

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SNV

N° :



DOMAINE : SNV

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION : BIOTECHNOLOGIES VEGETALES

Mémoire

Présentée pour l'obtention

de diplôme de Master Académique

En Biotechnologie Végétale

Présenté par : - **BAGHDADI Siham**

- **DJEGHAM Meriem**

Intitulé

Caractérisation de souches de *Paenibacillus timonensis* productrices d'enzyme Chitinase

Soutenu devant le jury composé de :

| | | | |
|------------------|-------|----------------------|-------------------|
| KHALFA Hanane | MCB, | Université de M'Sila | Présidente |
| BENDIF Hamdi | MCA, | Université de M'Sila | Examineur |
| YAHIAOUI Merzouk | MCB , | Université de M'Sila | Promoteur |

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciement

En premier lieu, on tient à remercier Dieu pour le courage, la volonté et la patience qu'il nous a donné pour effectuer ce travail.

Nous avons l'honneur et le plaisir de présenter nos profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre encadreur Dr. YAHIAOUI Merzouk pour sa précieuse aide, ces orientations et le temps qui à réussi à trouver pour contribuer au développement de ce travail.

Nous remercions par ailleurs vivement les membres du jury de nous avoir fait l'honneur de juger notre travail et d'assister à la soutenance.

Nous adressons nos sincères remerciements aux ingénieurs de laboratoire pour leur gentillesse au quotidien dans les moments difficiles et le chef des laboratoires M. Saghiri Kamel pour son aide et encouragement.

Un infini remerciement plein de gratitude, à ma familles, mes proches qui non jamais arrêtés de m'encourager et de m'aider à aller de l'avant, sans oublier tous les amies. Grand Merci à tous ceux qui nous ont aidé de près ou loin durant toute la période de travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

❖ **Ma famille :**

- **Mes parents, qui m'ont guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin et toute ma vie, qui ont sacrifié toute leur vie afin de me voir devenir ce que je suis, merci mes parents.**
- **Mes frères Bacha , Saàd , Hamza, Pedro et Mido , ma sœurs Nour et le plus proche à moi Adem.**

❖ **Mes amies :**

- **Mes très chères Souad et Sihem pour leurs aides et le courage qui m'ont donnée lors de ce travail et les souvenirs pendant les années d'études ensemble.**
- **Mes camarades et les personnes qui m'ont guidé et donné le courage et la confiance, Merci beaucoup.**

❖ **A mes camarades de promotion Master Biotechnologie Végétal.**

Meriem

Dédicace

Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve. Je dédie ce modeste travail :

➤ **A Mon père Saad**

Que dieu lui fasse miséricorde, aucune dédicace ne serait exprimer l'amour, l'estime,

Et le respect que j'ai toujours eu pour vous, pour me soutenir moralement et financièrement dans ma vie académique. Ce travail est le fruit de tes sacrifices et tes consentis pour ma formation.

➤ **A ma très chère mère Aldjia**

Pour son amour, son soutient. L'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

➤ **A ma deuxième famille**

Ma chère sœur Noura et son mari Haidar qui ont une implication majeur dans mon étude.

➤ **A ceux que j'aime beaucoup mes frères Laid, Amer, Saleh, et mes sœurs Rachida, Warda, Fatima qui sont toujours à côté de moi.**

➤ **A ma copine et ma Binôme Meriem**

➤ **A mes camarades de promotion Master Biotechnologie Végétal**

Siham

SOMMAIRE

Remerciement.

Dédicace.

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Généralité

| | | |
|-------|---|----|
| I. | Généralité sur les chitinases | 2 |
| II. | Historique..... | 3 |
| III. | Définition..... | 3 |
| IV. | Classification des chitinases | 4 |
| V. | Classification des chitinases selon leurs origines..... | 7 |
| | V.1.Les Chitinases des microorganismes..... | 7 |
| | V.2.Chitinases fongique | 8 |
| | V.3.Chitinases animales..... | 8 |
| | V.4. Chitinases végétales..... | 9 |
| | V.4.1. Chitinases végétales et développement..... | 9 |
| | V.4.2. Chitinases végétales et défens | 10 |
| VI. | Propriétés physico-chimiques des chitinases | 11 |
| | VI.1. Le poids moléculaire | 11 |
| | VI.2.Le point isoélectrique (pHi) | 11 |
| | VI.3.Activité enzymatique | 11 |
| | VI.4. La stabilité | 11 |
| VII. | Propriétés basiques des chitinases bactériennes | 12 |
| VIII. | Inhibiteur et activateur des chitinases..... | 12 |
| IX. | La chitine, substrat de la chitinase..... | 13 |
| X. | Domaine d'application de chitinase..... | 15 |

Chapitre II : Matériel et Méthodes

| | | |
|-----|---|----|
| I. | Objectif du travail..... | 17 |
| II. | Matériel biologique..... | 17 |
| | II.1.Echantillonnage..... | 17 |
| | II.2. Criblage de l'activité enzymatique extracellulaire..... | 17 |
| | II.2.1.Activité Chitinase..... | 17 |
| | II.2.2. Activité Amylase..... | 18 |
| | II.2.3. Activité Protéase..... | 18 |

| | | |
|-------|---|----|
| III. | Mise en évidence de l'activité chitinolytique..... | 18 |
| IV. | Préparation de la chitine colloïdale..... | 19 |
| V. | Optimisation des conditions de culture pour la production de chitinase..... | 19 |
| VI. | Effet des paramètres de culture sur la production de chitinase..... | 20 |
| | VI.1. Effet du temps d'incubation..... | 20 |
| | VI.2. Effet du pH..... | 20 |
| | VI.3. Effet de la température..... | 20 |
| VII. | Dosage de l'activité chitinolytique..... | 21 |
| VIII. | Mesure de la biomasse..... | 21 |
| IX. | Extraction et purification partielle de l'enzyme..... | 22 |

Chapitre III : Résultats et Discussions

| | | |
|------|--|----|
| I. | Criblage de l'activité enzymatique extracellulaire | 25 |
| II. | Mise en évidence de l'activité chitinolytique sur milieu solide..... | 25 |
| III. | Détermination des optimums de pH et de température..... | 31 |

Conclusion et perspectives.

Références bibliographiques.

Résumé.

Liste des figures

| N° : Figures | Titres | Pages |
|--------------------|--|-----------|
| Figure : 01 | Chitine: Substrat hydrolyse totalement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine, indiquées en 1 sur ce schéma. | 4 |
| Figure : 02 | Chitosane : Substrat hydrolysé partiellement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine, indiquées en 1 sur ce schéma. Les liaisons indiquées en 2 sont hydrolysées par les chitosanases. | 4 |
| Figure : 03 | Présentation schématique des différents domaines constituant les 5 classes de chitinases chez les plantes. | 5 |
| Figure : 04 | La structure chimique de la chitine. | 13 |
| Figure : 05 | Production d'une amylase par les souches de <i>Paenibacillus timonensis</i> . | 28 |
| Figure :06 | Production d'une protéase par les souches de <i>Paenibacillus timonensis</i> . | 28 |
| Figure :07 | Production d'une chitinase par les souches de <i>Paenibacillus timonensis</i> . | 29 |
| Figure :08 | Croissance des souches de <i>P. timonensis</i> sur le milieu contenant la chitine. | 29 |

| N° : Figures | Titres | Pages |
|---------------------|---|--------------|
| Figure : 09 | Absence de la production de chitinase par les souches de <i>P. timonensis</i> à PH 5. | 30 |
| Figure : 10 | Forte production de chitinase par les souches de <i>P. timonensis</i> à PH 7 et PH 9. | 31 |
| Figure : 11 | Forte production de chitinase à une température de 30°C. | 32 |
| Figure : 12 | Absence de production de chitinase à une température de 50°C. | 32 |

Liste des tableaux

| N° : Tableaux | Titres | Pages |
|----------------------|--|--------------|
| Tableau : I | Classification des différentes chitinases en fonction de leurs séquences en acides aminés et de leur provenance. | 6 |
| Tableau : II | Les formes cristallines de chitine | 14 |
| Tableau : III | Résultats de criblage de l'activité enzymatique extracellulaire (suite). | 26-27 |
| Tableau : IV | Effet du pH et de la température sur le diamètre des zones d'hydrolyse. | 30 |

Liste des abréviations :

% : pourcent

° : degré

3D : Trois Dimensions

C : Carbone.

CHB : souche de Burkholderia gladioli

C° : degré Celsius

HUT6037 : Streptomyces griseus.

KDa : : kiloDalton.

PH : : Potentiel Hydrique.

pHi : Le point isoélectrique.

Sp : espèce .

UV : ultra violet

α : Alfa

β : beta

γ : gamma

Introduction

INTRODUCTON

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

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

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

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

L'objectif de ce travail est la mise en évidence de l'éventuelle activité chitinolytique de 30 souches de *Paenibacillus timonensis*, isolées du sol de la montagne de Djurdjura, Tizi Ouzou.

Données
bibliographiques

I. Généralités sur les chitinases

Dès leur apparition sur terre, et bien avant que l'homme ne les domestique et ne les exploite, les plantes étaient la base de l'alimentation de nombreux herbivores et constituaient aussi des sources alimentaires indispensables au développement d'insectes phytophages. Les plantes servaient de substrat pour le développement de nombreux microorganismes bactériens, fongiques et viraux. Les attaques causées par les insectes et pathogènes ont nécessité des plantes qu'elles développent des mécanismes de résistance endogènes impliquant diverses voies métaboliques qui permettent de maintenir les populations à des taux suffisamment bas pour pérenniser les espèces végétales.

Parallèlement, les agresseurs ayant besoin des plantes pour s'alimenter, se développer et se reproduire, ont été contraints d'élaborer à leur tour des stratégies d'évitement ou de détoxification, pour s'adapter et contourner ces mécanismes de défenses. La régulation des mécanismes de défenses des plantes et les stratégies de résistance développées par les agresseurs caractérisent la co-évolution des espèces végétales et des espèces qu'elles hébergent. Quand l'Homme a commencé à cultiver les plantes, il a souhaité tirer le meilleur profit de ses cultures et a dû développer des méthodes de lutte contre les microorganismes (bactéries, champignons) pathogènes et les insectes phytophages, devenus des compétiteurs considérés comme ravageurs. Pendant des siècles, pour lutter contre les agresseurs, les agriculteurs ont pratiqué des rotations de cultures et utilisé divers produits naturels. Ce n'est qu'après la seconde guerre mondiale, que le recours aux produits phytosanitaires chimiques s'est généralisé (**Regnault, 2005**).

