

N° :

Mémoire de Fin d'Etudes

Présenté par :

- ✓ AISSAOUI Mohamed amine.
- ✓ LEFOUILI Messaoud.

En vue de l'obtention du diplôme :

Ingénieur d'état en Biotechnologie

THEME

**Mise en évidence et optimisation de l'activité
chitinolytique chez *Micromonospora echinospora*
C33**

Encadré par : Gasmi M. MAB ENSB

**Co-encadré
par : Berkani M. MCB ENSB**

Soutenu le : 15/09/ 2019 ; devant le jury composé de :

Mr MEROUANE Fateh MCB ENSB Président

Mr. ZERROUKI Souhaib MCB ENSB Examineur

Année universitaire : 2018/2019

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous tenons à remercier le bon Dieu de nous avoir donnés la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer toutes notre reconnaissance et gratitude à notre encadrante, Dr. Gasmi M. Ce fut un honneur d'être l'un de ses premiers étudiants à être encadré par elle. Nous apprécions toutes ses contributions de temps et d'idées pour faire de notre mémoire une expérience productive et stimulante.

Nous sommes extrêmement redevables à notre co-encadrant, Dr. Berkani M. Il nous a fait profiter de sa propre expérience en statistique. Sans aucun doute, sa contribution à l'analyse statistique doit être reconnue.

Nos remerciements s'adressent aussi aux membres du jury Mr MEROUANE Fateh et Mr. ZERROUKI Souhaib d'avoir accepté d'évaluer notre travail. Nous vous remercions tous de nous avoir fait l'honneur d'assister à notre soutenance.

Nous sommes énormément remerciant au Dr. Merouane F. qui nous a présenté, guidé et enseigné la plupart des choses que nous savons sur la microbiologie. Tout au long de nos années universitaires, il nous a montré les bases de la façon de faire des expériences et d'interpréter et de discuter les résultats. Bien qu'il ait souvent été très occupé par des tâches scientifiques, sa porte était toujours ouverte pour nous conseiller dans le cadre de notre projet de fin d'études. Il est extrêmement difficile de traduire en mots notre gratitude envers lui.

Nous tenons à remercier sincèrement toutes les personnes qui travaillent à l'école nationale supérieure de biotechnologie, en particulier les ingénieurs de laboratoire. Nous nous sommes toujours sentis les bienvenus pour demander toute l'aide et le soutien dont nous avons besoin. C'est ainsi que nous voudrions exprimer nos salutations particulières à Mme SAKHRI ; Mr. BOUCHAALA Antar ; Ahlam, et Melle DERRI Nesrine.

Enfin, nous profitons de l'occasion pour exprimer notre sincère gratitude aux professeurs de l'école nationale supérieure de biotechnologie sans leur apport, les résultats présentés dans ce mémoire n'auraient pu être atteints.

Dédicace

There are a number of people without whom this thesis might not have been written, and to whom I am greatly indebted

I dedicate this job:

To my parents, My mother, who has always been a source of encouragement and inspiration to me throughout my life, she has all along put effort to help me through my education from learning to write the first letters going to chemistry unit at the university. My father who has always supported me with the best he can and whom I consider my example in life. Words could never be enough to express my gratitude towards you both.

To my beloved brothers and sisters: Imed, Afaf, Amal, Mouna, Sarah, Ikram, and Nasrine. I am truly grateful for having you in my life, to my brother's wife: Marwa Your entry into our lives was a blessing.

To My dearest nephews: Abdelwahabe, and Farid, whom I can't force myself to stop loving, to my niece Meriam.

To the memory of my grandmother Aicha, who has been a second mom to me, her love and memory will never fade away. I will always remember her last advice to me to always keep pursuing my education.

To the memory of my grandfather Tahar.

To all my family.

To my best, most constant friends Raouf, Mokhtar, Amine, Walide, and Soheib. They provided me a lot of support and encouragement over the years.

To my university friends: Bilal, Abdelaziz, Abdelmadjide, Haidar, Akram, Ramzi, Abdeljalil, Nassim and soheib. It has been a great privilege to pass all these years with you, in both the bad and good moments.

To my lab colleagues. Their presence has lightened the hard job.

Messaoud.

Dédicace

À MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A MES CHERS ET ADORABLE FRÈRES ET SOEURS

Asma, Azeddine, Cherifa, Abdelsamed, Sid Ali, Abir.

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

À MES CHERS PETITS NEVEUX ET NIECES

Imad, Iyad, et la petite princesse Nada

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour Vous, Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.

Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser À votre tour vos vœux les plus chers.

A MA GRAND MERE et GRAND-PERE

Qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur.

A LA MEMOIRE DE Mon GRAND-PERE ET MA GRANDE MERE

J'aurais tant aimé que vous soyez présents.

Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.

À MES CHERS ONCLES, TANTES, LEURS EPOUX ET EPOUSES

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et Mon affection la plus sincère.

À MES AMIS DE TOUJOURS : mon chère binôme Messaoud, Abdelaziz, Bilel, Abdelmadjid, haidar, Akram, Ramzi, soheib, djalil, Mouad, Omar, et tous mes amis de groupe de scout 'Elfoudhil elouartilani' de kadiria.

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments Agréables que nous avons passés ensemble.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus Profond et mon affection la plus sincère.

À TOUTES LES PERSONNES QUI ONT M'AIDAI DANS TOUT MA CARRIERE

Je cite surtout Mr. ASSAM Kamel.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond.

MOHAMED AMINE.

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Introduction 1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : la chitine

1. Définition et structure 3

2. Sources 4

3. Applications 5

4. Biodégradation de la chitine 6

Chapitre 2 : les chitinases

1. Généralités 8

2. Classification des enzymes chitinolytiques 8

3. Structure et mode d'action 9

4. Rôle des chitinases 11

5. Applications des chitinases. 12

5.1. Production de protéines unicellulaires 12

5.2. Isolement de protoplastes. 12

5.3. Production de chitooligosaccharides, de glucosamine et de GlcNAc. 12

5.4. Application médicale 13

5.5. Outil d'étude scientifique 13

5.6. Gestion des déchets 13

5.7. Chitinase en tant que cible pour les biopesticides 14

5.8. Lutte contre les champignons phytopathogènes 14

Chapitre 3 : Microorganismes producteurs de chitinase

1. Chitinases et microorganismes 16

2. Actinobactéries, producteurs de chitinases 17

3. Le genre *Micromonospora* 19

3.1. Morphologie 19

3.2. Écologie 20

3.3. Cycle de vie 20

3.4. Métabolisme secondaire 21

3.5. Production de chitinase par *Micromonospora* 21

Chapitre 4 : Propriétés des chitinases microbiennes

1. Généralité	22
2. Propriétés physicochimiques	22
2.1. pH Optimum	22
2.2. Température optimal.....	23
3. Inhibiteurs et activateurs des chitinases :.....	23
4. Spécificité du Substrat.....	25

Chapitre 5 : Méthodes d'optimisations

1. Méthodes classiques d'optimisation des milieux.....	26
2. Méthodes d'optimisation statistique	28
2.1. Plan d'expériences.....	28
2.1.1. Plan de Plackett-Burman (PBD).....	28
2.1.2. Plan de Box Behnken	29
3. Techniques d'optimisation.....	30
Méthodologie de surface de réponse (Response surface methodology (RSM)).....	30

Partie expérimentale

1. Préparation de chitine colloïdale.....	32
2. Préparation de l'inoculum	32
3. Mise en évidence de l'activité chitinolytique	32
4. Optimisation de la production de la chitinase par la méthode des plans d'expériences	33
4.1. Conditions de fermentation.....	33
4.2. Procédure d'optimisation.....	34
4.2.1. Plan de Plackett-Burman	34
4.2.2. Plan Box-Behnken	36
4.3. Cinétique de production de chitinase	37
5. Purification partielle de la chitinase	37
5.1. Préparation de l'extrait brut	38
5.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium	38
5.3. Dialyse	38
5.4. Chromatographie d'affinité.....	38
6. Caractérisation partielle de la chitinase purifiée.....	39
6.1. Effet du pH.....	39
6.2. Effet de la température.....	39

7. Méthodes analytiques	39
7.1. Mesure de l'activité de chitinase.....	39
7.2. Dosage des protéines.....	40
7.3. Mesure de la biomasse	40
Résultats et discussion	
1. Optimisation d'un milieu de culture pour la production des chitinases	41
1.1. Criblage des facteurs influençant la production de chitinase <i>Micromonospora echinospora</i> C33	41
1.2. Plan de Box-Behnken :	47
1.2.1. Analyses de la variance	49
1.2.2. Tracés des surfaces de réponse	51
2. Etude des cinétiques de croissance et de production de la chitinase <i>Micromonospora echinospora</i> C33.....	54
3. Purification de la chitinase.....	55
4. Caractérisation partielle de l'enzyme purifiée.....	56
4.1. Effet du pH sur la chitinase de <i>Micromonospora echinospora</i> C33	56
4.2. Effet de la température sur la chitinase de <i>Micromonospora echinospora</i> C33.....	57
Conclusion.....	59
Références.....	61
Annexes	

Liste des figures

Figure 1. Structure de chitine.	3
Figure 2. Schéma simplifié des trois formes cristallines de la chitine.	4
Figure 3. Processus impliqués dans la biodégradation de la chitine.	7
Figure 4. Structures de chitine, chitosane et produits de dégradation avec enzymes et réactions spécifiques	9
Figure 5. Structure tridimensionnelle d'enzymes GH représentatives.	10
Figure 6. Mécanisme d'hydrolyse de la chitine à simple et à double déplacement.	11
Figure 7. aspect macroscopique de la souche <i>micromonospora echinospora</i> c33.....	19
Figure 8. Diagrammes de Pareto des principaux effets obtenus à partir du plan de Plackett-Burman.	43
Figure 9. Les principaux diagrammes d'effets pour le système.	47
Figure 10. Courbe iso-réponse de l'interaction significative.	51
Figure 11. Surface de réponse de l'activité enzymatique(y) vs peptone : galactose	53
Figure 12. Cinétique de croissance et de production de la chitinase par <i>Micromonospora echinospora</i> C33.	54
Figure 13. Effet du pH sur l'activité de la chitinase de <i>Micromonospora echinospora</i> C33. .	57
Figure 14. Effet de la température sur l'activité de la chitinase de <i>Micromonospora echinospora</i> C33.	58

Liste des tableaux

Tableau 1. Pourcentages des teneurs en chitine par espèces.....	4
Tableau 2. Quelques applications de la chitine.	5
Tableau 3. Caractéristiques des enzymes chitinolytiques appartenant à différentes familles de GH.	11
Tableau 4. Effet antagoniste de quelques chitinases bactériennes.	15
Tableau 5. Origines des Chitinases.	17
Tableau 6. Caractéristiques différentielles du genre <i>micromonospora</i>	20
Tableau 7. Caractéristiques de quelques chitinases microbiennes.....	24
Tableau 8. Méthodes classiques d'optimisation.	27
Tableau 9. La matrice de Plackett-Burman pour l'étude de 11 variables avec 16 expériences.	34
Tableau 10. Les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett-Burman. ..	35
Tableau 11. Plan d'expérience BOX-Behnken utilisé pour l'étude des facteurs.	36
Tableau 12. Les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Box-Behnken.	37
Tableau 13. La matrice de Plackett-Burman pour l'étude de 11 variables avec 16 expériences.	42
Tableau 14. Analyse de la variance pour la production des chitinases par <i>Micromonospora echinospora</i> C33.	44
Tableau 15. Matrice du plan de Box-Behnken à trois facteurs (valeurs codées), avec les valeurs de réponses (activités chitinolytiques) observées et prédites.	48
Tableau 16. Analyse de la variance pour la production des chitinases par <i>Micromonospora echinospora</i> C33.	50
Tableau 17. L'activité enzymatique pour les différentes concentrations de galactose et de peptone.	52
Tableau 18. Les valeurs optimales codées et réelles des facteurs significatives.....	53
Tableau 19. Activités chitinolytique de la souche <i>Micromonospora echinospora</i> C33.....	53
Tableau 20. Purification de la chitinase produites par <i>Micromonospora echinospora</i> C33...	55

Liste des abreviations

ANOVA : analyse of variance

BSA : sérum albumine bovin

CatD: C-terminal catalytic domain

CAZy : Carbohydrate Active enzyme

CBD : chitin-binding domain

CBM : carbohydrate-binding module

DNS : Dinitrosalicylic Acid

DOE : design of experiments

GH : glycosides hydrolases

GlcNAc: N-acétylglucosamine

ISP2 : International Streptomyces Project

KDa : Kilodalton

OFAT : one factor at a time

PBD : Plackett-Burman design

PR proteins :Pathogenesis-related protein

R ajusté : coefficient de détermination ajusté

R² : coefficient de détermination

RSM : Méthodologie des surfaces de réponse.

