.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Tanabe T, Kawase T, Watanabe T, et al (2000) Purification and characterization of a 49-kDa chitinase from *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J Biosci Bioeng* 89:27–32. doi: 10.1016/S1389-1723(00)88046-9
- Tanaka T, Fujiwara S, Nishikori S, et al (1999) A Unique Chitinase with Dual Active Sites and Triple Substrate Binding Sites from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *Appl Environ Microbiol* 65:5338–5344.
- Thomas CJ, Possee RD, Gooday GW, King LA (2000) Mutagenesis of the active site coding region of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chiA gene. *J Gen Virol* 81:1403–1411. doi: 10.1099/0022-1317-81-5-1403
- Thomas CJ, Saville GP, King LA, Possee RD (2002) Partial redistribution of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chitinase in virus-infected cells accompanies mutation of the carboxy-terminal KDEL ER-retention motif. *J Gen Virol* 83:685–694. doi: 10.1099/0022-1317-83-3-685

- Thomson CJ, Power E, Ruebsamen-Waigmann H, Labischinski H (2004) Antibacterial research and development in the 21st Century – an industry perspective of the challenges. *Curr Opin Microbiol* 7:445–450. doi: 10.1016/j.mib.2004.08.009
- Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nusslein K, et al (1999) Opening the black box of soil microbial diversity.
- Toharisman A, Suhartono MT, Spindler-Barth M, et al (2005) Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. *World J Microbiol Biotechnol* 21:733–738. doi: 10.1007/s11274-004-4797-1
- Torsvik V, Daae FL, Sandaa R-A, Øvreås L (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol* 64:53–62. doi: 10.1016/S0168-1656(98)00103-5
- Torsvik V, Salte K, Sørheim R, Goksøyr J (1990) Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56:776–781.
- Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, et al (2010) A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol* 3:182–196.
- Trejo-Estrada SR, Paszczynski A, Crawford DL (1998) Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21:81–90. doi: 10.1038/sj.jim.2900549
- Trujillo M, Gremlich HU, Sanglier JJ (1997) Selection strategy of traditional microorganisms for pharmacological screenings. In: *Developments in Industrial Microbiology*. p 33
- Truyens S, Weyens N, Cuypers A, Vangronsveld J (2015) Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants: Bacterial seed endophytes. *Environ Microbiol Rep* 7:40–50. doi: 10.1111/1758-2229.12181
- Tsuji H, Nishimura S, Inui T, et al (2010) Kinetic and crystallographic analyses of the catalytic domain of chitinase from *Pyrococcus furiosus*- the role of conserved residues in the active site. *FEBS J* 277:2683–2695. doi: 10.1111/j.1742-464X.2010.07685.x
- Tsujibo H, Minoura K, Miyamoto K, et al (1993) Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl Environ Microbiol* 59:620–622.
- Ubhayasekera W (2011) Structure and function of chitinases from glycoside hydrolase family 19. *Polym Int* 60:890–896. doi: 10.1002/pi.3028
- Ubhayasekera W, Rawat R, Ho SWT, et al (2009) The first crystal structures of a family 19 class IV chitinase: the enzyme from Norway spruce. *Plant Mol Biol* 71:277–289. doi: 10.1007/s11103-009-9523-9
- Ueda M, Ohata K, Konishi T, et al (2009) A novel goose-type lysozyme gene with chitinolytic activity from the moderately thermophilic bacterium *Ralstonia* sp. A-471: cloning, sequencing, and expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:1077–1085. doi: 10.1007/s00253-008-1676-y