Parmi les composés impliqués dans les défenses des plantes en réponse à une attaque par un ravageur ou un pathogène, on trouve de nombreuses protéines dont beaucoup font parties des « pathogenesis-related proteins » (PR-P). Ce terme désigne « les protéines codées par la plante hôte mais induites lors de situations pathologiques ou associées (**Antoniw et al ., 1980**). Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle central dans le monde vivant. Elles sont des macromolécules qui reconnaissent spécifiquement certaines molécules et accélèrent les réactions de transformation de ces molécules (**Raisonnier, 2003**). La chitinase fait partie des enzymes produites par les actinomycètes qui hydrolysent la chitine au niveau de la liaison glucosidique $\beta(1-4)$ Nacétylglucosamine.

Les chitinases sont aussi sécrétées par les plantes, comme un moyen de se protéger naturellement des attaques des maladies fongiques et des insectes en attaquant leur paroi ou leur cuticule à base de chitine (**Iseli, 1996**).

II. Historique

La chitinase a été découverte par Karrer en 1929, et son activité spécifique dans l'hydrolyse de la chitine a été démontrée par Zechmeister en 1939. Ces enzymes se trouvent dans une rangée importante d'organismes, comprenant les bactéries, les champignons, les crustacés, les insectes (**Perrakis et al., 1993**), les plantes (**Neuhaus, 1999**), de puis lors ces molécules sont exactement considérés pendant qu'un outil pour renforcer l'immuno-réaction de plante contre une variété de microbes pathogènes par de divers ouvriers dû à sa propriété pour lyser le mur de cellules et les composants fongiques d'exosquelette d'insecte , sans compter que cette augmentation dramatique de chitinase par de nombreux agents abiotiques (éthylène, acide salicylique, solutions de sel, ozone, lumière UV) et par des facteurs biotiques (mycètes, bactéries, virus), la cellule a également prouvé leur rôle dans la réponse de défense de plante (**punja et al.,1993 ; cupta et al., 2010 b**), en plus de lui, les mycètes pathogènes d'insecte ont potentiel considérable pour la commande biologique des parasites d'insecte qui surmontent apparemment les barrières physiques du centre serveur, en produisant les enzymes extracellulaires multiples comprenant les enzymes chitinolytique qui aident à pénétrer le cuticule et à faciliter l'infection (**herrera-estrella et al., 1999**).

III. Définition

Les différents organismes produisent une large variété d'enzymes hydrolytique spécifiques aux différents substrats, les chitinases font partie de ces enzymes qui hydrolysent la chitine au niveau e la liaison (1→4) - β des résidus de N'acétyl- β -D-glucosaminide. Elles très répandues dans la nature, on les trouve chez les bactéries, les champignons, les plantes, les invertébrés (principalement les nématodes, les insectes et les crustacés) et dans toutes les classes des vertébrés (**perrakis et al., 1994**). Leur rôle est différent d'une espèce à l'autre, certaines chitinases jouent un rôle la défense, alors que d'autres ont un rôle nutritionnel. Elles jouent aussi un rôle important dans le cycle de vie de plusieurs protozoaires et métazoaires parasite qui infectent l'homme. En effet, certaines espèces d'arthropodes hématophage tel que *phlebotomus papatasise* défendent contre les organismes de l'environnement grâce à leur tissu interne qui est recouvert par un matériel chitineux, ce qui constitue un obstacle contre l'invasion des parasites. Dans ces circonstances, le parasite a développé un mécanisme impliquant ces enzymes chitinolytique pour passer à travers cette membrane chitineuse (**Shahabuddi et Kaslow,1993**).

IV. Classification des chitinases

Parmi les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des polymères de sucre on trouve les chitinases, les chitosanases et les lysozymes. Elles sont cataloguées selon leurs séquences d'acides aminés en 50 familles de glycohydrolases (**Henrissat et Bairoch, 1993**).

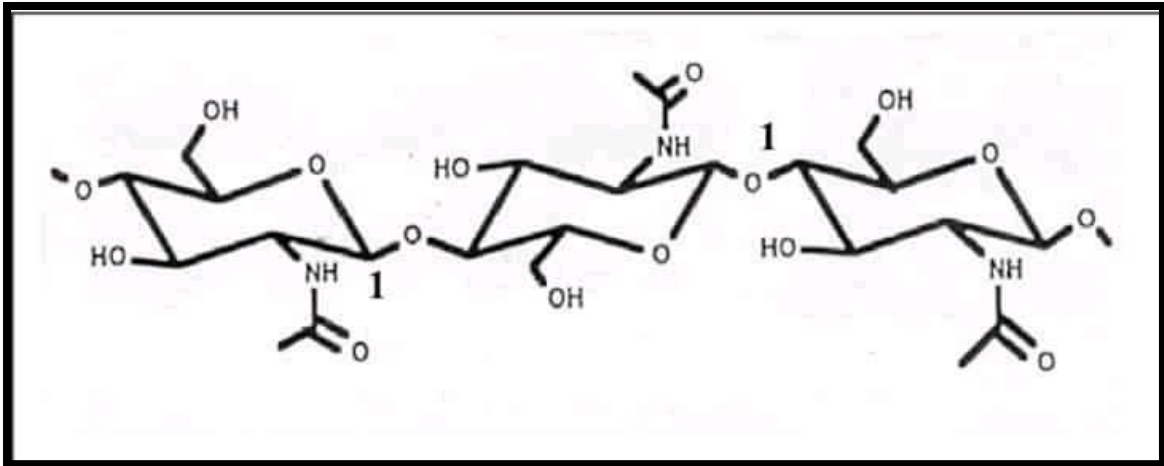


Figure 1 : Chitine: Substrat hydrolyse totalement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine , indiquées en 1 sur ce schéma (**Neuhaus, 1999**).

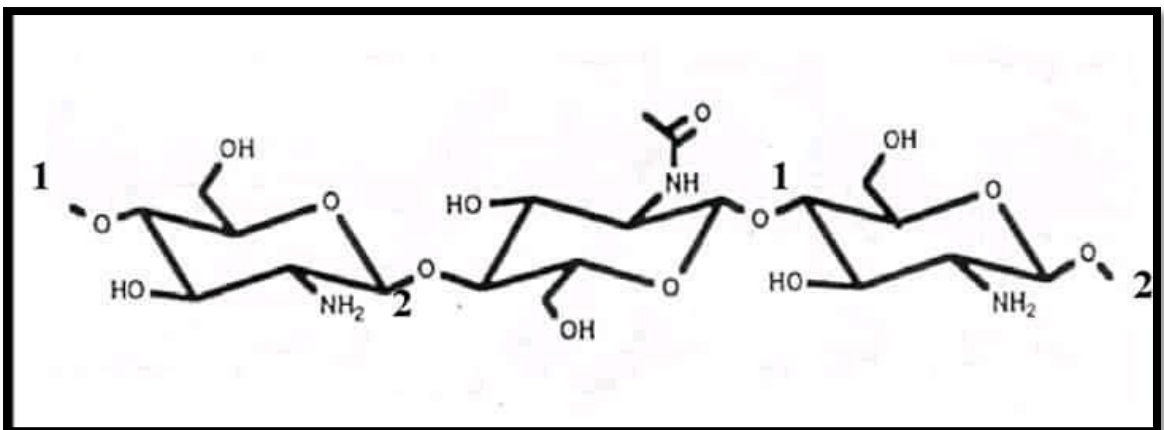


Figure 2 : Chitosane: Substrat hydrolysé partiellement par les chitinases au niveau des liaisons N-acetyl- glucosamine, indiquées en 1 sur ce schéma. Les liaisons indiquées en 2 sont hydrolysées par les chitosanases (**Neuhaus, 1999**).

La première classification des chitinases avait été effectuée sur la base de différentes séquences de chitinases d'espèces de plantes variées (**Melchers *et al.*, 1994 ; Hamel *et al.*, 1997**). Les chitinases ont été regroupées en cinq classes qui constituent deux familles distinctes de glycosides hydrolases, en fonction de différents facteurs, parmi lesquels leur séquence *N*-terminale, leur localisation et leurs propriétés biochimiques (**Henrissat et Davies, 2000; Patil et al ., 2000**), le pHi, la localisation de l'enzyme, et la présence ou l'absence du

peptide signal en différentes classes (I, II, III, IV, V) (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1996).