SCP : Single-cell proteins

Tris : 2-amino-2(hydroxyméthyl)propane1,3-diol

Valeur F : valeur de fisher

Valeur P : valeur de probabilité

Valuer T : valeur de t Student

Résumé

Le but de ce mémoire est de mettre en place un milieu de culture afin d'optimiser la production de la chitinase par la souche *Micromonospora echinospora* C33, en utilisant les plans d'expérience et les méthodes des surfaces de réponse. Cette souche a été précédemment isolée et identifiée à partir d'un sol semi-aride de la région de Laghouat (Algérie). Un premier plan statistique de Plackett-Burman nous a permis d'identifier trois facteurs qui ont un effet significatif sur la production de chitinase. Ces derniers ont fait l'objet d'une optimisation par le plan d'expérience de Box-Behnken couplé à la méthode des RSM. La production maximale de chitinase a été prévue dans un milieu contenant 10% de chitine colloïdale ; 15g/l de peptone ; 5 g/l de galactose, en utilisant les courbes d'iso-réponse du logiciel MINITAB version 17, pour une production maximale de l'enzyme égale à 0,878 U/ml. Ce qui a été confirmé par des cultures en erlenmeyers où la production de la chitinase par *Micromonospora echinospora* C33 a atteint 0,828 U/ml. De ce fait, Le rendement de la production de l'enzyme a été augmenté de 23,42 % après optimisation par rapport au milieu de base 0.194 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 trois étapes majeurs de purification où elle a atteint un seuil de purification de 4,72 ; un rendement de 27,41% et une activité spécifique égale à 3 U/mg. L'activité chitinolytique de l'extrait brut était maximale à 30 °C et à pH 8,0. Ces résultats peuvent constituer une base importante pour les applications industrielles.

Les mots clés : Chitinase ; *Micromonospora echinospora* C33 ; Plackett-Burman ; Box-behnken ; purification ; caractérisation partielle.

Abstract

The aim of this work was to use statistical Plackett–Burman and Box–Behnken response surface methodology to optimize the medium components and, thus, improve chitinase production by *Micromonospora echinospora* C33. This strain has previously been isolated and identified from a semi-arid soil (Laghout-Algeria). First, galactose, peptone and colloidal chitin were proved to have significant effects on chitinase activity using the Plackett–Burman design. Then, an optimal medium was obtained by a Box–Behnken factorial design of response surface methodology in liquid culture. Maximum chitinase production (0.878 U/ml) was predicted in medium containing 10% colloidal chitin; 15g/l peptone; 5 g/l galactose. This was confirmed by Erlenmeyer cultures where the Production of chitinase by *Micromonospora echinospora* C33 reached 0.828 U/ml, the yield of enzyme production was increased 23.42% after optimization by the response surface methodology compared to basic medium 0.194 U/ml.

Finally, we focused on the purification and partial characterization of the enzyme produced in the optimized medium. The enzyme was purified in three major steps, reaching a purification level of 4.72; a yield of 27.41% and a specific activity equal to 3 U/mg. The chitinolytic activity of the crude extract was maximal at 30°C and pH 8.0. These results can provide an important basis for industrial applications.

Key words: Chitinase; *Micromonospora echinospora* C33; Plackett-Burman; Box-behnken, Purification; Partial characterization.

الملخص

كان الهدف من هذه الأطروحة هو إعداد وسط مغذي من أجل تحسين إنتاج الكيتيناز عن طريق سلالة *Micromonospora echinospora* C33 ، باستخدام التصاميم التجريبية وأساليب سطح الاستجابة. سبق أن تم عزل هذه السلالة وتحديد لها في التربة الشبه القاحلة في منطقة الأغواط (الجزائر). سمح لنا أول مخطط Plackett-Burman بتحديد ثلاثة عوامل لها تأثير كبير على إنتاج الكيتيناز. هذه الأخيرة تم البحث على قيمتها المثلى بواسطة مخطط Box-Behnken التجريبي إلى جانب طريقة RSM. تم التنبؤ بالحد الأقصى لإنتاج الكيتيناز في وسط يحتوي على 10٪ من الكيتين الغروي؛ 15 غ / ل من بيبتون. 5 جم / لتر من الجلاكتوز ، باستخدام منحنيات الاستجابة السطحية لبرنامج MINITAB الإصدار 17، لإنتاج أقصى للإنزيم يبلغ 0.878 وحدة / مل. تم تأكيد ذلك من خلال أوساط في زجاجات إرلمير حيث بلغ إنتاج الكيتيناز بواسطة *Micromonospora echinospora* C33 0.828 وحدة / مل. نتيجة لذلك، تم زيادة إنتاجية الإنزيم بنسبة 23.42٪ بعد التحسين مقارنة بالوسط الأساسي 0.194 وحدة/ مل. أخيرًا، ركزنا على التطهير والتوصيف الجزئي للإنزيم المنتج في الوسط الأمثل. خضع الإنزيم لثلاث خطوات تطهير رئيسية حيث وصل إلى عتبة تنقية 4.72؛ مردود 27.41 ٪ ونشاط خاص يساوي 3 وحدة / ملغ. كان النشاط الكيتيني للمستخلص الخام أقصى في 30 درجة مئوية ودرجة الحموضة 8.0. هذه النتائج يمكن أن تكون أساسا هاما للتطبيقات الصناعية.

الكلمات المفتاحية: الكيتيناز، *Micromonospora echinospora* C33 ، Box-Behnken، Plackett-Burman ، التطهير، التوصيف الجزئي.

INTRODUCTION

La biotechnologie est une vaste discipline dans laquelle des processus biologiques, des organismes, des cellules ou des composants cellulaires sont exploités pour développer de nouvelles technologies. Les nouveaux outils et produits développés par les biotechnologues sont utiles dans la recherche, l'agriculture, l'industrie etc. La biotechnologie des enzymes microbiennes : Production, biocatalyse et applications industrielles offre un aperçu complet des dernières innovations sur les enzymes, mettant en évidence les avancées biotechnologiques en matière de production et de purification, ainsi que des informations sur les applications réussies en tant que biocatalyseurs dans plusieurs processus chimiques et industriels dans différentes conditions environnementales.

L'utilisation d'enzymes dans les procédés industriels a une importance cruciale puisqu'elles peuvent éliminer l'utilisation de températures élevées, de pH extrêmes, de solvants organiques et, en même temps, offrir une spécificité élevée du substrat, une faible toxicité, une pureté du produit, un impact environnemental réduit et une facilité de cessation de l'activité. Les micro-organismes constituent la principale source d'enzymes car ils produisent de fortes concentrations d'enzymes extracellulaires. De nouvelles enzymes peuvent être obtenues à partir de la nature par trois techniques, à savoir le criblage méta-génomique, l'exploitation du génome et l'exploitation de nouvelles niches écologiques.

Les actinobactéries représentent une partie importante de la microflore des sols et leur capacité à synthétiser des molécules bioactives a suscité de l'intérêt pour leur isolement de milieux naturels (Goodfellow et O'Donnell, 1989). L'isolement des actinobactéries non streptomycètes est récemment devenu une source intéressante de métabolites utiles à l'industrie.

Les *Micromonospora*, après les *Streptomyces*, sont l'un des producteurs les plus prolifiques de métabolites secondaires bioactifs; elles produisent une très grande diversité de structures chimiques. Plus de 740 souches de *Micromonospora* sont des producteurs de différents métabolites bioactifs (Bérdy, 2005). Il a été démontré que les *Micromonospora* sont comparables en abondance aux *Streptomyces* dans certains écosystèmes terrestres, comme la rhizosphère des mousses forestières (Zenova et Zvyagintsev, 2002). Elles sont des productrices particulièrement importants d'aminosides, oligosaccharide, antibiotiques antitumoraux énediynes, antibiotiques peptidiques (Wagman et Weinstein, 1980 ; Vobis, 1992;

Horan, 1999) et des enzymes (la cellulase, la pectinase et la chitinase....) (Hirsch et Valdés, 2010 ; Alonso-Vega et *al.*, 2012).

Après la cellulose, la chitine est le composé organique le plus abondant dans la nature (Kurita, 2001), elle est largement répandue dans la nature et forme un constituant majeur des coquilles de crustacés tels que les crabes et les crevettes, les exosquelettes d'insectes et les parois cellulaires d'une variété de champignons. Les chitinases (EC 3.2.1.14) sont des glycosyl hydrolases qui catalysent la dégradation de la chitine, un polymère insoluble à liaison β -1,4 linéaire de N-acétylglucosamine (GlcNAc). Au cours de la décennie précédente, elles ont fait l'objet d'une attention accrue en raison de leur large éventail d'applications. Les applications pratiques des chitinases comprennent notamment la préparation de protoplastes à partir de champignons (Yabuki et *al.*, 1984), agents de protection contre les champignons phytopathogènes (Sakuda et *al.*, 1990 ; Bassler et *al.*, 1991) et la production d'oligosaccharides en tant que substances biologiquement actives (Usui et *al.*, 1990). Les oligomères produites par hydrolyse enzymatique de la chitine ont également suscité un grand intérêt en raison de leur large application dans les domaines médicaux, agricoles et industriels. telles que les activités antibactériennes, antifongiques, hypocholestérolémiantes et antihypertensives (Boller, 1960; Gooday, 1986; Ordentlich et *al.*, 1988).

Vu l'importance des chitinases des souches actinomycétales et vu qu'aucune recherche n'a été portée sur l'optimisation de la production de chitinase chez *Micromonospora echinospora* C33 (LN864583). nous avons choisi cette espèce pour mener notre étude, dont les objectifs se focalisent principalement sur :

- Optimisation d'un milieu de culture pour la production de chitinases par la souche *Micromonospora echinospora* C33.
- Purification et caractérisation partielle de l'enzyme.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

LA CHITINE

1. Définition et structure

La chitine a été isolée pour la première fois à partir d'un champignon en 1811 par le chimiste français Henri Braconnot qui l'appela fungina, mais c'est en 1823 qu'Auguste Odier isole le même résidu insoluble et le nomme chitine du grec *χιτών* signifiant « tunique ».

La chitine, homopolymère de N-acétylglucosamine lié par des liaisons β 1-4 (Figure 1) est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature. Elle est insoluble dans l'eau, les alcalins concentrés et dilués, les alcools et autres solvants organiques. Elle constitue le principal composant structural des coquilles et cuticules d'arthropodes, de crustacés, d'insectes et dans les cellules murs de champignons (Henrissat et Bairoch, 1993).

La chitine présente un grand intérêt, non seulement en tant que ressource sous-utilisée, mais également en tant que nouveau biomatériau fonctionnel présentant un potentiel élevé dans divers domaines et les progrès récents en chimie de la chitine sont assez importants (Dutta *et al.*, 2002).

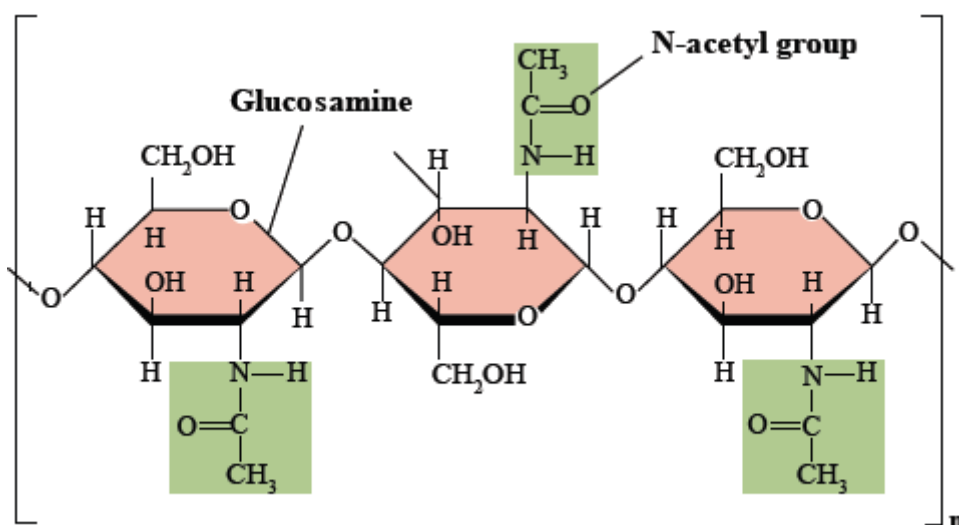


Figure 1. Structure de chitine.