- Vaidya RJ, Shah IM, Vyas PR, Chhatpar HS (2001) Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential in antifungal biocontrol. *World J Microbiol Biotechnol* 17:691–696.
- Van Aalten DMF, Komander D, Synstad B, et al (2001) Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci* 98:8979–8984. doi: 10.1073/pnas.151103798
- van Hengel AJ, Guzzo F, van Kammen A, de Vries SC (1998) Expression Pattern of the Carrot EP3 Endochitinase Genes in Suspension Cultures and in Developing Seeds. *Plant Physiol* 117:43–53.
- Van Hengel AJ, Van Kammen A, de Vries SC (2002) A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiol Plant* 114:637–644. doi: 10.1034/j.1399-3054.2002.1140418.x
- Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller TH, Conejero V (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol Report* 12:245–264.
- van Wezel GP, McKenzie NL, Nodwell JR (2009) Chapter 5 Applying the Genetics of Secondary Metabolism in Model Actinomycetes to the Discovery of New Antibiotics. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp 117–141
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, et al (2007) Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:495–548. doi: 10.1128/MMBR.00005-07
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski R (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial enzymes. *Nucleic Acids Res* 19:6823–6831. doi: 10.1093/nar/19.24.6823
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski J (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* 5:25–40.
- Vonothini G, Murugan M, Sivakumar K, Sudha S (2008) Optimization of protease production by an actinomycete Strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *Afr J Biotechnol* 7:3225–3230. doi: 10.5897/AJB08.567
- Wahyuni S, Suhartono MT, Khaeruni A, et al (2016) Purification and Characterization of Thermostable Chitinase from *Bacillus* SW41 for Chitin Oligomer Production. *Asian J Chem* 28:2731–2736. doi: 10.14233/ajchem.2016.20099
- Wang Q, Duan B, Duan B, et al (2015) Screening and Identification of Chitinolytic Actinomycetes and Study on the Inhibitory Activity against Turfgrass Root Rot Disease Fungi. *J Biosci Med* 3:56–65. doi: 10.4236/jbm.2015.33009
- Wang Q, Zhou Z-Y, Sakuda S, Yamada Y (1993) Purification of allosamidin-sensitive and-insensitive chitinases produced by allosamidin-producing *Streptomyces*. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:467–470.

- Wang S-L, Chang W-T (1997) Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Appl Environ Microbiol* 63:380–386.
- Wang Z-W, Liu X-L (2008) Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated *Paenibacillus* sp. using response surface methodology. *Bioresour Technol* 99:8245–8251.
- Watanabe T, Kanai R, Kawase T, et al (1999) Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiol Read Engl* 145 (Pt 12):3353–3363. doi: 10.1099/00221287-145-12-3353
- Welburn SC, Maudlin I, Molyneux DH (1994) Midgut lectin activity and sugar specificity in teneral and fed tsetse. *Med Vet Entomol* 8:81–87. doi: 10.1111/j.1365-2915.1994.tb00391.x
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6578–6583.
- Wierenga R. (2001) The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett* 492:193–198. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02236-0
- Wiwat C, Siwayaprahm P, Bhumiratana A (1999) Purification and Characterization of Chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. *Curr Microbiol* 39:134–140. doi: 10.1007/s002849900434
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221–271.
- Wysokowski M, Petrenko I, Stelling A, et al (2015) Poriferan Chitin as a Versatile Template for Extreme Biomimetics. *Polymers* 7:235–265. doi: 10.3390/polym7020235
- Xia W, Liu P, Liu J (2008) Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases. *Bioresour Technol* 99:6751–6762. doi: 10.1016/j.biortech.2008.01.011
- Xu L, Li Q, Jiang C (1996) Diversity of soil actinomycetes in yunnan, china. *Appl Environ Microbiol* 62:244–248.
- Yamada T, Satoh S, Ishikawa H, et al (2010) A jumbo phage infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* defines a new lineage of the Myoviridae family. *Virology* 398:135–147. doi: 10.1016/j.virol.2009.11.043
- Yamamura H, Hayakawa M, Nakagawa Y, Iimura Y (2004) Characterization of *Nocardia asteroides* Isolates from Different Ecological Habitats on the Basis of Repetitive Extragenic Palindromic-PCR Fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 70:3149–3151. doi: 10.1128/AEM.70.5.3149-3151.2004
- Yandigeri MS, Malviya N, Solanki MK, et al (2015) Chitinolytic *Streptomyces vinaceusdrappus* S5MW2 isolated from Chilika lake, India enhances plant growth and biocontrol efficacy through chitin supplementation against *Rhizoctonia solani*. *World J Microbiol Biotechnol* 31:1217–1225. doi: 10.1007/s11274-015-1870-x

- Yenamalli RM, Rader AJ, Wolt JD, Sen TZ (2011) Thermostability in endoglucanases is fold-specific. *BMC Struct Biol* 11:10. doi: 10.1186/1472-6807-11-10
- Younas A, Saleem M, Tariq H, et al (2016) Purification and Biochemical Characterization of a Pathogenesis Related Endochitinase *Arachis hypogaea*.
- Yu X, Hallett SG, Sheppard J, Watson AK (1997) Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:301–305.
- Yuan WM, Crawford DL (1995) Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl Environ Microbiol* 61:3119.
- Zechmeister L, Tóth G (1931) Zur Kenntnis der Hydrolyse von Chitin mit Salzsäure (I. Mitteil.). *Berichte Dtsch Chem Ges B Ser* 64:2028–2032. doi: 10.1002/cber.19310640822
- Zhang J (2003) *Nocardia caishijiensis* sp. nov., a novel soil actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:999–1004. doi: 10.1099/ijs.0.02397-0
- Zhang Z, Yuen GY, Sarath G, Penheiter AR (2001) Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopathology* 91:204–211.
- Zhi X-Y, Li W-J, Stackebrandt E (2009) An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:589–608. doi: 10.1099/ijs.0.65780-0
- Zobell CE, Rittenberg SC (1938) The Occurrence And Characteristics Of Chitinoclastic Bacteria In The Sea. *J Bacteriol* 35:275–287.