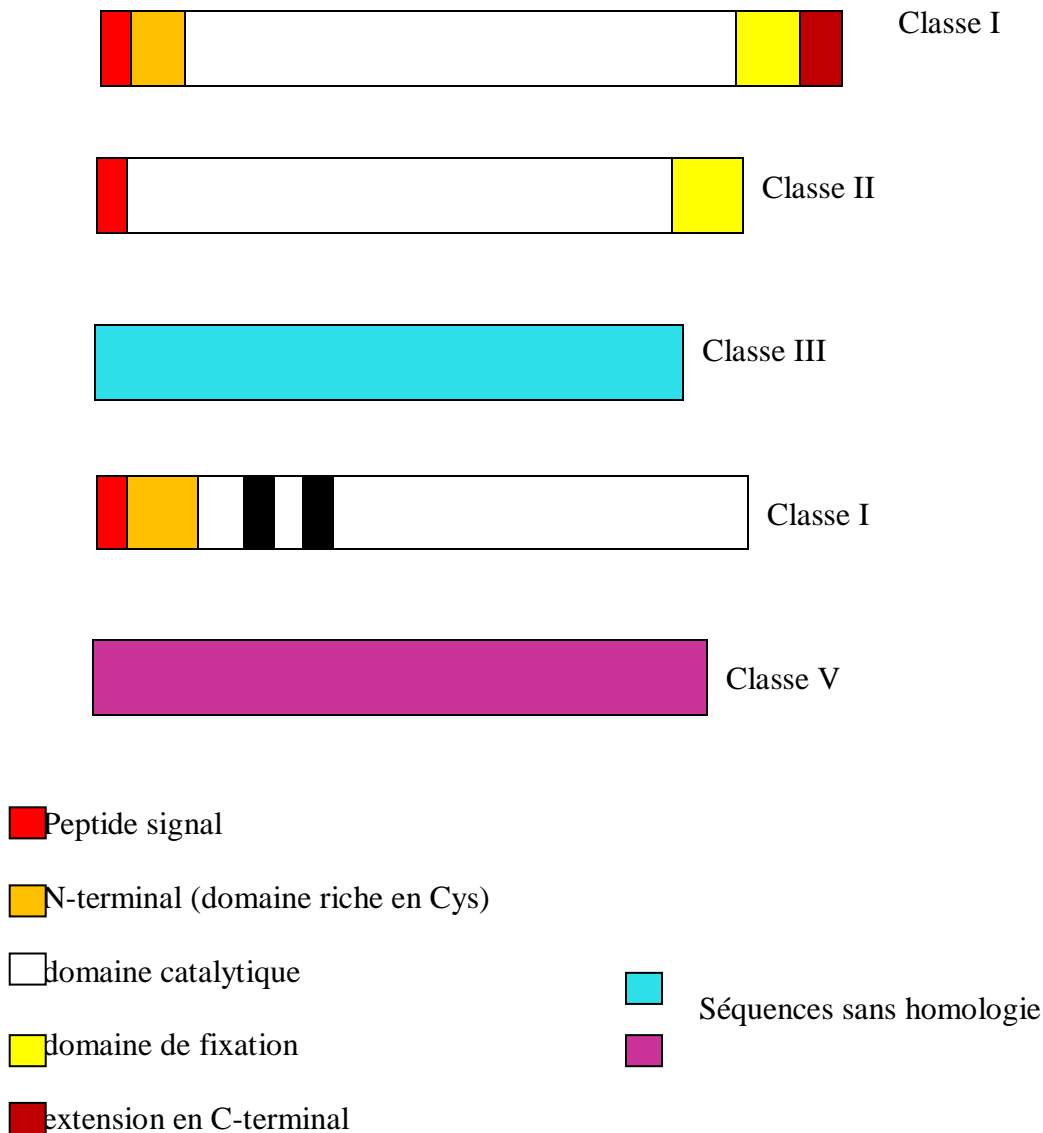


Figure 3 : Présentation schématique des différents domaines constituant les 5 classes de chitinases chez les plantes (Azzouz, 2001).

Les chitinases appartenant à la famille 18 rassemblent plus de 180 enzymes présentes chez les eucaryotes, les procaryotes et les virus, et réparties au sein des classes III et V. La famille 19 regroupe plus de 130 composés essentiellement d'origine végétale et formant les classes I, II et IV (Henrissat, 1999). Les chitinases des deux différentes familles (18 et 19) ne partagent pas une similitude de séquence d'acides aminés, et ont complètement différentes pour la structure tridimensionnelle (3D) (Tews *et al.*, 1997) et des mécanismes moléculaires.

Tableau1. Classification des différentes chitinases en fonction de leurs séquences en acides aminés et de leur provenance (**Azzouz, 2001**).

| Famille 19 | | | Famille 18 | |
|------------|-----------|-----------|-------------|----------|
| Plantes | | | Plantes | |
| Nématodes | | | Virus | |
| Bactéries | | | Bactéries | |
| | | | Champignons | |
| | | | Nématodes | |
| | | | Invertébrés | |
| | | | Vertébrés | |
| Classe I | Classe II | Classe IV | Classe III | Classe V |

➤ **Les chitinases de classe 1 :**

Sont constituées d'un domaine amino – terminal riche en cystéines qui est lié par une courte région riche en glycine/proline au domaine catalytique qui est souvent suivi d'un peptide C-terminale (**perraki et al., 1993**), dans les cellules de plantes, le peptide de ces enzymes est essentiel pour conduire les chitinases vers les vacuoles (**Neuhaus et al., 1991**), le domaine de fixation riche en cystéines ne possède pas d'activité chitinolytique (**iseli B et al.,1993**).

➤ **Les chitinases de classe 2 :**

Ont été caractérisées principalement chez les plantes dicotylédones, ces chitinases ne possèdent pas de domaine riche en cystéine, ce qui les empêche de se fixer sur les structures, elles sont sécrétées dans l'apoplaste (**shinshi H et al., 1990**).

➤ **Les chitinases de classe 3 :**

Ont été identifiées chez de nombreuses plantes et champignons (**Hamel et al., 1997**), comme les chitinases de classe 5, elles sont de glycosyle-hydrolases familles 18 (**henrissat B et al.,1993**), cette classe inclue les enzymes bifonctionnelles lysozyme/chitinases telles que celle de *hevea brasiliensis* (**jakel PA , 1991**).

➤ **Les chitinases de classe 4 :**

Ont été trouvées chez la plupart des plantes et sont extracellulaires 41-47% de leur séquence du domaine catalytique est identique avec celui de la classe 1, elle possédant une région riche en cystéine qui ressemble au domaine de fixation des chitinases de classe 1. Cependant les chitinases de classe 4 sont de petite taille puisque une partie des deux domaines qui les constituent a été supprimée (**colling DB, 1993**).

➤ **Les chitinases de classe 5 :**

Ont été identifiées principalement chez les bactéries, ce pendent une endochitinases a été isolée à partir des plantes de tabac, qui ressemble beaucoup aux chitinases de classe 5 (**Melchers et al., 1994**).

V. Classification des chitinases selon leurs origines

V.1. Les Chitinases des 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 et Chet, 1998; Patil et al., 2000**). En effet, les bactéries du genre *Streptomyces* produisent des enzymes chitinolytiques qui, en modifiant la composition des structures chitineuses, favorisent leur adhésion au substrat et la pénétration de leur hôte (**Charpentier et Percheron, 1983; Schrempf, 2001**) au niveau des lésions formées sur l'exosquelette des Arthropodes. 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**). 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; Saville et al., 2002**). Cette chitinase virale entraîne même 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 Vinetz, 1999**). Les chitinases produites par les procaryotes facilitent les processus de colonisation de leurs insectes hôtes qui leur servent de vecteurs.

V.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 et 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. Chez les levures, les chitinases sont impliquées dans le bourgeonnement des cellules filles et leur séparation d'avec les cellules mères (**Passonneau et Williams, 1953; Elango et al., 1982; Kuranda et Robbins, 1991**). 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**).

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 oeufs de nématodes (**Dackman et al., 1989**), mais aussi des champignons entomopathogènes des genres *Beauveria*, *Metarhizium* et *Verticillium* (**El-Sayed et al., 1989; St. Léger et al., 1991**).

V.3. Chitinases animales

Les chitinases ont été mises en évidence chez de nombreux animaux invertébrés et vertébrés, y compris chez les mammifères. De nombreuses chitinases sont impliquées dans des processus digestifs (**Suzuki et al., 2002**). Les chitinases salivaires de poulpe mais aussi les chitinases d'hyménoptères parasitoïdes et d'araignées facilitent la pénétration des cuticules de leurs hôtes ou proies (**Mommsen, 1980; Krishnan et al., 1994; Jones et al., 1996**). Dans le tractus alimentaire des poissons (**Flach et al., 1992**) des oiseaux (**Jackson et al., 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**). Citons encore le cas de chitinases sériques et leucocytaires chez l'homme, sécrétées en grande quantité par les monocytes lors de leur différenciation en macrophages (**Escott et Adams, 1995**) chez des patients atteints de la maladie de Gaucher (**Boot et al., 1995**). Enfin, chez les animaux, les chitinases pourraient également jouer un rôle défensif contre certains champignons pathogènes (**Leah et al., 1991; Boot et al., 1995; Gooday, 1999; Carlini et Grossi-de-Sa, 2002**).

V.4. Chitinases végétales

V.4.1. Chitinases végétales et développement

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 (**Wemmer et al., 1994; Takakura et al., 2000**), les graines (**van Hengel et al., 1998; Domon et al., 2000; Passarinho et al., 2001**), les fruits (**Peumans et al., 2002**) et les racines (**Passarinho et al., 2001; Showalter, 2001**).

La découverte de glycoprotéines extracellulaires nommées arabinogalactanes a permis de mettre en évidence l'intervention des chitinases végétales dans la croissance des végétaux. Présents dans les racines, les feuilles, les tiges, les organes floraux et les graines (**Fincher et al., 1983; Showalter, 2001**), les arabinogalactanes contiennent des unités *N*-acétylglucosamine et des sites de liaison aux chitinases (**Showalter, 2001**). Les chitinases végétales interviendraient notamment dans les évènements précoces de l'embryogenèse et la germination des graines (**De Jong et al., 1992; Jin-Zhuo et David, 1997; Krishnaveni et al., 1999; Helleboid et al., 2000; van Hengel et al., 2002**), libérant des oligosaccharides à partir d'arabinogalactanes présents dans les tissus embryonnaires (**Domon et al., 2000**).

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 et 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) (**Schmidt et al., 1993; Spaink 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 (**Stachelin et al., 1994; Goormachtig et al., 1998**). Enfin, les plantes carnivores produisent des chitinases qui aident à la digestion de leurs proies (**Gooday, 1990**).

V.4.2. Chitinases végétales et défense

Si les chitinases sont synthétisées de façon constitutive, leur présence dans les tissus végétaux a longtemps été justifiée par leurs interventions dans les mécanismes de défenses induits. La synthèse des chitinases végétales peut être induite en cas de stress biotique ou abiotique. Suite à l'attaque d'une plante par des phytophages ou des pathogènes, plusieurs phytohormones sont synthétisées, telles que l'éthylène (**Enyedi et al., 1992**), l'acide jasmonique (**Creelman et Mullet, 1997**) et l'acide salicylique (**Lee et al., 1995**) produites pour activer des cascades de signalisation susceptibles d'induire la synthèse de phénylpropanoïdes (**Hahlbrock et Scheel, 1988; Dixon et Paiva, 1995**), de phytoalexines (**Smith, 1996; Hammerschmidt, 1999**) et de "pathogenesis-related" protéines (PR-P), dont des chitinases (**Graham et Sticklen, 1994; Krishnaveni et al., 1999; Robert et al., 2002**).