La chitine présente trois formes cristallines, α , β et γ (Figure 2), qui diffèrent par l'arrangement de la chaîne polysaccharidique et par la disposition des liaisons hydrogène (Mol et Wessels, 1990; Kaya *et al.*, 1992).

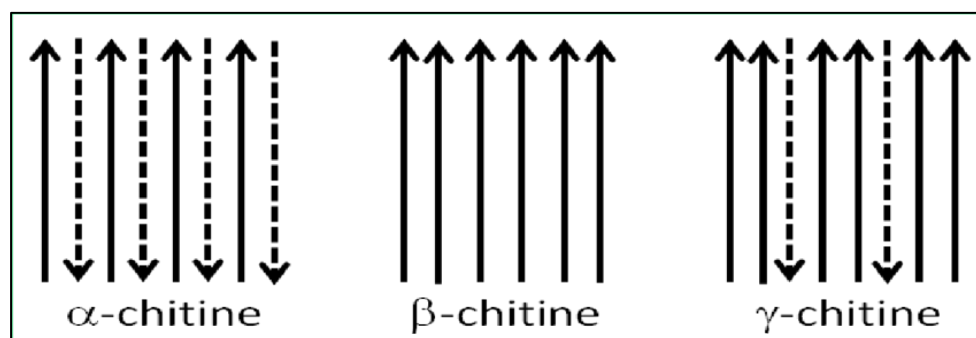


Figure 2. Schéma simplifié des trois formes cristallines de la chitine.

2. Sources

La chitine est un homoglucone structural trouvé chez certains mollusques et chez les arthropodes et les céphalopodes en général, plus particulièrement dans l'exosquelette (cuticule) des insectes et des crustacés, et aussi dans les parois cellulaires de la plupart des champignons et de nombreuses algues (Blumenthal et Roseman, 1957 ; Herring, 1979). Le tableau 1 montre quelques sources de chitine.

Tableau 1. Pourcentages des teneurs en chitine par espèces (Mathur et 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
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
Champignons	2,9 à 20,1	Plume de calmar	2,9 à 20,1
Algues/ Lichen	Faible	Krill <i>Euphasia superba</i>	Faible

3. Applications

La chitine est un polymère biocompatible, biodégradable et non toxique. Ces propriétés trouvent plusieurs applications. Le tableau 2 met en évidence quelques applications de la chitine et ses dérivés.

Tableau 2. Quelques applications de la chitine.

Domaines d'application	Applications	références
Biomédical	<ul style="list-style-type: none"> - la cicatrisation des plaies. - excipients pour la délivrance de médicaments. - immuno-modulateur. - échafaudages pour la régénération des os et d'autres tissus naturels. - Contrôle du cholestérol sanguin. - Antioxydant. 	(Madhumathi et <i>al.</i> , 2010). (Jayakumar et <i>al.</i> , 2007). (Aam et <i>al.</i> , 2010). (Muzzarelli, 2010). (Brandl et <i>al.</i> , 2007). (Razdan et Pettersson, 1994). (Calabrese et <i>al.</i> , 2005).
Agriculture	<ul style="list-style-type: none"> - lutte biologique. - protection des embryons somatiques. - Engrais. 	(San-Lang et <i>al.</i> , 2002). (Day et <i>al.</i> , 2001). (De Jong et <i>al.</i> , 1993).
Biotechnologie	<ul style="list-style-type: none"> - immobilisation des enzymes. 	(Barbara, 2004).
Environnement	<ul style="list-style-type: none"> - agent flocculant pour le traitement de l'eau. 	(Shigehiro, 1996).
Alimentaire	<ul style="list-style-type: none"> - additif alimentaire. 	(Shigehiro, 1996). (Harish et Tharanathan, 2007).

4. Biodégradation de la chitine

Malgré l'abondance et de l'omniprésence de la chitine, aucune accumulation quantitative de ce dernier n'a été signalé à long terme dans la nature, ce qui implique une efficacité de sa biodégradation (Tracey, 1957; Gooday, 1990a).

La biodégradation de la chitine est assurée par de nombreux enzymes qui sont détectés dans plusieurs organismes, tels que les champignons, les bactéries (Gooday, 1990a), les archées (Huber *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2003), les rotifères (Štrojsová et Vrba, 2005), certaines algues (Vrba *et al.*, 1996; Štrojsová et Dyhrman, 2008), mais aussi des plantes carnivores ou dans le tractus digestif des animaux supérieurs (Gooday, 1990a).

La lyse complète du polymère de la chitine comprend typiquement trois étapes principales :

- ✓ le clivage du polymère en oligomères solubles dans l'eau,
- ✓ la scission de ces oligomères en dimères et,
- ✓ le clivage des dimères en monomères.

Les deux premières étapes sont généralement catalysées par les chitinases ce qui implique l'hydrolyse des liaisons $(1 \rightarrow 4) - \beta$ -glycoside (Fuchs *et al.*, 1986; Romaguera *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 1999; Shimosaka *et al.*, 2001; Tsujibo *et al.*, 2003).

Alternativement, la chitine peut être désacétylée en chitosane ou éventuellement même sous forme de cellulose, si elle est soumise à une désamination (Figure 3). Un tel mécanisme de dégradation a été suggéré dans certaines études antérieures (ZoBell et Rittenberg, 1938; Campbell et Williams, 1951). Les chitinases et les chitosanases se chevauchent dans la spécificité du substrat, tandis que leur efficacité respective est contrôlée par le degré de désacétylation du substrat polymère (Somashekar et Joseph, 1996) (Figure 3). De plus, il a également été démontré que le lysozyme hydrolyse la chitine (Skujin, š et *al.*, 1973). Les cellulases peuvent également se lier directement à la chitine (Ekborg *et al.*, 2007), mais rien n'indique que ces enzymes hydrolysent réellement ce polymère.

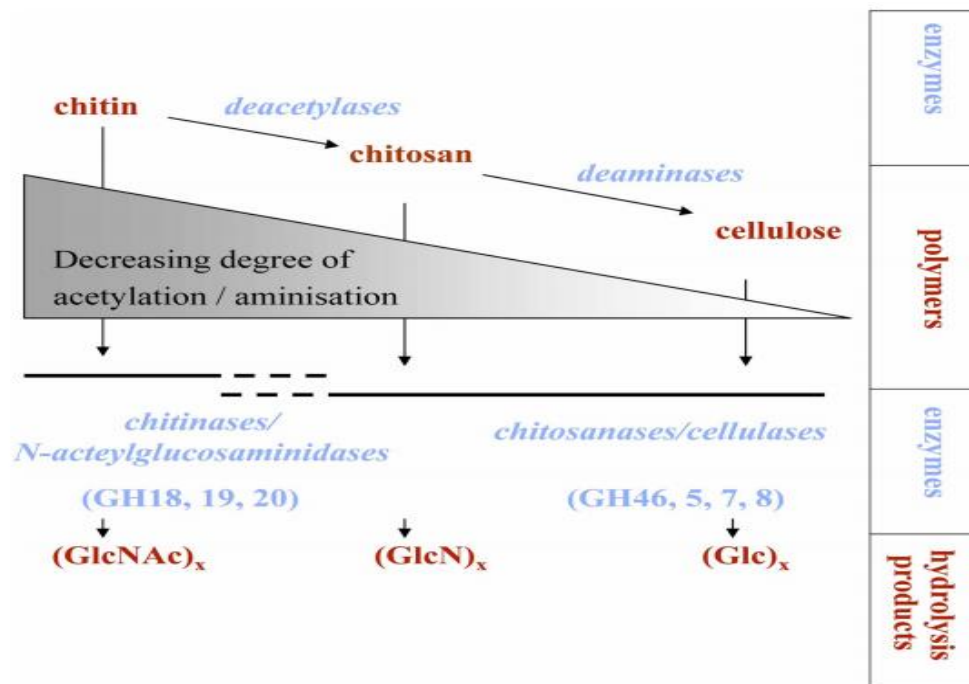


Figure 3. Processus impliqués dans la biodégradation de la chitine.

GH : famille des glycosides hydrolases; GlcNAc : N-acétylglucosamine; GlcN : glucosamine;
Glc : glucose.

CHAPITRE 2

LES CHITINASES

1. Généralités

La chitinase est une protéine omniprésente qui est abondamment présente dans tous les règnes de la vie y compris les bactéries, les champignons, les insectes, les vertébrés, les virus, les animaux et les plantes supérieures. Ces protéines participent à un large spectre de processus physiologiques, tels que la nutrition, la morphogenèse, la pathogenèse, le parasitisme, la régulation de la croissance et l'immunité (Dahiya et *al.*, 2006).

Selon la base de données Carbohydrate Active enzyme (CAZy), il s'agit d'enzymes appartenant à la famille des glycosides hydrolases (GH) « un groupe d'enzymes qui hydrolysent la liaison glycosidique entre les molécules des polysaccharides ». Les chitinases sont présentes dans les familles GH18, GH19, GH23 et GH 48 (Adrangi et Faramarzi, 2013). Ces familles font partie des 131 familles de glycosides hydrolases classées en fonction de la similarité de la séquence des acides aminés.

2. Classification des enzymes chitinolytiques

D'après leur mode d'action, les enzymes chitinolytiques peuvent être classées en deux classes (Graham et *al.*, 1994):

- Endochitinases (EC3.2.1.14) : enzymes qui clivent la chitine au hasard sur des sites internes, ce qui génère des multimères solubles à faible masse moléculaire de GlcNAc, comme le chitotétraose, la chitotriose et le diacétylchitobiose.
- Exochitinases qui sont subdivisées en deux sous-catégories :
 - ✓ Chitobiosidases (EC3.2.1.1.29) ou chitine-1,4- β -chitobiosidases : enzymes qui catalysent la libération progressive du diacétylchitobiose à partir de l'extrémité non réductrice des chaînes de chitine. elles donnent uniquement des diacétylchitobioses.
 - ✓ β -(1,4)-N-acétyl-glucosaminidases (GlcNAcase, EC3.2.1.30) ou chitobiasés divisent le diacétylchitobiose et le polymère de chitine supérieur, y compris le chitotriose et le chitotétraose, en monomères GlcNAc. L'enzyme clivera également les substrats chromogènes pNP-GlcNAc et p-nitrophényl-Nacetyl-b-D-galactosaminide pour libérer p-Nitrophenyl et 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide pour libérer 4-Methylumbellifère. Du fait qu'elle possède une large spécificité de substrat, l'enzyme est également appelée β -(1,4)-N-acétylhexosaminidases (HexNAcase, EC3.2.1.52).

La figure 4 montre les modes d'action des différents types des enzymes chitinolytiques.