ANNEXE : 01

Milieux de culture**Milieu Bennett**

D-Glucose anhydre	10 g
Casaminoacide	2 g
Extrait de levure	1 g
Extrait de viande	1 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,3**Milieu MCC**

chitine colloïdale	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,7 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
NaCl	4 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 mg
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 mg
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0**Milieu ISP-2**

Extrait de levure	4 g
Extrait de Malt	10 g
D-Glucose	4 g
Carbonate de calcium	2 g
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,3**Milieu MCC + glucose**

chitine colloïdale	0,1 g
Glucose	2 g
KH ₂ PO ₄	0,7 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
NaCl	4 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 mg
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7.0**Milieu Muller-Hinton**

Extrait de viande	2 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	10 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,4**Milieu Trypticase Soja (TSA)**

Péptone de caséine	15 g
Péptone de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,3

ANNEXE : 02

Préparation des solutions tampons**Solutions**

Na₂HPO₄ à 0.4M : 28.392g de Na₂HPO₄ dans 500 ml d'eau distillée.

Acide citrique à 0.2M : 21.014 g dans 500 ml d'eau distillée.

Tampon Tris-HCl 0,2 M

Tris 0,2M	50 ml
HCl 0,2M	0,2 ml
l'eau distillée stérile	49,8 ml

pH= 9.0

Tampon Citrate-phosphate

Na ₂ HPO ₄ 0,4M	52 ml
Acide citrique 0,2M	48 ml

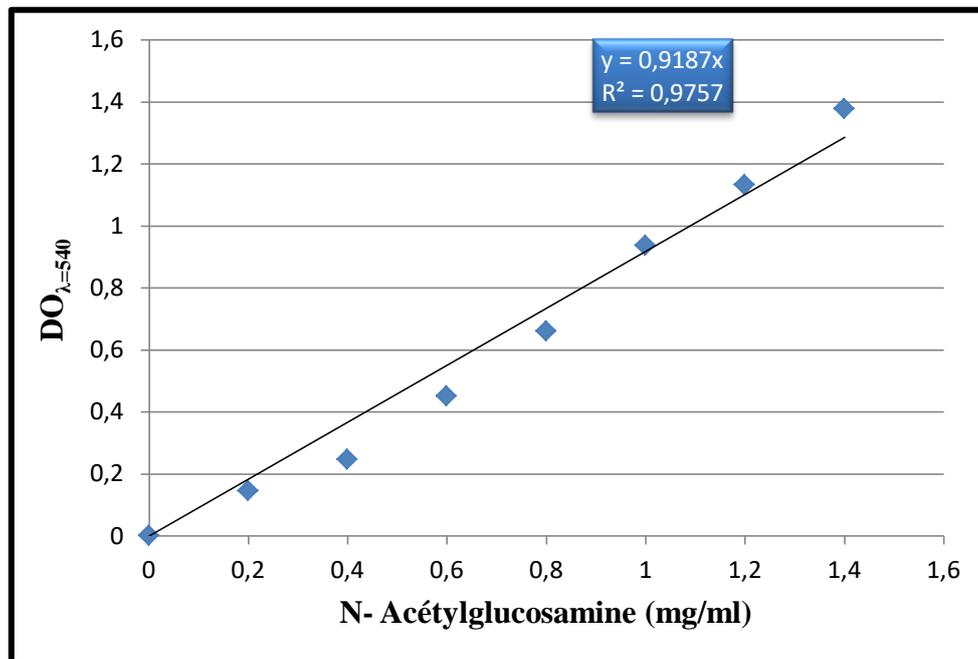
pH=5.0

Tampon acétate de Sodium 50 mM

Acétate de sodium	4,10 g
Acide acétique glacial	2,85 ml
l'eau distillée stérile	1000 ml

pH= 5.0

ANNEXE : 03

Courbe d'étalonnage du N-acétylglucosamine

Courbe d'étalonnage du N-Acétylglucosamine (221 g/mol).