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* (**Schlumbaum et al., 1986; Mauch et Stachelin, 1989; Sela-Burlage et al., 1993; Schickler et Chet, 1997; Taira et al., 2002**). Les activités chitinolytiques ont une double fonction dans la réponse aux champignons pathogènes. Lors de la pénétration des champignons phytopathogènes dans le végétal, les chitinases libèrent des oligosaccharides fongiques qui constituent des éliciteurs (**Collinge et al., 1993; De A. Gerhardt et al., 1997; Ito et al., 2005**), renforçant indirectement les défenses des plantes. Par la suite, les chitinases vacuolaires limitent la propagation des champignons dans le végétal (**Taira et al., 2002**). Les chitinases végétales et les PR-P sont également induites suite à l'attaque par un ravageur.

VI. Propriétés physico-chimiques des chitinases

VI.1. Le poids moléculaire :

Les chitinases trouvées chez nombreuses plantes et algues possèdent une masse moléculaire d'environ 30KDa. Des chitinases de 40 à 90 KDa et même d'environ 120 KDa ont été identifiées chez mollusques, les arthropodes et chez quelques vertébrés comme les poissons, les amphibiens et les mammifères. La masse moléculaire des chitinases isolées chez les bactéries et les champignons varient e 30 à 120 KDa (**Humphreys et Gooday, 1984 ; Koga et al., 1997**). quelques chitinases de plantes supérieures (carotte) (**De Jong et al., 1992**),d'insectes (**Koga et al., 1983**)et de ver à soie (**Koga et al.,1997**)sont des glycoprotéines.

VI.2. Le point isoélectrique (pHi) :

Les chitinases possèdent un pHi de 3.0 à10.0 chez les plantes supérieures et les algues. Chez les insectes, les crustacés, les mollusques et les poissons le pHi est de 4 .7 à 9.3 chez les microorganismes, de 3.5 à 8.8.

Toutefois, les chitinases acides et basiques sont présentes souvent dans le même organisme.

VI.3. Activité enzymatique

Les PH optimaux des chitinases sont de 4 à 9 chez les plantes supérieures et les algues de 4.8 à 7.5 chez les animaux et de 3.4 à 8.0 chez les microorganismes. Le PH optimal dépend du substrat utilisé (exemple de deux substrats différents : chitine glycol et 7V- acétyle chito-oligosaccarides) (**Koga et al., 1999**), ceci démontré que les chitinases de différents organismes sont actives dans les milieux acides et basiques.

VI.4. La stabilité

Les chitinases de plantes classe III et ceux de *Bacillus licheniformis* résistent à une température élevée de 80 C ° (**Koga, 1996 ; Takayangi et al., 1991**). D'autres chitinases identifiées chez des insectes et des vers de soie ne sont pas très stables au-dessus de 40 C ° car le développement de ces insectes s'effectue à 25 C ° (**Koga et al., 1997**).En général, les chitinases d'insectes ne sont pas stables à de très hautes températures, car ces espèces utilisent généralement leurs chitinases pour hydrolyser leur propre chitine cuticulaires pendant la phase de mue, alors que les chitinases de plantes sont utilisées principalement pour dégrader des organismes pathogènes.

VII. Propriétés basiques des chitinases bactériennes

A travers les années, plusieurs espèces bactériennes chitinolytiques ont été sélectionnées pour leur diverses application . (Ajit *et al.*, 2006 ; Akagi *et al.*, 2006 ; Clarke P.H. et Tracey M.V.,1956)

La taille des chitinases varie largement, elle est comprise entre 20 et 90 kDa selon leur origine. Entre 20 et 60 kDa pour les chitinases bactériennes et végétales, et entre 40 et 85 kDa pour celles des insectes. Les chitinases bactériennes sont actives dans un large intervalle de température et de PH. Par exemple, les endochitinses de *Streptomyces violaceusniger* (Shekharet *al.*, 2006). et la chitinase thermostade de *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (Tsujiibo *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 (Tsujiibo *et al.* , 1993). Alors que la chitinase isolée de *Stenotrophomonas maltophilia* C3 a un pH optimum compris entre 4,5 et 5,0 (Zhanget *al.*, 2001).

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

VIII. Inhibiteur et activateur des chitinases

Un inhibiteur compétitif a une structure similaire au substrat ou à l'état de transition. Les allosamidines et leurs dérivés inhibent les chitinases de ver de soie (Koga *et al.*, 1987), de crevette rose (Koga *et al.*, 1990),de microorganismes tels que Piromyces communis, Streptomyces sp (Wang *et al.*, 1993) et S. olivaceoviridis (Romaguera *et al.*, 1993),ils sont considérés comme les principaux inhibiteurs des chitinases d'insectes et leur structure est similaire à l'état de transition de l'hydrolyse de la chitine (Koga *et al.*, 1987). récemment, des allosamidines cristallisées ont été liés à des chitinases de plantes telles que la hevamine (Terwisscha *et al.*, 1995).

Toutefois, les allosamidines et leurs dérivés inhibent seulement les chitinases appartenant à la famille 18 et n'inhibent pas celles de la famille 19. Les chitinases sont de manière générale inhibées par Hg²⁺ et Ag⁺. En ce qui concerne le Cu²⁺, il existe deux possibilités, un premier groupe de chitinase est inhibé par Cu²⁺, alors que dans un deuxième groupe, l'activité chitinolytiques est plus élevée en présence de Cu²⁺. Ce dernier groupe a été trouvé chez les poissons (Kono *et al.*, 1990 ; Matsumiya *et M.*, Mochizuki,1995).

IX. La chitine, substrat de la chitinase

La chitine a été découverte en 1811 par le professeur français Henri Braconnot, elle est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature, après la cellulose, il est largement distribué chez les eucaryotes, incluant des organismes unicellulaires (levures, amibes, diatomées) et multicellulaires (champignons filamenteux, arthropodes, nématodes, mollusques) (**Ehrlich et al., 2007**), ce polysaccharide est également présent chez certaines éponges et algues marines (**Ehrlich et al., 2007**), chez *Saccharomyces cerevisiae*, la chitine compte seulement pour un faible pourcentage (1- 2 %) du poids de paroi cellulaire sèche (**Osmond et al., 1999**), tandis que chez les champignons filamenteux, la chitine peut représenter jusqu'à 60 % du contenu pariétal (**Herrera et al., 1999**), chez certains oomycètes, la chitine représente entre 0.7 et 3.4% des parois sèches (**Sietsma et al., 1975**), sa fonction principale est de contribuer à la rigidité des éléments structuraux des organismes (**Cohen, 1993**). Elle est synthétisée par la chitine synthétase et dégradée par deux chitinases différentes ; l'endochitinase et l'exochitinase (**Palli et Retnakaran, 1999**). La chitine insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants ordinaires (**Tsujibo et al., 1993**).

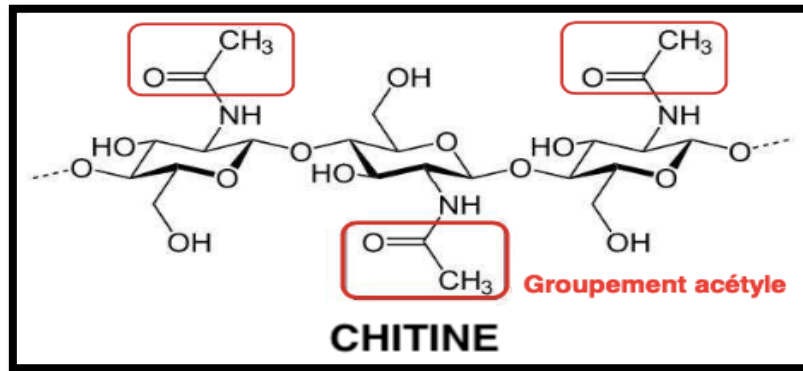


Figure 04 .Chaîne linéaire de chitine

La chitine $[(C_8H_{13}O_5N)_n]$ est un polysaccharide cristallin constitué de longues chaînes linéaires contenant plus de 1000 résidus de N-acétylglucosamine (GlcNAc, 2- acetamido-2 deoxy- D-glucose) liés par des liaisons β (1-4). 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. Environ 20-400 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 (**Herrera -estrella, et al., 1999**).

X. Domaine d'application de chitinase

Les chitinases jouent plusieurs rôles dans une multitude de systèmes biologiques différents (**Gooday, 1999**), les chitinases interviennent ainsi dans une grande variété de fonctions dans la nature incluant la morphogénèse, les défenses, la nutrition et la pathogénicité (**Sampson et al., 1998**), chez les plantes comme chez les animaux, les chitinases ont pour rôle principal, la défense de l'organisme contre les attaques des pathogènes, rôle qui peut être passif qu'actif (**Kasprzewska, 2003**). La course aux armements entre les pathogènes et les plantes implique une interaction étroite et évolutive entre l'hôte et le pathogène (**Bishop et al., 2000**).

L'une des applications les plus importantes des chitinases est la protection contre les champignons pathogènes. Comme la chitine est l'un des constituants majeur des parois fongiques, ainsi elles sont sensible aux différentes enzymes chitinolytiques. Aussi, les chitinases ont été identifiées comme des protéines responsables de pathogénicité, produites par les plantes << PR protéines >>. Certains organismes producteurs de chitinases sont utilisés en agriculture comme agent de lutte contre plusieurs champignons phytopathogènes (**Hoster et al., 2005 ; Ajit et al., 2006 ; Shekhar et al., 2006**). Il a été démontré que les activités inhibitrices de *Bacillus amyloliquefaciens* V656 sur la croissance fongique, accroît en même temps que la croissance cellulaire avec un maximum lorsque la croissance des cellules atteint un pic à 24h d'incubation (**Wang et al., 2002**).