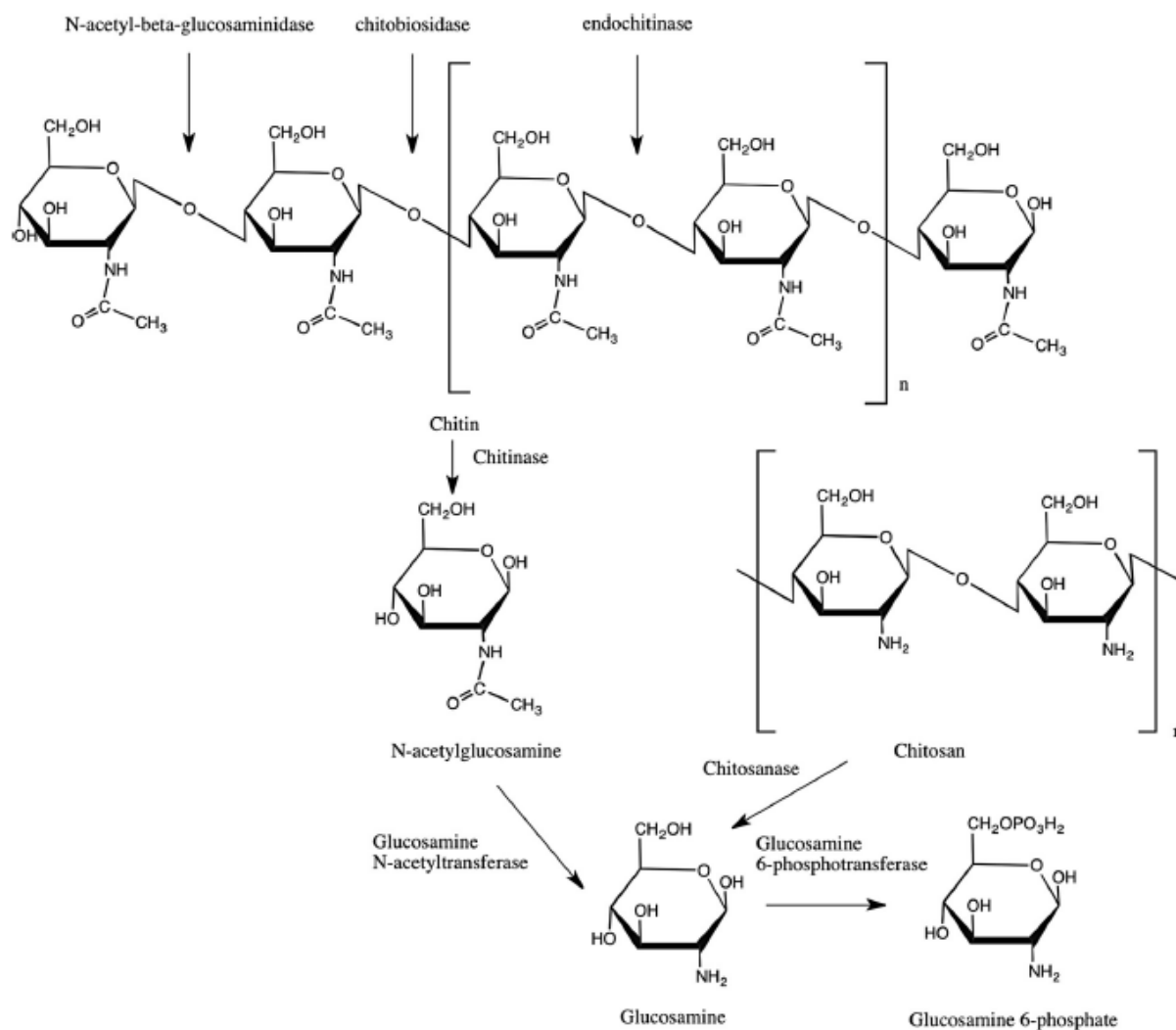


Figure 4. Structures de chitine, chitosane et produits de dégradation avec enzymes et réactions spécifiques (Yan et Fong, 2015).

3. Structure et mode d'action

Les familles GH18 ont toutes des domaines en tonneau similaires (β/α)₈ (Sumida et *al.*, 2011). En revanche, les enzymes GH19 et GH23 adoptent une structure $\alpha+\beta$ (Wohlkonig et *al.*, 2010 ; Yoshida et *al.*, 2010). Alors que les enzymes GH48 ont une structure de baril (α/α)₆ caractérisée par six hélices α centrales entourées de six hélices α externes (Figure 5) (Yennamalli et *al.*, 2011 ; Adrangi et Faramarzi, 2013).

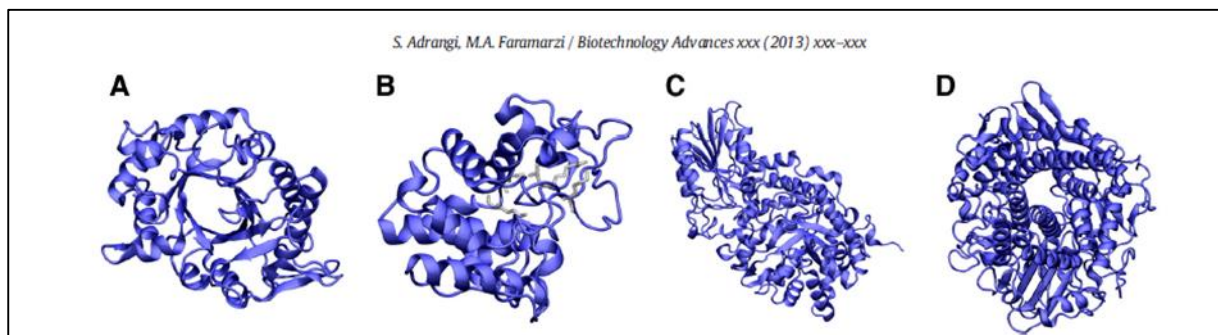


Figure 5. Structure tridimensionnelle d'enzymes GH représentatives (Humphrey et al., 1996).

(A) Une chitinase GH18 d'*Aspergillus fumigatus* montrant un tonneau $(\beta/\alpha)_8$ (PDB ID : 2XVP). (B) Une chitinase GH19 de *Carica papaya* montrant la structure $\alpha+\beta$ (PDB ID : 3CQL). (C) Une glucosylhydrolase GH3 de *Hordeum vulgare* montrant un domaine bipartite composé d'un tonneau $(\beta/\alpha)_8$ (inférieur droit) et un sandwich $(\alpha/\beta)_6$ (supérieur gauche) (PDB ID : 1IEQ). (D) Une GH48 cellobiohydrolase de *Clostridium thermocellum* montrant un tonneau $(\alpha/\alpha)_6$ (PDB ID : 1L1Y). Toutes les figures ont été préparées à l'aide de VMD (Adrangi et Faramarzi, 2013).

Les chitinases agissent de manière processive, c'est-à-dire qu'une fois attachées à une chaîne de substrat, elles enfilent la chaîne à travers leur fente catalytique en effectuant plusieurs coupes hydrolytiques au lieu de libérer le substrat après chaque coupure, ce qui permet à l'enzyme d'empêcher la réassociation de chaînes monopolymères avec le matériau insoluble entre les cycles catalytiques, réduisant ainsi le nombre de fois où l'enzyme doit effectuer le processus énergétiquement défavorable d'accès à une chaîne unique. Les résidus aromatiques – particulièrement les tryptophanes – fournissent l'environnement nécessaire à la fixation flexible et au mouvement du substrat à travers le site actif. Ce procédé comprend une stratégie efficace pour l'hydrolyse des substrats insolubles (Aam et al., 2010 ; Yan et Fong, 2015).

Les enzymes chitinolytiques catalysent généralement la dépolymérisation de leur substrat par l'une des deux voies dites à simple et double déplacement (Figure 6) (Cantarel et al., 2009 ; Aam et al., 2010 ; Li et Greene, 2010 ; Slamova et al., 2010 ; Udaya Prakash et al., 2010). Dans les deux voies, deux groupes catalytiques distincts sont impliqués : un groupe carboxyle donneur de protons et un groupe catalytique qui agit soit comme base dans le mécanisme à simple déplacement, soit comme nucléophile dans le mécanisme à double déplacement (Udaya Prakash et al., 2010). Le mécanisme à simple déplacement entraîne une

inversion de la configuration anomérique du résidu GlcNAc hydrolysé. Par contre, le mécanisme à double déplacement, conserve la configuration anomérique (Adrangi et Faramarzi, 2013) (Tableau 3).

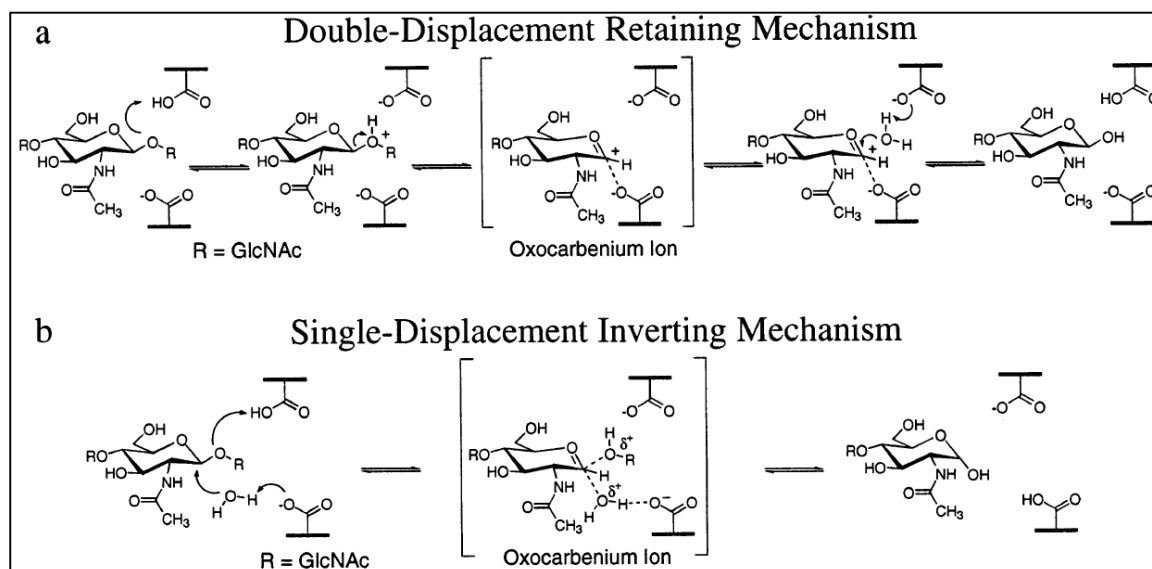


Figure 6. Mécanisme d'hydrolyse de la chitine à simple et à double déplacement (Brameld et Goddard, 1998).

Tableau 3. Caractéristiques des enzymes chitinolytiques appartenant à différentes familles de GH.

Chitinases	Mécanisme catalytique	Structure	Reference
GH18	Rétention	$(\beta/\alpha)_8$	CAZY
GH19	Inversion	$\alpha+\beta$	
GH23	Inversion	$\alpha+\beta$	
GH48	inversion	$(\alpha/\alpha)_6$	

4. Rôle des chitinases

Plusieurs organismes produisent une grande variété d'enzymes hydrolytiques qui présentent différentes spécificités de substrat et d'autres propriétés utiles pour diverses fonctions. Chez les bactéries, les chitinases jouent un rôle dans la nutrition et le parasitisme, tandis que chez les champignons, les protozoaires et les invertébrés, elles sont également impliquées dans la morphogénèse. Les chitinases sont impliquées dans le mécanisme de défense des plantes et des vertébrés. Les baculovirus, qui sont utilisés pour la lutte biologique contre les insectes nuisibles, produisent également des chitinases pour la pathogénèse.

L'activité des chitinases dans le sérum humain a récemment été décrite. Le rôle possible suggéré est une défense contre les pathogènes fongiques (Roushan Islam, 2015).

5. Applications des chitinases.

Les chitinases ont plusieurs applications industrielles et agricoles. Elles manifestent de plus en plus d'intérêt dans différents domaines de la biotechnologie tels que la gestion des déchets, la lutte contre les ravageurs en agriculture et les soins de santé humaine. Parmi ces différentes applications, on peut citer :

5.1. Production de protéines unicellulaires.

Revah-Moiseev et Carrod (1981) ont utilisé des enzymes chitinolytiques de *Serratia marcescens* et *Pichia kudriavzevii* pour convertir la chitine des déchets de mollusques en protéine monocellulaire (SCP : Single-cell proteins) de levure. Vyas et Deshpande (1991) ont utilisé les enzymes chitinolytiques de *Myrothecium verrucaria* et *Saccharomycetes cerevisiae* pour produire des SCP à partir de déchets chitineux contenant 61% de protéines et 3,1% seulement d'acide nucléique.

5.2. Isolement de protoplastes.

Les protoplastes fongiques sont couramment utilisés dans les applications biotechnologiques et comme moyen expérimental d'étudier la synthèse de la paroi cellulaire, la synthèse et la sécrétion d'enzymes. Les parois cellulaires des champignons contiennent de la chitine qui nécessite l'utilisation d'enzymes chitinolytiques avec une autre enzyme dégradant la paroi pour l'isolement du protoplaste. Dahiya et al. (2005) ont signalé l'efficacité de la chitinase d'*Enterobacter* sp. NRG4 dans la génération de protoplastes de *Trichoderma reesei*, *Pleurotus florida*, *Agaricus bisporus* et *Aspergillus niger*.

5.3. Production de chitooligosaccharides, de glucosamine et de GlcNAc.

La chitinase peut être utilisée pour produire des chitooligosaccharides, des glucosamines et des GlcNAc qui sont destinés à des applications pharmaceutiques. Par exemple, les chitooligosaccharides comme le chitohexaose et le chitoheptaose offrent une activité anti-tumorale. Murao et al. (1992) ont utilisé une chitinase de *Vibrio* pour préparer la chitopentaose et la chitotriose. Terayama et al. (1993) ont également utilisé la chitinase de *Streptomyces griseus* pour produire du chitobiose qui a ensuite été modifié chimiquement pour le transformer en 2-acétamido-2-désoxy D-allopyranose, qui joue un rôle dans la synthèse d'un inhibiteur enzymatique (N,N'-diacetyl- β -chitobiosyl allosamizoline).