Réactif DNS (Miller *et al.*, 1956)

NaOH	10 g
Potassium Sodium Tartare	182 g
3,5-Dinitrosalicylic Acid	10 g
Phénol	2 g
Sodium sulfite	0,5 g
Eau distillée	1000 mL

Dosage des protéines (Bradford, 1976)

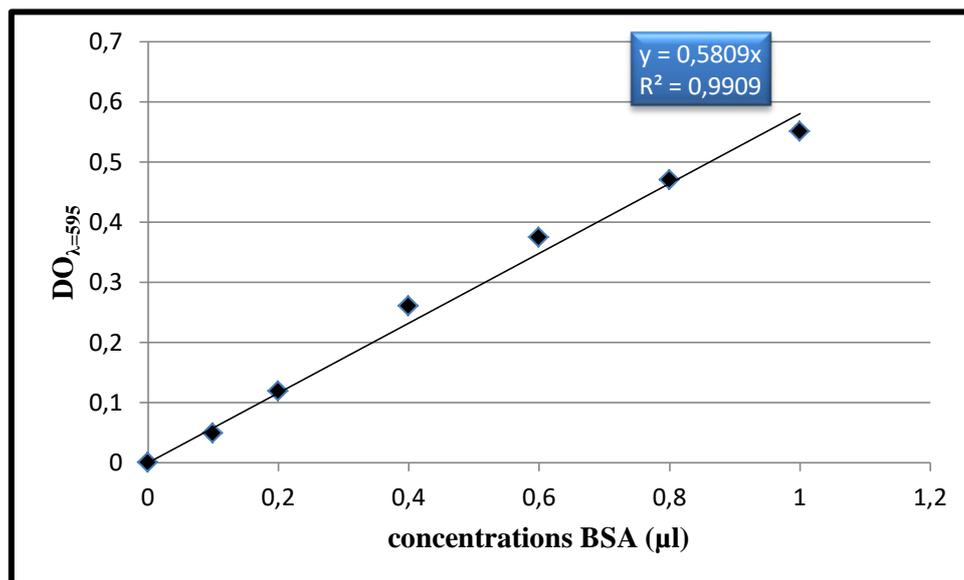
1. Composition du réactif de Bradford

Bleu de Coomassie G-250	100 mg
Ethanol absolu	50 ml
Acide phosphorique à 85%	100 ml
Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.	

Conservation pendant 3 semaines à 4 °C et à l'abri de la lumière.

2. Elaboration de la courbe d'étalonnage

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) (1mg/1ml) selon les quantités suivantes : 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 µl. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 100µl. Après addition de 3 ml du réactif de Bradford et agitation, l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc.



Courbe d'étalonnage du BSA.

ANNEXE : 05**Tableau :** Calcul des ratios de l'activité chitinolytique mesurée à différentes températures après 7 jours de croissance.

	30°C	35°C	40°C	45°C
C1	2,68181818	1,24369075	0,50909091	NP
C2	2,06772727	1,37828283	0,75666667	NP
C4	2,1677229	1,19458226	1,5180303	NP
C6	1,22631674	1,27637604	1,61156288	1,75
C7	1,80395299	1,36296296	1,41371795	0,69791667
C8	1,76923077	1,125	0,74725275	0,36515152
C9	2,51823871	1,00364174	1,91071429	0,78422619
C11	2,16742424	1,21394994	1,63833333	1,6125
C13	1,87071429	1,03789174	0	0,6224026
C14	1,53846154	0,7405303	0	0,71590909
C15	1,89080142	1,12886099	1,59545455	NP
C16	1,625	0,76256614	0,42666667	1,00826211
C17	2,16	0,93134398	1,97333333	NP
C18	1,07	0,36904762	0,85494505	NP
C19	1,76630925	1,21938743	1,01595238	0,71017871
C20	2,60802469	1,31191031	0,72981685	0,7743007
C21	2,08215812	1,39335811	1,90598291	1,75
C22	2,16666667	1,23848964	1,98583333	1,22538595
C23	2,33790284	1,38873002	2,01434343	1,33928571
C24	2,47152778	1,29949364	1,86666667	0,5625
C25	1,81729446	1,4408445	1,92888889	1,39583333
C26	2,52421652	1,33056683	2,07512821	0,55902778
C27	2,19665751	1,25347222	2,02051282	0
C28	1,99480391	1,36727786	2,1	1,9
C29	2,72534873	1,14303555	1,38376068	2
C30	2,67361111	1,29656385	2,25006993	2,05873016
C31	1,60286195	0,89285714	1,6075	1,24542125
C32	2,91414141	0,77655678	1,63482601	1,12319995
C33	3,04001323	2,11979167	3,28722222	1,73874008
C34	2,70474664	0,82984724	1,86102564	1,85714286
C35	2,31228956	0,96314103	1,1510989	NP
C36	2,31812169	1,09246032	1,85470085	NP
C37	2,6656746	1,23637821	2,6	3,34821429
C38	2,25	1,02635208	1,98636364	1,24345377
C39	2,56158425	1,21205357	1,9784188	0
C40	2,43239261	1,81627859	1,86666667	0
S.coelicolor	2,05866078	1,77453102	2,32407407	NP