Les chitinases bactériennes ont également un potentiel insecticide lorsqu'elles sont couplées avec d'autres protéines appropriées, telle que la protéine <<Cry>> (**Barboza –Corona et al., 1999 ; Ragev et al., 1996 ; Barboza et al., 2003**). Récemment, un grand nombre de gènes hétérologues de chitinases isolés à partir de différentes bactéries ont été clonés chez *Bacillus thuringiensis* dans l'intérêt d'augmenter l'activité insecticide des bactéries entomopathogènes. À cet égard, Lertcanawanichakul et al., ont cloné des gènes de chitinases provenant de *Aeromonas hydrophyla* et *Bacillus circulans* No.4.1 dans le plasmide pHY300PLK, st désignés comme pHYA2 et pHYB43 respectivement. Ces plasmides sont introduits dans différentes souches de *B. thuringiensis* par électroporation (**Lertcanawanichakul, 2004**).

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

Une autre application majeure des chitinases basée sur leurs propriétés de dissolution des parois cellulaires chitineuses, et l'accélération de la génération de protoplastes. Elle contribue

indirectement dans l'amélioration et le développement de nouvelles souches qui sont économiquement viable pour une utilisation industrielle. La chitinase exprimée par *Burkholderia gladioli* CHB101 a été rapportée pour son activité à former des protoplastes contre les mycéliums fongiques (**Shimosaka et al., 2001**). Les organismes producteurs de chitinases sont également utilisés dans le procédé de bioconversion pour traiter les déchets des crustacés et aussi pour obtenir des produits à valeur ajoutée à partir de ces derniers (**Carroad et Tom, 1978 ; Revah-Moiseev et Carroad, 1981 ; Keyhani et Roseman, 1999**).

Les fonctions de la chitinase chez les bactéries montrent également un rôle dans la nutrition par exemple : *Streptomyces griseus* HUT6037, qui possède une chitinase de la famille 19, présente une activité antifongique (**Itoh et al., 2002-2003**). Les chitinases bactériennes jouent de plus un rôle potentiel dans le parasitisme (**Dahiya et al., 2005**), comme chez la bactérie *Burkholderia gladioli* souche CHB101, des chitinases de chaque famille – famille 18 et famille 19 – sont présentes, mais les chitinases de la famille 19 semblent être la famille principale impliquée dans la dégradation de la chitine (**Shimosaka et al., 2001**).

Chez les insectes et les crustacés, les chitinases sont étroitement liées avec les mues et le besoin d'une dégradation partielle de l'ancienne cuticule. La présence des chitinases chez les vertébrés est ainsi principalement associée au système digestif, ces enzymes sont également associées à un rôle de défense contre les attaques pathogènes des champignons. De nombreux venins de vertébrés possèdent également pour composante de la chitinase (**Gooday, 1999 ; Dahiya et al., 2005**).

*Matériel et
méthodes*

MATERIEL ET METHODES

I. Objectif du travail

L'objectif de ce travail a été la mise en évidence de l'éventuelle activité chitinolytique de 30 souches de *Paenibacillus timonensis*, isolées du sol de la montagne de Djurdjura, Tizi Ouzou. La collection a été faite par le Docteur YAHIAOUI M.

II. Matériel biologique

II.1. Echantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé au niveau de la montagne de Djurdjura, située au sud de la wilaya de Tizi ousou (Algérie), à une altitude de 1400 m. les prélèvements consistent en une prise de terre sous neige. Trois prélèvements ont été réalisés (sites 1, 2 et 3).

Les prélèvements des trois sites ont été ensuite enchainés au laboratoire dans des tubes stériles. Une suspension de chaque échantillon a été préparée, en ajoutant 1g de l'échantillon à 10ml d'eau physiologique stérile.

Afin de détruire toutes les formes végétatives, les suspensions ont été incubées au bain mari à 80°C pendant 30 min.

Chaque échantillon a étéensemencé sur une gélose nutritive (3 boites chacun), puis incubés à 37°C pendant 24h.

Un réisolement de 60 colonies individualisées a été effectué sur milieu GN (site 1 : 8 souches, site 2 : 38 souches, site 3 : 14 souches).

II.2. Criblage de l'activité enzymatique extracellulaire

II.2.1. Activité Chitinase

L'ensemble des souches isolées ont été testées pour la production d'une Chitinase extracellulaire. Et ce, par l'ensemencement d'un spot de chaque souche sur une gélose nutritive additionnée de 1% de la chitine colloïdale.

La lecture des résultats a été effectuée après 72h d'incubation à 37°C par la mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse autour des colonies productrices d'une Chitinase extracellulaire.

II.2.2. Activité Amylase

L'ensemble des souches isolées ont été testées pour la production d'une Amylase extracellulaire. Et ce, par l'ensemencement d'un spot de chaque souche sur une gélose nutritive additionnée de 1% d'amidon soluble.

La révélation de la production d'une amylase se fait par l'ajout de l'Iode (lugole). La lecture des résultats a été effectuée après 72h d'incubation à 37°C, et ce, par la mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse autour des colonies productrices d'une Amylase extracellulaire.

II.2.3. Activité Protéase

L'ensemble des souches isolées ont été testées pour la production d'une Protéase extracellulaire. Et ce, par l'ensemencement d'un spot de chaque souche sur une gélose au lait.

La lecture des résultats a été effectuée après 72h d'incubation à 37°C par la mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse autour des colonies productrices d'une Protéase extracellulaire.

III. Mise en évidence de l'activité chitinolytique

La mise en évidence de l'activité chitinolytique consiste à ensemencer les souches par simple strie sur un milieu minimum gélosé additionné de chitine colloïdale [milieu CCA (g/L) : K_2HPO_4 , 0,7; KH_2PO_4 , 0,3; $MgSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01; $ZnSO_4$, 0,001; $MnCl_2$, 0,001; chitine colloïdale, 20; Agar, 20].

Après 3 jours d'incubation, la production de chitinase extracellulaire se traduit par l'apparition de zones claires autour des colonies.

Le diamètre des zones d'hydrolyse est mesuré pour chaque souche.

Afin de sélectionner les souches les plus performantes. La mise en évidence est d'abord réalisée sur un milieu CCA ajusté à trois différents pH (5, 7 et 9). Après incubation à 30°C pendant 3 jours, les souches présentant les plus grands diamètres d'hydrolyse sont retenues pour refaire le test aux mêmes conditions, mais avec une incubation à des températures différentes (20 à 50°C). Les souches qui montrent les plus grands diamètres d'hydrolyse, en fonction du pH et de la température sont sélectionnées pour la suite.

IV. Préparation de la chitine colloïdale

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

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

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

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

Une suspension de chaque souche sélectionnée est préparée à partir d'une culture sur milieu ISP₂. 10 mL d'eau physiologique sont versés aseptiquement sur la boîte et les spores sont raclées à l'aide d'une anse platine. Cette suspension est ensuite prélevée dans un tube à essai stérile et la DO₆₂₀ est ajustée à 0,1, ce qui correspond à une suspension de 10⁷ spores/mL.

Le milieu de culture préconisé pour la production de chitinase en milieu liquide, est le milieu CYS (g/L): [chitine colloïdale, 5,0; Extrait de levure, 0,5; K₂HPO₄, 2,0; MgSO₄.7H₂O, 1,0; et FeSO₄.7H₂O, 0,1 ; pH7].

VI. Effet des paramètres de culture sur la production de chitinase

VI.1. Effet du temps d'incubation

Afin de déterminer la période d'incubation optimale pour la production de chitinase, un Erlenmeyer de 250mL contenant 50mL de milieu CYS est inoculé par 1mL de suspension sporale, puis incubé dans un agitateur rotatif à 140 rpm à 30°C pendant environ dix jours. Chaque 24 heures, 2 mL de culture sont prélevés et centrifugés à 7000 rpm pendant 15 min, le surnageant est utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique, alors que le culot sert à évaluer la biomasse. Le milieu de production stérile, non inoculé est utilisé comme blanc pour le dosage de la chitinase.

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

VI.2. Effet du pH

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

VI.3. Effet de la température

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

VII. Dosage de l'activité chitinolytique

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

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

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

VIII. Mesure de la biomasse

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

IX. Extraction et purification partielle de l'enzyme

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

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

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

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

Milieux de culture

Milieu ISP₂

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

pH 7,3

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

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

pH 7,0

Milieu CCA (Colloidal Chitin Agar)

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

pH 7, 3

Milieu CYS (chitin Yeast extract Salt)

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

pH 7,0

Tampons et réactifs utilisés

Tampon acétate de sodium 0,02 M

Acétate de sodium.....1,64g
Acide acétique glacial.....1,14mL
Eau distillée.....1000mL

pH 5,0

Tampon acétate de Sodium 0,05 M

Acétate de sodium.....4,10g
Acide acétique glacial.....2,85mL
Eau distillée.....1000mL

pH 5,0

Tampon acétate de sodium 0,01 M

Acétate de sodium.....0,82g
Acide acétique glacial.....0,57mL
Eau distillée.....1000mL

pH 5,0

Réactif DNS (Miller *et al.*, 1956)

NaOH.....1g
Potassium Sodium Tartare.....18,2g
3,5-Dinitrosalicylic Acid.....1g
Phénol.....0,2g
Sodium sulfite.....0,05g
Eau distillée.....100mL

Résultats et Discussion

RESULTATS ET DISCUSSION

Suite aux perturbations dues à la crise sanitaire causée par la propagation de la pandémie de COVID-19 dans le monde, en particulier en Algérie, certaines manipulations ont été réalisées sur un petit nombre de souches et les résultats n'ont pas été enregistrés. Dans cette partie nous allons présenter que les résultats enregistrés pour l'ensemble des souches.

I. Criblage de l'activité enzymatique extracellulaire

L'ensemble des souches collectées ont été testées pour la production de trois enzymes : la chitinase, l'amylase et la protéase. Les résultats obtenus sont donnés dans le **tableau 2 et les figures 5, 6 et 7.**

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

L'hydrolyse de la chitine se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies. Après ensemencement des souches, sur un milieu minimum contenant la chitine comme seule source de carbone et d'énergie, et incubation de 3 jours à 30°C, nous avons observé la croissance de toutes les souches sur ce milieu (**Figure 8**).