5.4. Application médicale

Les chitinases peuvent être utilisées dans les soins de santé humaine, comme la fabrication de préparations ophtalmiques à base de chitinases et de microbiocides. Une utilisation médicale directe a été suggérée pour les chitinases dans le traitement des maladies fongiques pour potentialiser l'activité des antifongiques (Pope et Davis, 1979 ; Orunsi et Trinci, 1985). Elles peuvent également être utilisées comme additifs potentiels dans les crèmes et lotions antifongiques en raison de leurs applications topiques.

5.5. Outil d'étude scientifique

Localisation cytochimique de chitine/chitosane à l'aide de complexes dorés de chitinase/chitosanase. La localisation cytochimique peut être utilisée pour révéler la spécialisation fonctionnelle de la chitine et du chitosane. Par exemple, Benhamou et Asselin (1989) ont utilisé le complexe d'agglutinine-or de germe de blé et le complexe d'or de chitinase pour détecter les résidus de GlcNAc dans les parois cellulaires secondaires des plantes et dans les champignons pathogènes. Grenier et *al.* (1991) ont utilisé la chitosanase de l'orge avec des particules colloïdale en or pour repérer le chitosane et le localiser sur la paroi des cellules sporales et hyphaliques, notamment dans *Ophiostoma ulmi* et *Aspergillus niger*. Manocha et Zhonghua (1997) ont également utilisé des complexes marqués à l'or pour détecter des résidus de chitine et de N-acétyl-D-glucosamine dans un mycoparasite biotrophique, *Piptocephalis virginian*.

5.6. Gestion des déchets

Les chitinases recombinantes peuvent être utilisées pour convertir la biomasse chitineuse en composants dépolymérisés utiles plus simples, réduisant ainsi la pollution, essentiellement de l'eau. Les chitoooligomères obtenus par action des chitinases ont un large éventail d'applications biotechnologiques dans les industries biochimiques, alimentaires et chimiques. La chitinase peut également être utilisée dans la conversion des déchets chitineux en biofertilisants. Une autre approche pour utiliser efficacement les déchets chitineux est la production de protéines unicellulaires (SCP). Dans cette approche, les déchets chitineux dégradés par la chitinase sont utilisés comme source de carbone ou de nutriments pour la production de biomasse. Les bactéries et levures productrices de chitinase (par ex. *S. marcescens* et *Pichia kudriavzevii*) peuvent être utilisées dans les cultures aquacoles pour la production de SCP (Swiontek Brzezinska et *al.*, 2014).

5.7. Chitinase en tant que cible pour les biopesticides

Les chitinases sont impliquées dans les fonctions morphologiques des champignons et des insectes (Villagomez-Castro et Lopez-Romero, 1996). Les inhibiteurs de la chitinase peuvent être utilisés comme biopesticides, par exemple l'allosamidine s'est révélé inhibiteur de la croissance des acariens (*Tetranychus urticae*) et des mouches domestiques (*Musca domestica*) après ingestion (Sakuda et *al.*, 1987).

5.8. Lutte contre les champignons phytopathogènes

Dans de nombreuses plantes, la chitinase représente l'une des protéines liées à la pathogénèse (PR proteins: Pathogenesis-related protein). Elle est produite comme réponse de défense contre les champignons pathogènes et les insectes qui contiennent de la chitine dans leur enveloppe protectrice. Ces chitinases sont principalement induites dans les organes végétatifs des plantes par infection mais certaines sont également présentes dans les graines. De ce fait, Al Ahmadi et *al.*, (2008) ont suggéré que la surexpression d'une combinaison de diverses chitinases dans les plantes transgéniques pourrait aider à lutter contre les pathogènes fongiques.

Les agents de lutte biologique tels que les micro-organismes ou leurs métabolites offrent également une alternative écologique pour la lutte contre les maladies des plantes, en particulier les champignons et les insectes pathogènes (Wang et *al.*, 2002). Swiontek Brzezinska et *al.*, (2014) ont rapporté des activités antifongiques par différents microorganismes producteurs de chitinase (Tableau 4).

Tableau 4. Effet antagoniste de quelques chitinases bactériennes. (Swiontek Brzezinska et al., 2014)

Source	Antagoniste contre
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai TM	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. melonis, <i>Sclerotium rolfsii</i>
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Fusarium</i> sp. R solani, <i>Aspergillus niger</i> (NCIM563),
<i>Trichoderma atroviride</i> PTCC5220	<i>Rhizoctonia salani</i>
<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Altemria altemata</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Magnaporthe grisea</i>
<i>Basidiobolus ronarum</i>	<i>Rhizpctonia solani</i> , <i>F.solani</i>
<i>Bacillus</i> sp.BG-11	<i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>R. solani</i> <i>phtophthora infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>phanerochaete chrysosporium</i>
<i>Bacillus cereus</i> YQQ 308	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>PULTIMUM</i>
<i>Bacillus pumilus</i> SG2	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>R. salani</i> , <i>Magnaporsrthe grisea</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Bipolaris</i> sp.
<i>Bacillus cereus</i> IO8	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Colmeri 15A3	<i>Rhizoctonia salani</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. pricola</i> ,
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>Fusarium equiseti</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> SBK1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>F. oxynporum</i>
<i>Enterobacter</i> sp. NRG4	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor rouxi</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>
<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	<i>Fusarium</i> sp. <i>Rhizoctonia bataticola</i>
<i>Stenotrohomonas maltophila</i>	<i>Fusarium sonali</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>R. solani</i> , <i>A. altermata</i>
<i>Rhizobium</i> sp	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Curcularia lunata</i> , <i>F oxysporum</i> , <i>Fusarium udum</i>
<i>Serratia marcescens</i> B2	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Vibrio pacini</i>	<i>Mucor racemosus</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Zygorhynchus heterognmus</i> , <i>Candida albicans</i>
<i>Streptomyces halstedii</i> AJ-7	<i>Altemaria altmata</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>S. lycopersici</i> , <i>F. oxysporum</i>
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i>
<i>Streptomyces tendae</i> TK-VL_333	<i>Aspergillus niger</i> , <i>F.oxysporum</i>
<i>Streptomyces</i> sp. DA11	<i>Aspergillus niger</i> , <i>condida albicans</i>
<i>Streptomyces roseolus</i> DH	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Rhizopus chinensis</i> , <i>penicillium</i> spp., <i>Mucor</i> spp.
<i>Streptomyces sporovirgulis</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>Streptomyces rimosus</i>	<i>Alternaria alterbata</i> , <i>F.solani</i>

CHAPITRE 3

MICROORGANISMES

PRODUCTEURS DE

CHITINASES

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 et chet, 1998; Patial 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 au niveau des lésions formées sur l'exosquelette des arthropodes (Charpentier et Percheron, 1983; Schrempf, 2001). 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, 1995). De nombreux protozoaires et métazoaires parasites des tractus digestifs présentent la capacité de synthétiser des chitinases. Parmi ces parasites, nous trouvons des filaires, des amibes, des trypanosomes, des plasmodiums (Huber et *al.*, 1991). Chacun de ces microorganismes utilisent 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.

Le tableau 5 contient quelques exemple des micro-organismes producteurs des chitinase.

Tableau 5. Origines des Chitinases.

Bactéries	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>Maltophilia</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Vibrio fluvialis</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Xanthomonas</i> spp., <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium</i> <i>paraputrificum</i>
Actinobactéries	<i>Streptomyces lividans</i> , <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> , <i>Streptomyces</i> <i>lavendulae</i> , <i>Streptomyces griseus</i> , <i>Streptomyces coelicolor</i>
Champignons	<i>Trichoderma</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Beauveria</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i> <i>saito</i>
Virus	<i>Chlorella Virus PBCV-1</i> , <i>Helicovera armigera nucleocapsid</i> <i>nucleopolyhedrovirus</i> (HaSNPV), <i>Cydia pomonella granulovirus</i> (CpGV), <i>Baculoviruses</i> , <i>Autographa californica multiple nuclear</i> <i>polyhedrosis virus</i> (AcMNPV)

2. Actinobactéries, producteurs de chitinases

Les actinobactéries forment un grand groupe de microorganismes procaryotes appartenant à l'ordre des Actinomycétales. Cet ordre regroupe des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en "guanine + cytosine" relativement élevé dans leur ADN ($G + C > 55\%$) et dont la majorité forme un véritable mycélium ramifié (Bergey Manuel, 1994). Les actinobactéries sont des eubactéries chimioorganotrophes, hétérotrophes, aérobies strictes ou microaérophiles, dont plusieurs produisent des spores non mobiles ou parfois mobiles. Ces microorganismes présentent un cycle de développement cellulaire asexué similaire à celui des champignons imparfaits (Locci et Sharples, 1984). elles sont ubiquitaires et se trouvent dans différentes niches écologiques telles que : sols, air, fumier, composts, foin, débris végétaux, résidus fibreux de cannes à sucre, pollen des plantes, sédiments marins, lacs, rivières, mers et océans, glaciers, déserts, sols pollués, lacs alcalins, milieux salins (Lechevalier et Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983; Lacey, 1997).

Les Actinobactéries produisent plusieurs molécules ayant de nombreuses applications dans divers domaines et de ce fait, présentant un fort intérêt pour les industriels (antibactériens, antifongiques, insecticides, herbicides, antiparasites, acaricides, antivirales,

anti tumoraux, antimitotiques, anti allergénique, protéases alcalines, glucose isomérase, vitamines ...) (Bouras, 2005). Par ailleurs, les actinobactéries ont un rôle écologique. elles possèdent la capacité de dégrader des molécules complexes non dégradées par les champignons ou les autres bactéries telles que la cellulose ; la lignine ; et la chitine, contribuant ainsi à la fertilisation des sols. Les actinobactéries chitinolytiques sont courants dans la nature où elles jouent un rôle important dans la dégradation de la chitine (Brinda et Crawford, 1997). La Chitinolyse est une caractéristique très usuelle les *Streptomyces* isolées du sol, alors que très peu d'études sont rapportés sur les chitinases des autres genres d'actinobactéries dits rares (Gupta et al., 1995; Gomes et al., 2000). En 1995, Mitsutomi et al., rapportent la purification de deux nouvelles chitinases, C1 et C2 à partir de la souche *Streptomyces griseus* HUT 6037. C'est la première étude qui décrit la capacité des chitinases à hydrolyser les liaisons β -glucosaminidiques en des unités plus simples de N-acétylchitosane (Mitsutomi et al., 1995). 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 et Crawford, 1995). Hoster et al. (Hoster et al., 2005), ont isolés la chitinase IS à partir de la souche *Streptomyces griseus* MG3, cette enzyme montre une activité très élevée dans un large intervalle de pH, incluant les pH acides et alcalins. Cette propriété en plus de sa capacité à inhiber la croissance des champignons phytopathogènes la rend très utile pour une application comme agent de lutte biologique.

El-Sayed et al., ont identifiés deux chitinases A et B, purifiées à partir du surnageant d'une culture de *Streptomyces albocinaceus* S-22. Ces dernières montrent un important potentiel antifongique qui se traduit par une lyse cellulaire (El-Sayed et al., 2000). L'endochitinase isolée par Shekhar et al. (Shekhar et al., 2006), à partir de *Streptomyces violaceusniger* XL-2 est une protéine de 28,25 kDa, cette enzyme montre une activité de biocontrôle contre les mycètes cellulolytiques comme *Phanerochaete chrysosporium*, seulement en présence de chitine comme source de carbone dans le milieu de culture. Actuellement, des travaux portent sur l'isolement du gène de l'endochitinase de *S. violaceusniger* XL-2 pour être cloné dans un vecteur adéquat afin d'optimiser la production de cette enzyme. Plusieurs gènes codant pour les chitinases ont été clonés à partir de *Streptomyces* sp. Ces dernières ont plusieurs applications dans divers domaines (Miyashita et al., 1991; Blaak et al., 1993; Fujii et Miyashita, 1993).

3. Le genre *Micromonospora*

3.1.Morphologie

Morphologiquement, le genre *Micromonospora* est caractérisé par des hyphes septés bien développés et ramifiés, d'un diamètre moyen de 0,5 µm. Les spores non mobiles sont généralement portées seules et sont sessiles. Les hyphes aériens sont généralement absents (Kawamoto, 1989). Sur un milieu gélosé, la plupart des espèces de *Micromonospora* produisent des colonies initialement orange, devenant de plus en plus foncées, accompagnées de la production de spores (Mullins, 1993)(Figure 7). Les colonies plus âgées ont tendance à être recouvertes d'une masse de spores muqueuse noire, brun-noire ou vert-noire (Kawamoto, 1989). Les spores de *Micromonospora* se présentent souvent en grappes denses et peuvent être produites dans des zones distinctes de la surface ou complètement noyées dans le substrat. Elles sont hydrophiles, hautement résistant au traitement thermique et à différents agents chimiques, et peut survivre des années dans l'environnement (Cross, 1981b).