*NP : Non pousse

Thème :

Isolement, identification et criblage d'actinomycètes à activité chitinolytique du sol de la région de Laghouat.**Optimisation de la production de chitinase par *Streptomyces griseorubens* C9 par la méthode des surfaces de réponse****Résumé**

À partir d'un échantillon de sol de la région de Laghouat, nous avons isolé 40 actinobactéries phénotypiquement différentes. Premièrement, nous avons mené une étude fonctionnelle en criblant ces isolats sur un milieu minimum complété en chitine colloïdale (MCC) pour caractériser leurs activités chitinolytiques dans des conditions extrêmes de températures (30, 35, 40, 45 et 50 °C) et de pH (5, 7 et 9). Par ailleurs, une étude taxonomique a été menée en combinant une approche par BOX-PCR et par séquençage de l'ARNr 16S de 20 souches. Cette identification a montré que 10 de ces isolats appartenaient au genre *Streptomyces*, deux au genre *Micromonospora* et 08 potentielles nouvelles espèces bactériennes. Aussi la recherche d'une activité antimicrobienne contre 06 bactéries-test et deux champignons phytopathogènes a été réalisée, en utilisant une nouvelle approche d'induction/répression de la chitinase par le glucose dans le test antifongique afin de prouver que les chitinases sont bel et bien responsables de l'inhibition des champignons phytopathogènes. Ce qui a permis de trouver que la souche C31 pouvait réduire la croissance fongique seulement après induction de la chitinase par la chitine colloïdale. Le second volet de ce travail a visé à mettre en place un milieu de culture afin d'optimiser la production de la chitinase par la souche *S. griseorubens* C9, en utilisant les plans d'expérience et les méthodes des surfaces de réponse. Un premier plan statistique de Plackett-Burman nous a permis d'identifier quatre facteurs qui ont un effet significatif sur la production de l'enzyme par *S. griseorubens* C9. Ces derniers ont fait l'objet d'une optimisation par le plan d'expérience de Box-Wilson basé sur les composites centrés. Cette étude nous a permis de prédire ce milieu de culture : 2% de chitine colloïdale ; 0,47% de mélasse de datte ; 0,25 g / l d'extrait de levure et 1,81 g / l de K₂HPO₄, KH₂PO₄, pour une production maximale de l'enzyme égale à 0,902 U/ml. Ce qui a été confirmé par des cultures en erlenmeyers où la production de la chitinase par *S. griseorubens* C9 a atteint 1,53 U/ml. Enfin, nous nous sommes penchés sur la purification et la caractérisation partielle de l'enzyme produite dans le milieu optimisé. L'enzyme a subi 3 étapes majeurs de purification où elle a atteint un seuil de purification de 23,24 ; un rendement de 29,7 % et une activité spécifique égale à 2,393 U/mg. L'activité de la chitinase purifiée était maximale à 50 °C et à pH 5,0. L'enzyme a conservé plus de 60% de son activité à un pH compris entre 4,0 et 7,0 et elle est restée stable à des températures comprises entre 30 °C et 60 °C.

Mots clés: Actinomycètes; BOX-PCR; ARNr 16S; chitinases; biocontrol; *Streptomyces griseorubens* C9; Plackett-Burman; Box-Wilson; purification.

Membres du jury :

Président :	Mme. MERAIHI Zahia	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Directeur de thèse :	Mr. Kitouni Mahmoud	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur :	Mr. Kecha Mouloud	Professeur	U. Aberrahmane Mira-Bejaia
Examineur :	Mr. Boudemagh Allaoueddine	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur :	Mr. Hamidechi M ^{ed} Abdelhafid	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine

Année universitaire: 2016 – 2017