À pH 5, aucune zone claire n'apparaît autour des colonies (**Figure 9**).

À pH 7, l'apparition d'un halo clair est détecté autour des colonies de 10 souches sur les 30 testées (**Figure 10**).

Alors qu'à un pH basique de 9, les zones claires apparaissent autour des colonies de 8 souches (**Figure 10**).

À ce pH, les plus grands diamètres mesurés sont ceux des souches S3 et S6. Ces deux souches ont été sélectionnées pour évaluer l'effet de la température sur la production enzymatique au pH optimum.

Les deux souches S3 et S6 sont ensemencées sur un milieu CCA, à pH 9 et incubées à 20, 30, 40 et 50°C. Les plus grands diamètres d'hydrolyse mesurés sont observés pour les deux souches à une température de 30°C (**Figure 11**). Aucune croissance des souches n'a été notée à des températures de 40° et 50°C (**Figure 12**).

Tableau 2 : Résultats de criblage de l'activité enzymatique extracellulaire

| Site 1 | | | | | | | | | | | | |
|---------|---------------------|----------------------|-----------------|------------------|---------------------|----------------------|-----------------|------------------|---------------------|----------------------|-----------------|------------------|
| Souches | Chitinase | | | | Amylase | | | | Protéase | | | |
| | Diamètre total (mm) | Diamètre colonie(mm) | Différence (mm) | Souches retenues | Diamètre total (mm) | Diamètre colonie(mm) | Différence (mm) | Souches retenues | Diamètre total (mm) | Diamètre colonie(mm) | Différence (mm) | Souches retenues |
| S1.1 | | | | + | | | | | | | | |
| S1.2 | | | | + | | | | | | | | |
| S1.3 | | | | + | | | | | | | | |
| S1.4 | | | | + | | | | | | | | |
| S1.8 | | | | | 35 | 24 | 11 | | | | | |
| Site 3 | | | | | | | | | | | | |
| S3.1 | | | | | | | | | 9 | 2 | 7 | + |
| S3.3 | | | | | 27 | 10 | 17 | + | 7 | 4 | 3 | |
| S3.7 | | | | | 24 | 11 | 13 | | | | | |
| S3.9 | | | | + | 24 | 9 | 15 | + | 9 | 2 | 7 | + |
| S3.10 | | | | + | | | | | | | | |
| S3.11 | | | | + | | | | | 11 | 4 | 7 | + |
| S3.12 | | | | + | | | | | | | | |
| S3.13 | | | | + | | | | | | | | |
| S3.14 | | | | + | | | | | | | | |

Tableau 2 : Résultats de criblage de l'activité enzymatique extracellulaire (suite)

| Souches | Site 2 | | | | | | | | | | | |
|---------|---------------------|----------------------|-----------------|------------------|---------------------|----------------------|-----------------|------------------|---------------------|----------------------|-----------------|------------------|
| | Chitinase | | | | Amylase | | | | Protéase | | | |
| | Diamètre total (mm) | Diamètre colonie(mm) | Différence (mm) | Souches retenues | Diamètre total (mm) | Diamètre colonie(mm) | Différence (mm) | Souches retenues | Diamètre total (mm) | Diamètre colonie(mm) | Différence (mm) | Souches retenues |
| S2.1 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.2 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.3 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.4 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.5 | | | | | | | | | 19 | 10 | 9 | + |
| S2.6 | | | | | 31 | 11 | 20 | + | | | | |
| S2.8 | | | | | | | | | 16 | 8 | 8 | |
| S2.9 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.10 | | | | + | | | | | 21 | 12 | 9 | + |
| S2.11 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.12 | | | | + | | | | | 19 | 10 | 9 | + |
| S2.13 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.14 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.15 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.16 | | | | + | | | | | 20 | 10 | 10 | + |
| S2.17 | | | | | 18 | 13 | 5 | | | | | |
| S2.21 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.22 | | | | + | | | | | 23 | 10 | 13 | + |
| S2.23 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.24 | | | | + | 25 | 10 | 15 | + | 11 | 4 | 7 | |
| S2.25 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.26 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.27 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.28 | | | | + | | | | | | | | |
| S2.34 | | | | | 11 | 5 | 7 | | | | | |
| S2.35 | | | | | 31 | 15 | 16 | + | 31 | 20 | 11 | A purifier |
| S2.36 | | | | | 20 | 12 | 8 | | 13 | 8 | 5 | |

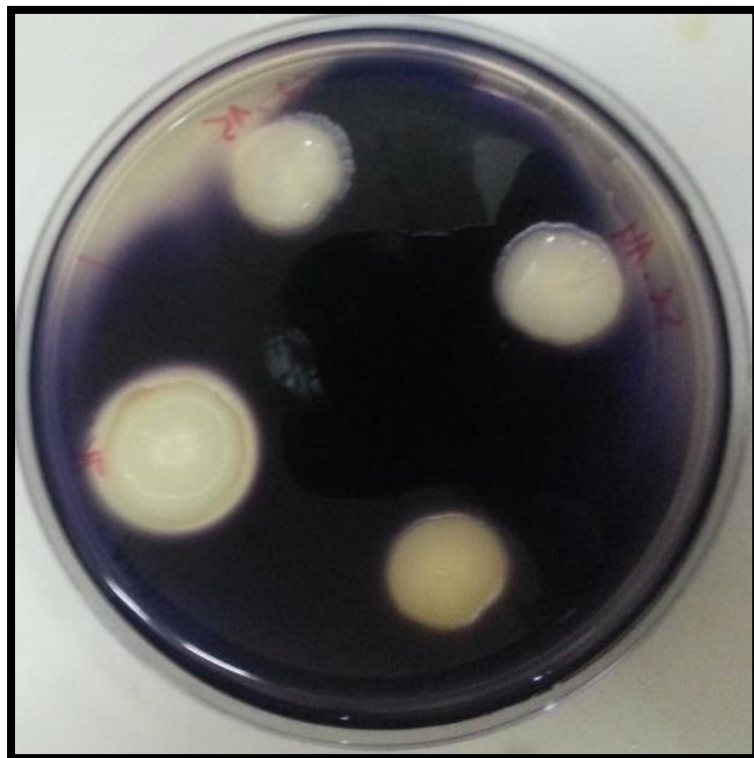


Figure 5 : Production d'une amylase par les souches de *Paenibacillus timonencis*

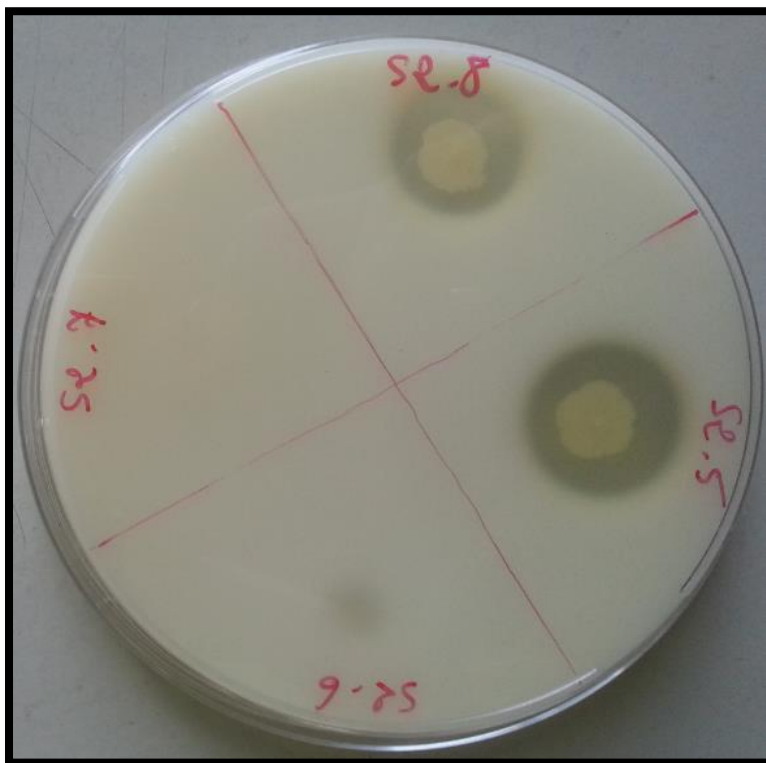


Figure 6 : Production d'une protéase par les souches de *Paenibacillus timonencis*



Figure 7: Production d'une chitinase par les souches de *Paenibacillus timonensis*

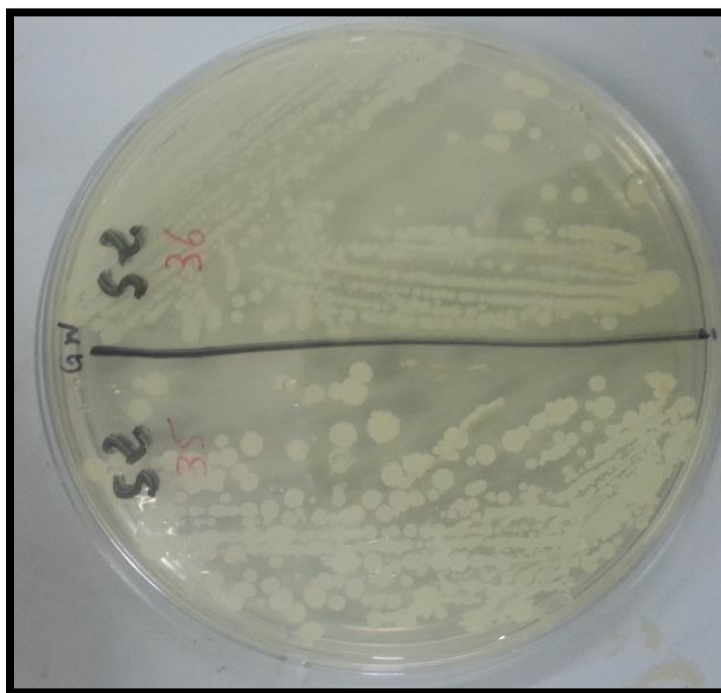


Figure 8: Croissance des souches de *P. timonensis* sur le milieu contenant la chitine