Figure 7. Aspect macroscopique de la souche *micromonospora echinospora* c33.

Le genre *Micromonospora* est bien défini en termes de critères morphologiques, chimiotaxonomiques et phylogénétiques (Kroppenstedt, 1985 ; Kawamoto, 1989; Koch et *al.*, 1996a), (Tableau 6).

**Tableau 6. Caractéristiques différentielles du genre *micromonospora*.
(Kroppenstedt, 1985; Kawamoto, 1989; Koch et al., 1996a).**

Caractéristiques	<i>Micromonospora</i>
Uni spores	+
Sporanges	-
Chaînes de spores	-
Spores mobiles	-
Besoin en sel	-

3.2. Écologie

Les souches de *Micromonospora*, peuvent être isolées facilement à partir du sol et des milieux aquatiques. Elles sont très fréquentes dans les sols neutres et alcalins (Jensen, 1930; Vobis, 1992).

Il a été largement admis que les principaux habitats des *Micromonospora* sont des écosystèmes aquatiques (Cross, 1981a; Goodfellow et Haynes, 1984). Notamment dans les zones côtières (Watson et Williams, 1974), les marins salés (Hunter et al., 1981), les sédiments d'eaux profondes (Weyland, 1969, 1981), dans les échantillons d'eau de ruisseaux et de rivières (Burman, 1973).

Les *Micromonospora* font également partie des communautés actinomycétales prédominantes dans les litières végétales, les lichens, les racines et la rhizosphère de certaines plantes (Zenova et al., 1994; González et al., 2005).

3.3.Cycle de vie

Il existe trois processus physiologiques majeurs dans le cycle de vie *Micromonospora* : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort (Danilenko et al., 2005).

Sur milieu solide, les spores d'actinobactéries produisent un ou plusieurs mycéliums de substrat ramifiés et non fragmentés et chaque spore va germer et se développer par croissance apicale (Jakimowicz, 2007). Le mycélium aérien émerge par la réutilisation de composés assimilés par le mycélium végétatif ainsi que les composés stockés obtenus de la lyse du

mycélium du substrat. Le mycélium aérien est formé d'hyphes dressées sur le mycelium du substrat, ces hyphes sont peu épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat et ils sont généralement pigmentés (Horinouchi, 2002 ; Prescott et *al.*, 2003 ; Ou et *al.*, 2008).

3.4. Métabolisme secondaire

Les *Micromonosporae*, après les Streptomycètes, sont l'un des producteurs les plus prolifiques de métabolites secondaires bioactifs; elles produisent une très grande diversité de structures chimiques. Bérdy (2005) a cité plus de 740 souches de *Micromonospora* comme producteurs de différents métabolites bioactifs (Bérdy, 2005).

Ce sont des producteurs particulièrement importants d'aminosides (fortimicines, gentamicines, kanamycine, mannosidostreptomycine, de la néomycine,...etc.), d'oligosaccharides (antlermicine et everninomicine), d'antibiotiques anti-tumoraux énediynes (calicheamycine) et d'antibiotiques peptidiques (actinomycine, bottromycine, microsporine et thiocoraline) (Wagman et Weinstein, 1980; Vobis, 1992 ; Horan, 1999), ainsi que d'enzymes (la cellulase, la xylanase, la pectinase et la chitinase) (Hirsch et Valdés , 2010 ; Alonso-Vega et *al.*, 2012).

3.5. Production de chitinase par *Micromonospora*

Les actinobactéries producteurs de chitinase les plus puissants trouvés sont les : *Streptomyces*, *Kitasatospora*, *Saccharopolyspora*, *Nocardioïdes*, *Herbidospora*, *Micromonospora*, *Microbispora* et *Actinoplanes*. Les *Micromonospora* sont fréquemment détectés dans des environnements extrêmes et pollués (Nawani et Kapadnis, 2003). Dans une seconde étude, Williamson et al. (2000), utilisant des amorces de PCR conçues pour identifier une large gamme de gènes de chitinase, ont découvert que des séquences de chitinase du groupe A étaient présentes dans six espèces différentes de *Micromonospora* (Williamson et *al.*, 2000). Des résultats de l'analyse du génome de quelques souches de *Micromonospora* ont révélé qu'elles possèdent la cellulase, la xylanase, la pectinase et la chitinase respectivement. (Hirsch et Valdés, 2010 ; Alonso-Vega et *al.*, 2012).

CHAPITRE 4
PROPRIETES DES
CHITINASES
BACTERIENNES

1. Généralité

Au cours des dernières années, de nombreuses bactéries productrices de chitinase ont été isolées, purifiées et caractérisées ; la plupart d'entre elles font partie des genres *Serratia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Paenibacillus*, *Erwinia*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* et *Micromonospora* dans laquelle beaucoup d'entre elles produiraient plusieurs enzymes chitinolytiques différentes (Bhattacharya et al., 2007; Stoykov et al., 2015).

Les bactéries chitinolytiques produisent généralement plusieurs chitinases dérivées de différents gènes. La plupart d'entre elles sont généralement des chitinases de la famille GH18, alors que certaines bactéries comme les espèces de *Streptomyces* produisent des chitinases appartenant à la famille GH19 en addition aux chitinases de la famille GH18. D'autres bactéries produisent les β -N-acétyl-hexosaminidases qui sont incluses dans la famille GH 20.

Les bactéries chitinolytiques sont présentes dans différents milieux dans des conditions aérobiques et anaérobiques et comprennent seulement 4 % des bactéries hétérotrophes totales (Swiontek Brzezinska et al., 2014). Elles produisent des chitinases pour accomplir de nombreuses fonctions, principalement des fonctions métaboliques. Elles hydrolysent la chitine afin de fournir de l'azote et du carbone comme source de nutriments, d'énergie et de précurseurs. Les chitinases jouent également un rôle dans la pathogenèse bactérienne et le parasitisme de tout hôte contenant de la chitine. Swiontek Brzezinska et al. (2010) ont signalé que les microorganismes chitinolytiques isolés du sol sont habituellement plus actifs que les bactéries chitinolytiques isolées de l'eau et les sédiments de fond.

2. Propriétés physicochimiques

Les chitinases bactériennes varient largement dans leurs propriétés. Elles ont une gamme de taille de ~20-60 kDa. Elles sont actives dans une large gamme de températures et de pH selon la source des bactéries dont elles ont été isolées (Tableau 7).

2.1. pH Optimum

Le pH optimal des chitinases varie de 3,5 à 10,0 pour les microorganismes. Par exemple, la chitinase thermostable de *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-52075 a un pH optimal élevé de l'ordre de 8,0 à 10,0 tandis que la chitinase isolée de *Stenotrophomonas maltophilia* C3 a un pH optimal de 4,5 à 5,0. Cependant, le pH optimal semble dépendre du

substrat utilisé (Koga et al., 1997). Une Chitinase de *Micromonospora chalybeata* a montré un pH optimal de 6 (Gacto, 2000).

2.2. Température optimale

La température optimale des chitinases varie de 30 à 80°C (Tableau 7). Par exemple, l'endochitinase de *Streptomyces violaceusniger* et la chitinase thermostable de *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-52075 ont des températures optimales respectivement de 28 °C et ~80°C. Les chitinases présentent également une large gamme de points isoélectriques (pI ~4.5-8.5) (Bhattacharya et al., 2007).

3. Inhibiteurs et activateurs des chitinases

L'activité des enzymes chitinolytiques microbiennes peut être inhibée ou stabilisée par la présence de différents ions métalliques tels que Hg^{2+} , Ag^{+} et Cu^{+2} (Tableau 7).

L'allosamidine, un inhibiteur puissant produit par *Streptomyces* sp., a d'abord été signalé comme un inhibiteur spécifique et compétitif contre la chitinase des insectes avec une valeur K_i de 0,1 μ M. Elle a une structure similaire à celle du substrat intermédiaire; un cycle oxazoline qui peut se former entre l'oxygène carbonyle du groupe N-acétyl et le C-1 de la N-acétylglucosamine pendant l'hydrolyse (Koga et al., 1987). L'allosamidine et ses dérivés inhibent certaines chitinases de microorganismes tels que *Piromyces communis*, *Streptomyces* sp. et *Streptomyces olivaceoviridis* (Koga et al., 1999). Par ailleurs, il est intéressant de noter que *Streptomyces* sp. produit deux types de chitinases : l'une est sensible à l'allosamidine et l'autre est résistante. Par conséquent, l'allosamidine et ses dérivés inhibent uniquement les chitinases appartenant à la famille GH 18 sans en faire autant pour la famille GH 19 (Wang et al., 1993).

Pour les ions Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , ils peuvent jouer le rôle d'inhibiteur ou d'amplificateur selon le type de chitinase (Koga et al., 1999, Swiontek Brzezinska et al., 2014).

Tableau 7. Caractéristiques de quelques chitinases microbiennes. (Swiontek Brzezinska et al., 2014)

Microorganisme	Type d'enzyme	PM (kDa)	Temps (°C)	pH	inhibiteurs	Activateurs
<i>Serratia sp.KCK</i>	Exochitinase	57	40	5-10	Pb ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺ , Mg ²⁺	-
<i>Pseudomonas sp. TKU015</i>	-	68,30	50	5-7	Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , EDTA	Zn ²⁺ , SDS, Tween 40, Triton X-100
<i>Bacillus sp 13.26</i>	-	60	60	7-8	Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Ca ²⁺	Mg ²⁺ , Ni ²⁺
<i>Bacillus Licheniformis</i>	-		50-70	5-6	-	Ca ²⁺
<i>Bacillus brevis</i>	Exochitinase	85	60	8	Ag ⁺	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Exochitinase	52	40-50	5-7	Hg ²⁺ , Cu ²⁺	Ca ²⁺ , Mg ²⁺
<i>Sanguibacter antarcticus KOPRI 21702T</i>	Exochitinase	55	30-40	7.6	-	Cu ²⁺ , Ca ²⁺ , Ba ²⁺
<i>Streptomyces sp. DA11</i>	-	34	50	8	Fe ²⁺ , Ba ²⁺ , EDTA, EGTA, SDS, urée	Mn ²⁺ , Cu ²⁺ , Mg ²⁺
<i>Streptomyces halstedii AJ 7</i>	-	55	50	7	Hg ²⁺ , Ni ²⁺ , PB ²⁺	Co ²⁺
<i>Streptomyces roseolus DH</i>	GH18	40	60	6-8	Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺	Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Mg ²⁺
<i>Streptomyces Venezuela P10</i>	-	66	30-40	6-8	-	-
<i>Streptomyces aureofaciens CMUAc130</i>	-	40	30-40	6.5-7	Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Ni ²⁺	Mg ²⁺
<i>Penicillium sp. LYG0704</i>	-	47	40	5	Fe ²⁺ , Hg ²⁺	Mg ²⁺ , Mo ²⁺
<i>Trichoderma atroviride PTCC5220</i>	-	42	40	5	-	-
<i>Thermomyces lanuginosus SY2</i>	-	48	55	4.5	Fe ²⁺ , Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , EDTA	Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺

4. Spécificité du Substrat

Les chitinases microbiennes ont des affinités variables pour différents substrats chitineux, y compris la chitine cristalline, comme la α -chitine, β -Chitine et γ -chitine. Elles se lient également différemment à d'autres substrats moins cristallins comme le chitosane, la chitine colloïdale ou les analogues synthétiques des N-acétylchitoooligosaccharides. Ces différences ont été associées aux modules de liaison aux substrats. Les chitinases ayant un CBD (Chitin Binding Domain) et des résidus aromatiques sont plus efficaces pour dégrader la chitine cristalline tandis que celles qui n'en ont pas sont préférables aux formes moins cristallines. De plus, la longueur et la profondeur des fentes catalytiques et des sites de liaison au substrat dans le domaine catalytique semblent contribuer largement à la spécificité du substrat (Oyeleye et Normi, 2018).

Par exemple, l'activité spécifique de *Paenibacillus barengoltzii* a été analysée contre la chitine colloïdale et la chitine en poudre. Une activité spécifique élevée a été enregistrée contre les colloïdes tandis qu'une activité plus faible a été observée contre la chitine en poudre. Un autre exemple est celui des différentes chitinases de *S. marcescens*, la chitinase A et la chitinase B sont capables d'accommoder des chaînes chitoooligomères plus longues, contrairement à la chitinase C qui a seulement une faible efficacité catalytique vers des substrats de courte longueur (Oyeleye et Normi, 2018).