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

| | | SOUCHES | | | | | | | |
|----------------|----|---------|----|----|-----|-----|----|----|----|
| | | S1 | S2 | S4 | S6 | S3 | S5 | S7 | S8 |
| pH | 5 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 7 | - | - | ++ | ++ | ++ | ++ | + | - |
| | 9 | ++ | + | ++ | +++ | +++ | + | - | - |
| Température °C | 20 | / | / | / | + | - | / | / | / |
| | 30 | / | / | / | +++ | +++ | / | / | / |
| | 40 | / | / | / | abs | abs | / | / | / |
| | 50 | / | / | / | abs | abs | / | / | / |

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

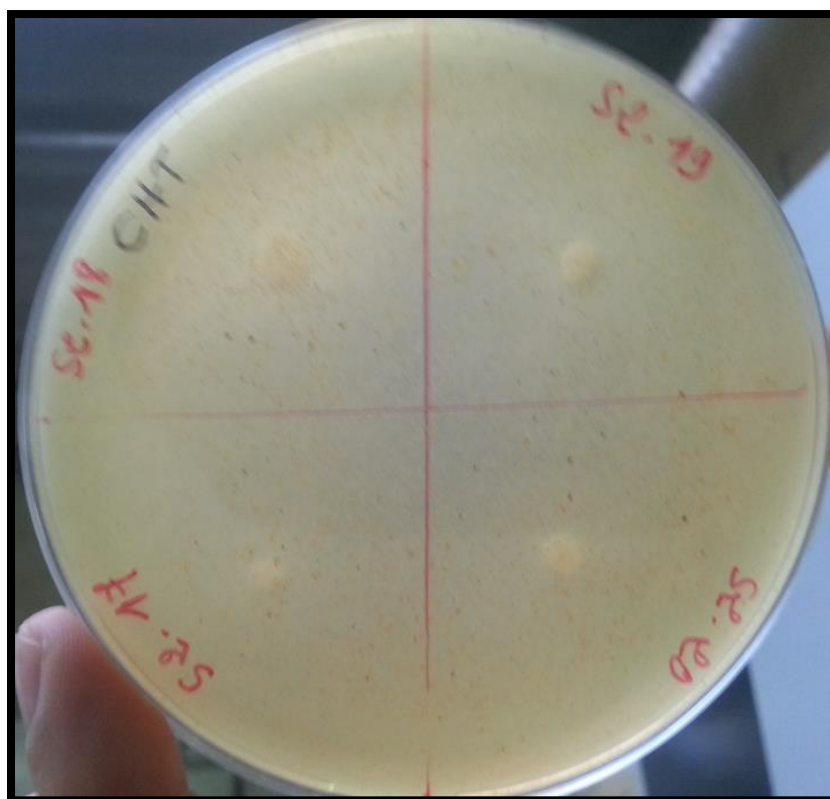


Figure 9: Absence de la production de chitinase par les souches de *P. timonensis* à PH 5.

Les souches S3 et S6 présentent de manière qualitative le meilleur rendement de production de chitinases sur milieu solide.



Figure 10: Forte production de chitinase par les souches de *P. timonensis* à PH 7 et PH 9.

III. Détermination des optimums de pH et de température

L'influence du pH et de la température sur la production des chitinases par la souche S6 après une fermentation de 3 jours, à 30°C sous agitation continue, est représentée dans la **figure 10**.

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

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

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

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

Pour la souche *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520, le pH optimal pour l'activité chitinolytique est compris entre 8,0 et 10,0, ce résultat est comparable à celui obtenu pour la souche S6 qui montre un optimum de production a un pH 9.



Figure 11 : Forte production de chitinase à une température de 30°C

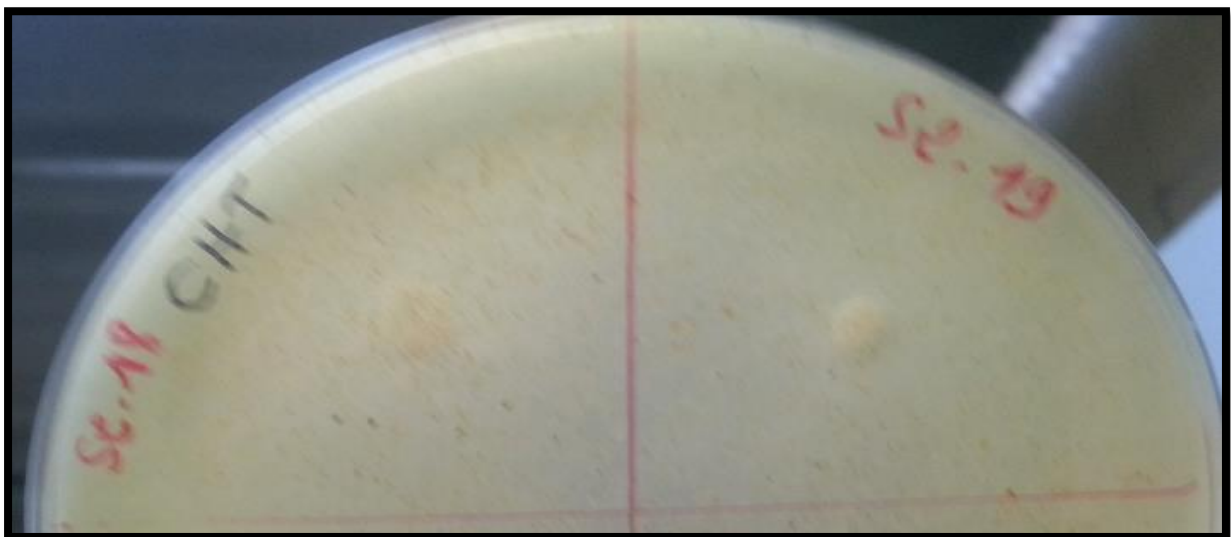


Figure 1 : Absence de production de chitinase à une température de 50°C

Conclusion

CONCLUSION

Au dépit des conditions sanitaires qui régies dans le monde dû à la propagation de la pandémie de COVI-19, en particulier en Algérie, certaines manipulations n'ont pas été accomplies dans la partie pratique de ce travail.

Ce travail a visé de sélectionner la souche de *Paenibacillus timonencis* qui montre la meilleure activité chitinolytique parmi les toutes les souches testées, provenant du sol de la montagne de Djurdjura à Tizi Ouzou.

L'optimisation des conditions de cultures des souches S3 et S6 pour la production de chitinases nous a permis de trouver que les diamètres des zones d'inhibition qui correspondent à une forte activité chitinolytique sont obtenus après 3 jours d'incubation.

Le pH et la température influent sur la production enzymatique des souches S3 et S6. Cette étude a permis de déterminer une production maximale à un pH 9, et à une température de 30°C.

Afin d'extraire l'enzyme extracellulaire, une fermentation dans les conditions optimales a été réalisée. Vu la forte production de chitinase observée chez les souches S3 et S6, Cette chitinase extracellulaire, présente un intérêt important pour poursuivre les recherches sur cette enzyme, une purification et un séquençage sont nécessaire pour une meilleure caractérisation. Nous envisageons de poursuivre ce travail par la purification de l'enzyme, ainsi de déterminer son effet directe sur des substrats naturels.

Références

bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Ajit N.S., Verma R. et Shanmugam V. (2006).** Extracellular chitinases of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* sp. *dianthi* causing carnation wilt. *Curr. Microbiol.* **52** :310-316.
- **Akagi k., Watanabe J., Hara M., Kezuka Y., Chikaishi E., Yamaguchi T., et al., (2006).** Identification of the substrate interaction region of the chitin binding domain of *Streptomyces griseus* Chitinase C.J *Biochim.* **139**:483-493.
- **Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS et VanLoon LC (1980)** Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J Gen Virol* **47**: 79.
- **Boot RG, Renkema GH, Strijland A, van Zonneveld AJ et Aerts JM (1995)** Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem* **270**: 26252-26256.
- **Carlini CR et Grossi-de-Sa MF (2002)** Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* **40**: 1515-1539.
- **Carroad P.A. et Crawford D.L. (1997).** Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microbial. Tech.* **20** :489-493.
- **Creelman RA et Mullet JE (1997)** Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Phys* **48**: 355-381
- **Clarke P.H. et Tracey M.V. (1956).** the occurrence of chitinase in some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **14**:188- 196.
- **Colling DB, Kargh, KM, Mike Isen JD, Nielsen KK, Rasmussen vadK** plant chitinase plant (1993) *J3*:31-40.
- **Cupta, V, K, A, KMisra, P, K Gaur P, K jain D Gaur and S Sharma,** content stress. Offusarium wilt disease of gwava (*psidium guajaval*) in india biotechnology (2010) **9**: 176-195.
- **Dackman C, Chet I et Nordbring-Hertz B (1989)** Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: infection and enzymatic activity. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 201-208.

- **De A.** Gerhardt LB, Sachetto-Martins G, Contarini MG, Sandroni M, De P. Ferreira R, De Lima VM, Cordeiro MC, De Oliveira DE et Margis-Pinheiro M (1997) *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. *FEBS Letters* **419**: 69-75.
- **De Jong, AJ.**, Cordewener, J., LO Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerckhove, J., Van Kammen, A., De Vries, (1992). SC: A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*. 4: 425 – 433
- **Ehrlich H, K monfred H Thomas S paul and K,**(2007). christiane et al first evidence of chitin in skeletons of marine sponges part 2 glass sponge J, EXP zool, B MOL devevol .308, 473-483.
- **Fincher GB,** Stone BA et Clarke AE (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. *Annu Rev Plant Phys* **34**: 47-70.
- **Flach J,** Pilet P et Jolles P (1992) What's new in chitinase research? *Experientia* **48**: 701-715.
- **Graham LS** et Sticklen MB (1994) Plant chitinases. *Can J Bot* **72**: 1057-1083.
- **Gooday GW** (1990) Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation* **1**: 177-190.
- **Gooday GW,** Zhu WY et O'Donnell RW (1992) What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiol Lett* **100**: 387-392.
- **Gooday GW** (1999) Agressive and defensive roles for chitinases In: Muzzarelli RAA et Jolles P, *Chitin and Chitinases*, Berlin.
- **Gooday, G.W.,** Aggressive and defensive roles for chitinases, in *Chitin and chitinases*, P.J.a.R.A.A. Muzzarelli, Editor., Birkhäuser Verlag Basel (Switzerland). (1999) p. 157-169.
- **Huber M,** Cabib E et Miller LH (1991) Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2807-2810.
- **Helleboid S,** Hendriks T, Bauw G, Inze D, Vasseur J et Hilbert J-L (2000) Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. *J Exp Bot* **51**: 1189-1200.
- **Hamel, F.,** et al., Structural and evolutionary relationships among chitinases of Flowering plants. *Journal of Molecular Evolution*, (1997).**44**(6): p. 614-624.