CHAPITRE 5

METHODES

D'OPTIMISATION

Le présent chapitre explore les différentes méthodes et techniques d'optimisation appliquées dans le processus de fermentation afin de pouvoir choisir une approche d'optimisation adéquate.

Les processus d'optimisation sont divisés en systèmes ouverts et fermés. Les systèmes fermés analysent un nombre constant et des types fixes de paramètres de composants. C'est une stratégie simple, mais son inconvénient est qu'elle pourrait négliger d'éventuels paramètres/composants bénéfiques. Les systèmes ouverts analysent n'importe quel nombre et type de composants/paramètres. Leur avantage est qu'il ne suppose pas quels composants/paramètres sont les meilleurs pour le processus de fermentation. La méthode idéale serait de commencer par un système ouvert, de sélectionner les meilleurs composants/paramètres pour optimiser le processus de fermentation puis de passer au système fermé (Kennedy et Krouse, 1999 ; Bihbu et *al.*, 2007).

1. Méthodes classiques d'optimisation des milieux

Ce sont les méthodes simples classiques qui ne se reposent sur aucun outil statistique, leur avantage commun est le fait qu'elles ne nécessitent aucune compétence mathématique, mais leur inconvénient est relié à leur fiabilité et leur dépense de temps et de ressources (tableau 8).

Tableau 8. Méthodes classiques d'optimisation.

Système	Méthode	Principe	Avantage	Inconvénients
système fermé	Imitation biologique	le milieu est optimisé en fonction de la composition élémentaire des micro-organismes et du rendement de croissance (dépend de la stratégie du bilan massique)	Estimer les niveaux de micro et macro éléments nécessaires à la croissance optimale des microorganismes.	le coût et la consommation de temps, ne tient pas compte de l'interaction des composants
	One-factor-at-a-time	Changer une variable indépendante tout en fixant les autres composants	simple, facile et démontrer clairement les effets individuels de chaque composant	ignorer l'interaction entre les composants, ce qui demande beaucoup de temps et d'argent
système ouvert	Remplacement d'un composant	remplacer un composant du milieu par un nouveau au même niveau d'incorporation et les comparer.	Adéquat pour cribler différentes sources de carbone, d'azote et d'autres sources afin de les optimiser.	ne tient pas compte des interactions entre les composantes
	Emprunts	l'utilisation et l'analyse de la littérature étudiant le même genre, la même espèce ou la même souche.	Simple, facile, ne nécessite pas de compétences en mathématiques	Choix d'options étendues

2. Méthodes d'optimisation statistique

L'avancement des techniques statistiques améliore l'efficacité du processus d'optimisation, réduit le temps et le coût du travail, contribuant ainsi à l'économie du processus. L'utilisation d'un plan expérimental réduit le nombre d'expériences nécessaires pour obtenir une optimisation fiable du procédé (Elibol, 2004). Les plans d'expériences (DOE: Design Of Experiments) améliorent considérablement l'optimisation par rapport à l'utilisation des techniques d'un facteur à la fois (OFAT) (Silveira et *al.*, 1991). Le processus d'optimisation est assemblé à l'aide des plans d'expériences et des techniques d'optimisation; les plans d'expériences spécifient les variables du milieu à tester, en indiquant les modèles harmonisés pour organiser les tests et en définissant le nombre de répliques, alors que les techniques d'optimisation utilisent les données expérimentales obtenues pour estimer les modèles mathématiques et améliorer la composition des milieux.

2.1. Plan d'expériences

Le plan expérimental est un plan d'étude dont les objectifs sont définis. Les techniques statistiques modernes s'appuient sur des résultats expérimentaux pour évaluer les effets des variables. Par conséquent, les expériences doivent être planifiées correctement avec un échantillon de taille suffisante pour obtenir des données adéquates qui peuvent répondre efficacement à l'objectif de l'étude. Ces techniques sont appelées DOE (Design of Experiments). Ce sont des systèmes d'optimisation fermés. Au cours des dernières décennies, plusieurs DOE ont été utilisés, notamment:

2.1.1. Plan de Plackett-Burman (PBD)

Cette méthode permet une élimination précoce des facteurs non contributifs du milieu. Elle a été introduite pour la première fois en 1946 par R. L. Plackett et J.P. Burman comme une solution permettant de déterminer les principaux effets avec plus de précision dans tout processus. Il s'agit d'un plan à deux niveaux qui détecte les effets principaux tout en négligeant toutes les autres interactions qui sont supposées être omises par les effets majeurs. En ignorant les interactions, l'effet observé des facteurs peut être comparé (Vaidya et *al.*, 2003).

Le PBD peut être utilisé pour cribler "n" variables par seulement 'n+1' nombre d'expériences (Plackett et Burman, 1946). Dans ce plan, chaque variable étudiée est représentée en deux niveaux, haut (H : High) et bas (L: Low). Chaque ligne horizontale

représente un essai et chaque colonne verticale représente l'un ou l'autre des deux niveaux, selon les résultats, l'effet de chaque variable peut être déterminé par l'équation suivante:

$$E_{X1} = 2(\sum Y_{X1H} - \sum Y_{X1L})/N$$

Où, E_{X1} = Effet de la variable; Y_{X1H} = rendement des essais ayant une concentration élevée de variable; Y_{X1L} = des essais ayant une faible concentration de la variable et N = nombre total des essais.

Le PBD évalue l'importance relative de diverses variables du milieu pour une production spécifique. Son utilisation diminue le nombre total d'expériences (Adinarayana et Ellaiah, 2002), et crible les variables avec effet majeur.

L'inconvénient du PBD est l'analyse trompeuse de l'effet des facteurs liés à l'existence de l'interaction des facteurs. Le PBD ne doit être utilisé que lorsque les facteurs n'ont pas d'interaction ou n'ont que des effets additifs sur le rendement. Néanmoins, dans le DOE, les PBD peuvent servir de point de départ pour déterminer la liste des expériences de poursuite. C'est pourquoi on les appelle habituellement des " modèles de criblage " parce qu'ils aident à éliminer les facteurs non contributifs (Singh et al., 2017).

2.1.2. Plan de Box Behnken

Le modèle Box-Behnken est une alternative au conception composée centrale (CCD : central composite design), il est indépendant du modèle quadratique, qui ne contient pas de modèle factoriel ou de plan factoriel fractionnaire (Ferreira et al., 2007). Dans cette méthode, les combinaisons de traitement se situent au milieu des bords de l'espace de traitement et au centre et le nombre d'expériences (N) requises pour le développement du plan est défini comme $N=2k(k-1) + C_0$, (où k est le nombre de facteurs et C_0 est le nombre de points centraux). Les modèles de Box Behnken sont rotatifs (ou presque rotatifs) et nécessitent 3 niveaux de chaque facteur. Ils ont une capacité limitée de blocage orthogonal par rapport aux plans des composites centrés (Box et Behnken, 1960).

Le plan Box-Behnken est une bonne méthodologie de conception de surface de réponse car il permet : l'estimation des paramètres du modèle quadratique, la construction de plans séquentiels, la détection des défauts d'ajustement du modèle, et l'utilisation des blocs. Un autre avantage de plan Box-Behnken est qu'il ne contient pas de combinaisons pour lesquelles

tous les facteurs sont simultanément à leur niveau le plus élevé ou le plus bas. Ces plans sont donc utiles pour éviter les expériences réalisées dans des conditions extrêmes, pour lesquelles les résultats risqueraient d'être inadaptés (Singh et *al.*, 2017).

3. Techniques d'optimisation

Méthodologie de surface de réponse (Response surface methodology (RSM))

La RSM est une méthode développée par Box et Wilson (1951), elle utilise des plans factoriels pour optimiser les processus de production des métabolites désirés et améliorer la performance des différents processus microbiens, comme la biotransformation et la fermentation.

C'est est une approche mathématique fiable et efficace qui comprend des plans d'expériences statistiques et l'analyse de régression multiple, pour rechercher la meilleure formulation sous un ensemble d'équations contraintes (Box et Wilson, 1951). La RSM a souvent été utilisée pour optimiser les variables de formulation et le processus de fermentation (Singh et *al.*, 2017). Vaidya et *al.* (2003) ont utilisé la RSM pour la production de chitinase à partir d'*Alealigenes xylosoxydans* et ont constaté une augmentation de production de 1,4 fois.

La RSM utilise plusieurs phases d'optimisation et peut être réalisée en trois étapes de base : des expériences conçues pour le criblage des facteurs, suivies de la trajectoire de montée / descente la plus raide, et enfin le modèle de régression quadratique est ajusté et optimisé par la méthode d'analyse de régression canonique. L'un des apports importants du RSM est la représentation du rendement, sous la forme d'un graphique de surface. Il peut fournir des réponses multiples en même temps en considérant les interactions entre les variables, ce qui est le plus important pour la conception et l'optimisation des processus. Comme les relations théoriques entre les variables indépendantes et dépendantes ne sont pas claires, l'analyse de régression multiple peut être appliquée pour prédire les variables dépendantes sur la base d'une équation du second ordre (Box et Wilson, 1951):

$$Y(X) = a_0 + \sum_{i=0}^N a_i X_i + \sum_{i<j}^N a_{ij} X_i X_j + \sum_{i=0}^N a_{ii} X_i^2$$

Où, Y = réponse prévue, a_0 = coefficient d'interception, $a_i X_i$ = termes linéaires, $a_{ij} X_i X_j$ = termes d'interaction et $a_{ii} X_i^2$ = termes carrés.

Le modèle RSM est simple, efficace, moins long et capable de prédire l'optimisation de divers processus de production de métabolites. Il est utilisé pour déterminer les niveaux de facteurs qui peuvent simultanément satisfaire un ensemble de spécifications souhaitées. Cette méthode nous aide à déterminer comment une réponse spécifique est affectée par des changements dans le niveau des facteurs par rapport aux niveaux d'intérêt spécifiés et à obtenir une compréhension quantitative du comportement du système dans la région testée. Avec l'aide de RSM, nous pouvons prédire les propriétés du produit dans toute la région, même pour des combinaisons de facteurs qui ne fonctionnent pas réellement et trouver les conditions pour la stabilité du procédé (Singh et *al.*, 2017).

Pour l'optimisation, le RSM est généralement combiné à un plan expérimental. Il a été combiné avec le PBD dans de nombreuses études avec l'objectif d'optimiser le milieu pour améliorer la production de métabolites (Singh et *al.*, 2017). Ces études ont rapporté une amélioration notable du rendement. Dubey et *al.* (2010) ont également combiné le RSM et le CCD pour optimiser les trois variables d'extraction (température, pH et temps de traitement) afin d'améliorer la performance de la biotransformation de la colchicine en colchicine 3-déméthylée. Ils ont souligné l'efficacité de ces outils.

Malgré l'utilisation très répandue de RSM, elle présente certaines limites, par exemple, la prédiction des réponses basée sur l'équation polynomiale du deuxième ordre est souvent limitée à de faibles niveaux et entraîne une mauvaise estimation des formulations optimales. Une autre limitation importante est la complexité métabolique des micro-organismes. Lorsqu'un grand nombre de variables est en jeu, l'élaboration de modèles rigoureux pour un système de réaction biologique donné sur une base physique et chimique demeure un défi critique. De plus, il est assez compliqué d'étudier les interactions de plus de cinq variables et les grandes variations dans les facteurs qui peuvent donner des résultats trompeurs, peut-être en raison d'erreurs, de biais ou de l'absence de reproductibilité (Singh et *al.*, 2017).

PARTIE

EXPERIMENTALE

1. Préparation de chitine colloïdale

La chitine colloïdale est préparée selon le protocole modifié de Murthy et Bleakley, Dans un bécher de 500 ml, vingt grammes de poudre de chitine sont déposés, puis 300 ml d'HCl concentré ~ 12M sont ajoutés lentement sous agitation continue pendant 60 min sous une hotte chimique à température ambiante. La suspension est ensuite versée dans un erlenmeyer qui contient 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, dans un entonnoir de Büchner (90 mm). L'eau du robinet (pH 6,5~) est ensuite passées abondamment à travers la chitine colloïdale retenue dans le filtre, afin de neutraliser le pH. La chitine colloïdale obtenue est séchée à température ambiante et re-suspendue dans de l'eau distillée à raison de 20% (P/V), stérilisée, puis conservée à 4 °C.