- **Henrissat B et Davies GJ (2000)** Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol* **124**: 1515-1519.
- **Henrissat B (1999)** Classification of chitinases modules In: Jolles P et Muzzarelli RAA, *Chitin and chitinases* Birkhauser Verlag, Basel.
- **Hamel, F., et al.,** Structural and evolutionary relationships among chitinases of Flowering plants. *Journal of Molecular Evolution*, (1997).44(6): p. 614-624.
- **Henrissat, B. and A. Bairoch,** New Families in the Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-Sequence Similarities. *Biochemical Journal*, (1993).293: p. 781-788.
- **Iverson K., Bromel M., Anderson A.W. et Freeman T. (1984).** Bacterial symbionts in the sugar beet root maggot *Tetanops myopaeformis* (von Roder). *Appl. Environ. Microbiol.* 47 :22-27.
- **Jackson S, Place AR et Seiderer LJ (1992)** Chitin digestion and assimilation by seabirds. *The Auk* **109**: 758-770.
- **Jekel PA Hartmann JBH beintema JJ ,** the primary structure of hevamine an enzyme with Lysosymes / chitinases activity from *hovea brasiliensis* latex eur *J biochem* (1991) 200:123-130.
- **Krishnaveni S, Mutukrishnan S, Liang GH, Wilde G et Manickam A (1999)** Induction of chitinases and β -1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. *Plant Sci* **144**: 9-16. 9-16.
- **Krishnan A, Nair PN et 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.
- **Koga, D., Mizuki, K, Ide, A., Kono, M., Mstui, T., Shimizu, (1990).** C: Kinetics of a chitinase from a prawn, *Penaeus japonicus*. *Agric Biol Chem.* 54 :2505 - 2512.
- **Koga, D., Isogai, A., Sakuda, S., Matsumoto, S., Suzuki, A., Kimura, S., Ide, (1987)** .A: Spécifié inhibition of *Bombyx mori* chitinase by allosamidin. *Agric Biol Chem.* 51: 471 - 476.
- **Lysenko O. (1976).** Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity in insects *J. Invert. Pathol.* 27 :385-386.

- **Merzendorfer H and L** , (2003) .zimochochitin metabolism in insects structure, fuction, and regulation of chitin synthase and chitinases J,EXP biol.206:4393-4412.
- **Muzzarelli R.A.A.**, (1977) .*Chitin* Pergamon Press, Oxford.
- **Mommsen T.P.**, (1980). Chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase from the digestive fluid of the spider, *Cupiennius salei*. *Biochim Biophys Acta* 612: 361-372.
- **Neuhaus J.M** ,(1999). Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11) In: Datta SK et Muthukrishnan S, *Pathogenesis-Related proteins in plants* CRC Press, Boca Raton.
- **Neuhaus J.M.**, Sticher L., Meins F., J.r. et Boller T., (1991) .A Short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 10362-10366 .
- **Noishiki, Y.**, Nishiyama, Y., Wada, M. and Kuga, S., (2005). Complexation of α chitin with aliphatic amines. *Bio macro molecules* .4, 2362-2364.

Ohno N et Morisson D.C., (1989) .Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. *J Biol Chem* 264: 4434-4441.

- **Osmond, B.C.**, Specht, C.A., and Robbins, P.W.,(1999). Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6.
- **Patil R.S.**, Ghormade V. et Deshpande M.V., (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enz Microbial Techn* 26: 473-483.
- **Passarinho PA**, Van Hengel AJ, Fransz PF et de Vries SC., (2001). Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* *AtEP3/AtchitIV* endochitinase gene. *Planta* 212: 556-567.
- **Peumans WJ**, Proost P, Swennen RL et Van Damme EJM ,(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.
- **PerrakiA**, Wilson , KS chet J oppenheim A,B and vorgiase C,E., (1993).phylogenetic relationships of chitinase in chitin enzymology, edited by Muzzarelli R AA ancona: european chitin society .217-232.

- Sela-Buurlage MB, Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Melchers LS, van den Elzen PJM et Cornelissen BJC., (1993). Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and [beta]-1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol* .101: 857-863.
- Spaink HP, Wifjes AHM, van Vliet TB, Kijne JW et Lugtenberg BJJ .,(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: 380-392.
- Staehelin C, Granado J, Muller J, Wiemken A, Mellor RB, Felix G, Regenass M, Broughton WJ et Boller T., (1994). Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 2196-2200.
- Shekhar N. ,Bhattacharya D.,Kumar D.et Gupta R.K.,(2006). Biocontrol of wood rotting fungi using *Streptomyces violaceusniger* XL-2. *Can.J.Microbiol.*52 :805-808.
- Shinshi H Neuhaus J-M ryals, (meins F1990). structure of tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequence encoding a cysteine-rich domain *plant mol boil* 14:357-368.
- Shimosaka M., Fukumori Y.,Narita T.,Zhang X.Y. , Kodaira R.,Nogawa M. et Okazaki M.(2001).The bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101 produces two different kinds of chitinases belonging to families 18 and 19 of the glycosyl hydrolases .*J.Biosci .Bioeng* .91 :103-105.
- Sietsma, J.H., Child, J.J., Nesbitt, L.R. and Haskins, R.H. ,(1975). Chemistry and ultra structure of the hyphal wall of *Pythium aanticum*. *J. Gen. Microbiol.* 286, 299.
- St. Léger RJ, Cooper RM et Charnley AK., (1991). Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol.* 58: 415-426.
- Smith CJ .,(1996) .Accumulation of phytoalexins: defence stimulus response system. *New Phytologist* .132: 1-45.
- Takayangi, T., Ajisaka, K., Takiguchi, Y., Shimahara, K., (1991). Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *BiochimBiophysActa.* 1078: 404 – 410.

Résumé

Ce travail a été mené sur une bactérie appartenant à la famille des Paenibacillus « Paenibacillus timonensis » à la recherche d'un pouvoir chitinolytique, caractère enzymatique pouvant être exploité dans la lutte. L'induction de production de chitinase est faite sur milieu de culture à base de chitine colloïdale comme substrat enzymatique et comme seule source de carbone pour la croissance bactérienne. Le protocole expérimental se résume dans les principales étapes qui sont : mise en évidence du pouvoir chitinolytique sur milieu de culture gélosé à base de chitine colloïdale, optimisation des paramètres de culture à savoir les effets du pH, de la température, de la concentration en substrat.

Les résultats ont été les suivant :

Les valeurs des paramètres optimisés sont : pH 9, une température de croissance à 30°C, un temps d'incubation d'au moins 72h.

En conclusion et à la lumière des résultats obtenus, les conditions optimale de culture bactérienne et de production enzymatique sont connu. Il reste à exploité cette productivité à l'échelle industrielle et d'essai à grande échelle par la formulation d'un produit pouvant être utilisé.

Les mots clés :

Paenibacillus, Chitinase, chitine colloïdale, pouvoir chitinolytique.

Abstract

Paenibacillus This work was undertaken on a bacterium belonging to the family of "Paenibacillus timonensis" in the search of a capacity chitinolytic, enzymatic character being able to be exploited in the fight. The induction of production of chitinase is made on culture medium containing colloidal chitin like enzymatic substrate and only source of carbon for the bacterial growth. The experimental protocol is summarized in the main steps which are: chitinolytic description of the capacity on culture medium gélosé containing colloidal chitin, optimization of the parameters of culture to knowing the effects of the pH, the temperature, the concentration in substrate.

The results were as follows:

The values of the optimized parameters are: pH 9, a temperature of growth with 30°C, a time of incubation of at least 72h.

optimal of In conclusion and in the light of the results obtained, the conditions bacterial culture and enzymatic production are known. There remains with exploited this productivity on an industrial scale and of large-scale test by the formulation of a product which can be used.

Key words:

Paenibacillus, Chitinase, colloidal chitin, capacity chitinolytic

الملخص

هذا العمل اجري على بكتيريا تنتسب الى عائلة *Paenibacillus timonensis* « *Paenibacillus* في البحث عن القدرة chitinolytic, الخاصة الأنزيمية التي يمكن ان استغلّت في الكفاح . الحث على إنتاج chitinase على وسط مغذي يحتوي على chitine غروي كطبقة أنزيمية وكمصدر وحيد للكربون لنموّ البكتيريا. البروتوكول التجريبي لخص في مراحل أساسية وهي تسليط الضوء على القدرة chitinolytic على وسط مغذي هلامي ذو قاعدة كيتينية غروية التحسين من عوامل التغذية التي تعرف التأثيرات من الحموضة , درجة الحرارة , تركيز المادة.

وكانت النتائج كالتالي:

قيم العوامل المتحصل عليها هي تركيز chitine pH=9 , درجة الحرارة 30 °C , وقت الحضانة على الأقل 72 ساعة.

كخاتمة وعلى ضوء النتائج المتحصل عليها , الشروط المثلى للزراعة البكتيرية والإنتاج chitinolytic معروفين. وتبقى استغلال هذه الإنتاجية على المقياس الصناعي و الإختبار على مقياس أكبر عن طريق صياغة المنتج المستعمل..

الكلمات المفتاحية:

Paenibacillus, كيتيناز, كيتين غروي, القدرة الكيتينية.