2. Préparation de l'inoculum

La souche étudiée a été isolée par le Dr. Gasmi, à partir d'un site de sol semi-aride de la région de Laghouat (33°N, 3°E, Algérie). L'identification moléculaire de la souche par séquençage du gène de l'ADNr 16S, a permis de l'assigner au genre *Micromonospora* (GenBank accession no. LN864583) (Gasmi et al., 2019).

Une suspension sporale de la souche *Micromonospora echinospora* C33 est préparée à partir d'une culture sur milieu gélosé ISP-2. 10 ml d'eau distillée stérile 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 stérile et la DO₆₀₀ est ajustée à 0,8 (ce qui correspond à une suspension de 10⁷ spores/ml).

3. Mise en évidence de l'activité chitinolytique

La mise en évidence de l'activité chitinolytique chez *Micromonospora echinispora* C33 consiste à déposer 20 µl de l'inoculum préparé sur la surface du milieu MCC (Annexes n° 1), La production de chitinase extracellulaire se traduit par l'apparition de zones claires autour des colonies.

4. Optimisation de la production de la chitinase par la méthode des plans d'expériences

L'optimisation des milieux se faisait précédemment selon la méthode classique qui consiste à changer une variable indépendante tout en fixant toutes les autres à un certain niveau. Cette méthode prend beaucoup de temps et d'argent pour étudier un grand nombre de variables. Elle n'est pas aussi fiable pour décrire l'effet combiné de tous les facteurs en cause (Monreal et Reese, 1969). Cependant les plans d'expériences statistiques peuvent effectivement éliminer les limites d'une optimisation à facteur unique (Gohel et *al.*, 2006).

Cette étape consiste à évaluer le taux de chitinase produite par la souche *Micromonospora echinospora* C33 en fonction des différentes conditions du milieu de culture. Cette dernière a été choisie par rapport à des études menées préalablement, pour son pouvoir antagoniste contre *Botrytis cinerea* (un champignon phytopathogène), sa tolérance aux hautes températures (45 °C) et son activité chitinolytique élevée à 40 °C. 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 tels que : le glucose, le galactose, la chitine colloïdale, la peptone, l'extrait de levure, le KH_2PO_4 , le MgSO_4 et des paramètres de milieu : le pH et la température.

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 significatif 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 Box -Behnken (1960) couplé à la méthodologie des surfaces de réponse (RSM).

4.1. Conditions de fermentation

Les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu de production. Après une stérilisation à 120 °C pendant 20 min, les milieux sontensemencés avec 1% (v/v) de la suspension sporale préalablement préparée de *Micromonospora echinospora* C33. Ensuite, les cultures sont incubées dans 2 incubateurs, selon les différentes températures utilisées lors des essais et agitées à 150 rpm pendant 7 jours.

Après centrifugation (x5 000 g, 4 °C, pendant 45 min), les surnageants sont réservés au dosage de l'activité chitinolytique.

4.2. Procédure d'optimisation

L'optimisation des constituants du milieu de fermentation pour la production de chitinase par *Micromonospora echinospora* C33 a été réalisée en deux étapes.

4.2.1. Plan de Plackett-Burman

Le plan d'expériences de Plackett et Burman est une matrice orthogonale générée par la méthode de Raymond Paley (Plackett et Burman, 1946). C'est un plan factoriel fractionnaire à deux niveaux avec -1 se rapportant au niveau bas du facteur et +1 se rapportant au niveau élevé du facteur. Cette méthode convient lorsque plus de cinq variables indépendantes doivent être étudiées. Elle permet l'évaluation de n variables par n+1 expériences. L'objectif de cette méthode est de cribler les facteurs importants qui ont une influence significative sur le processus de fermentation (naveena et *al.*, 2005).

Dans notre étude, le plan expérimental est établi d'après les matrices de Plackett-Burman où N=12, soit 11 facteurs et 12 expériences, auxquelles s'ajoutent 4 réplifications au centre du domaine qui servent à identifier les erreurs expérimentales (Tableau 9) (Plackett et Burman, 1946). Le tableau 10 représente les différents niveaux des facteurs étudiés.

Tableau 9. La matrice de Plackett-Burman pour l'étude de 11 variables avec 16 expériences.

Ordre	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
2	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
3	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
4	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
7	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
8	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
9	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
10	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
11	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
12	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 10. Les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett-Burman.

Les facteurs	-1	0	1
X1=Glucose (g/l)	0	2.5	5
X2=Galactose (g/l)	0	2.5	5
X3=NaCl (g/l)	5	7.5	10
X4= carapace de crevette (g/l)	0	10	20
X5 =Chitine colloïdal %	5	7.5	10
X6=Peptone (g/l)	10	12.5	15
X7=E.levure (g/l)	0	0.75	1.5
X8=KH₂PO₄ (g/l)	0.5	0.75	1
X9=MgSO₄ (g/l)	0	0.3	0.6
X10=pH	7	8	9
X11=T°	30	35	40

Dans ce plan, on suppose que les principaux facteurs n'ont pas d'interactions et qu'un modèle de régression multiple de premier ordre est approprié: $Y = \beta_0 + \sum_1^k x_i \beta_i$. Auxquels Y est la fonction de réponse (production de chitinase présenté par l'activité) et β_i le coefficient de régression.

L'effet de chaque variable peut être déterminé par l'équation suivante:

$E_{Xi} = 2(\sum Y_{XiH} - \sum Y_{XiL})/N$, auxquels, E_{Xi} = Effet de la variable; Y_{XiH} et Y_{XiL} = production de chitinase à partir des essais où la variable testée était présente respectivement à des niveaux élevés et faibles et N = nombre total des essais.

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.

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \varepsilon$$

\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.

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 $(1 - \alpha) \geq 95\%$.

4.2.2. Plan Box-Behnken

Après avoir utilisé le PBD pour sélectionner les facteurs les plus importants influençant la production de chitinase par *Micromonospora echinospora* C33, la méthodologie de surface de réponse Box-Behnken a été utilisée pour déterminer les niveaux optimaux de ces variables. Les variables choisies (chitine colloïdale, peptone, galactose) ont été étudiées à trois concentrations différentes codées -1, 0 et 1 (Tableau 12), et la matrice expérimentale des trois facteurs a été produite selon le modèle de Box-Behnken. Un nombre total de 15 expériences comprenant 12 points factoriels et 3 répétitions au point central ont été réalisées (Tableau 11)

Tableau 11. Plan d'expérience BOX-Behnken utilisé pour l'étude des facteurs.

	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Tableau 12. Les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Box-Behnken.

Les facteurs	-1	0	+1
X3=Chitine colloïdal %	5	7.5	10
X2=Peptone (g/l)	10	12.5	15
X1=Galactose (g/l)	0	2.5	5

L'activité prévue de la chitinase a été calculée à l'aide de l'équation polynomiale de deuxième ordre suivante : $Y(X) = a_0 + \sum_{i=1}^N a_i X_i + \sum_{i < j}^N a_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^N a_{ii} X_i^2$

Où Y = réponse prévue, a_0 = coefficient d'interception, $a_i X_i$ = termes linéaires, $a_{ij} X_i X_j$ = termes d'interaction et $a_{ii} X_i^2$ = termes carrés.

L'analyse statistique et le tracé des graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Minitab (version 17). L'analyse de la variance par le test de Fisher a été utilisée pour valider le modèle choisi et évaluer l'effet des variables indépendantes sur la réponse et les résultats significatifs ont été identifiés par une valeur $p < 0,05$. Le coefficient de corrélation multiple (R^2) et le R^2 ajusté ont été utilisés comme indicateurs de qualité pour évaluer l'aptitude de l'équation polynomiale du deuxième ordre. Des courbes d'iso-réponses et des surfaces de réponses ont été utilisés pour démontrer la relation et l'interaction entre les variables codées et la réponse. Les points optimaux ont été déterminés en résolvant l'équation dérivée du modèle quadratique final et de la recherche par grille dans les graphes de la RSM.

4.3. Cinétique de production de chitinase

Afin de déterminer le meilleur temps de production de chitinase un erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu optimum est inoculé par 500µL de suspension sporale puis incubé dans un incubateur à 150 rpm à 30 °C pendant dix jours. Chaque 24 heures 1ml de culture est prélevé et centrifugé à 10000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique alors que le culot sert à évaluer la biomasse.

5. Purification partielle de la chitinase

Une culture est réalisée dans un erlenmeyer de 2000 ml contenant 500 ml du milieu de production optimisé (galactose : 5 g/L, chitine colloïdale : 10%, peptone 15 g/L, NaCl 7,5 g/L, extrait de levure 1,5 g/L, et KH_2PO_4 1 g/L). Après une stérilisation à 120 °C pendant 20 min, les milieux sontensemencés avec 1% (v/v) de la suspension sporale préalablement

préparée de *Micromonospora echinospora* C33. Ensuite, la culture est incubée dans un incubateur à 35 °C sous une agitation de 150 rpm pendant 7 jours.

5.1. Préparation de l'extrait brut

Après une centrifugation de milieu optimisé (5000 rpm, 15 min) le surnageant qui présente l'extrait enzymatique brut est récupéré.

La chitinase a été purifiée par trois étapes de purification selon la méthode de Mukherjee et Sen (2006), impliquant une précipitation par sulfate d'ammonium, une dialyse et une chromatographie d'affinité.

L'activité chitinolytique et les protéines totales sont mesurées après chaque étape.

5.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium

Une précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation est réalisée sur l'extrait enzymatique brut (400 ml) dans un bécher de 500 ml. La masse du sulfate d'ammonium à ajouter est déterminée selon le tableau de saturation (annexe n° 6).

Le mélange est -soumis à une faible agitation pendant 4h à 4 °C, ensuite il est soumis à une centrifugation pendant 20 min à 10000 rpm à 4 °C. Enfin, le culot résultant est dissous dans un volume minimum d'acétate de sodium (10 mM, pH 5,0) (annexe n° 7).

5.3. Dialyse

La dialyse est réalisée 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 (5 ml) sont chargées dans un boudin de dialyse (limite d'exclusion 14 kDa). Le boudin est ensuite déposé dans 1 L de tampon acétate de sodium (10 mM ; pH 5,0) à 4 °C, sous agitation. Le tampon de dialyse est renouvelé 3 fois chaque 4h.

5.4. 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 (5 000 rpm pendant 40 minutes) 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 et Sen, 2006).

La suspension a été incubée pendant 6 heures à 35 ° C sous agitation douce (90rpm) pour que les chitinases présentes puissent digérer la chitine colloïdale de la suspension. Le surnageant limpide résultant est à nouveau précipité avec 80% de sulfate d'ammonium, centrifugé et dialysé (Mukherjee et Sen, 2006).

6. Caractérisation partielle de la chitinase purifiée

6.1. 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° 7).

6.2. 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 20 °C à 70 °C.

7. Méthodes analytiques

7.1. Mesure de l'activité de chitinase

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 100 µl d'extrait enzymatique brut auquel on ajoute 1 ml de chitine colloïdale à 1% (1g de chitine dans 100ml de tampon) dans 900 µl de tampon d'acétate de sodium (50 mM, pH 5,0) (Annexe n°7). 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°2). 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 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° 2).

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

7.2. 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°3).

7.3. Mesure de la biomasse

La mesure du poids sec de la biomasse est effectuée pour déterminer la concentration cellulaire de *Micromonospora echinospora* C33 au cours de fermentation. 1 ml de bouillon de culture est prélevé et centrifugé à 10000 rmp pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot restant est dissous dans 1 ml d'eau distillée .le mélange est ensuite versé dans un papier de whatman. Le papier whatman est séché à température ambiante pendant un jour. La différence de poids est calculée puis exprimée en poids sec (mg/ml).

RESULTATS ET DISCUSSION

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

La mise en évidence de l'activité chitinolytique chez *Micromonospora echinospora* C33 a été confirmée par l'apparition de zones claires autour des colonies.

La méthode conventionnelle d'optimisation des milieux consiste à changer un paramètre à la fois tout en maintenant tous les autres constants. Cette méthode peut être très coûteuse et prendre beaucoup de temps. En outre, elle ne parvient pas à déterminer l'effet combiné de différents facteurs. Un certain nombre de plans d'expériences statistiques ont été utilisés pour résoudre ces problèmes (Lu et Mei, 2007). Parmi ceux-ci, le plan de Plackett-Burman (Plackett et Burman, 1944), en tant que plan factoriel fractionnaire à deux niveaux, est particulièrement utile dans les études de criblage en estimant les effets principaux de k variables dans seulement $k + 1$ expériences selon un modèle linéaire. Cependant, ce plan ne tient pas compte de l'interaction entre les variables. Les variables criblées par le plan de Plackett-Burman peuvent être optimisées à l'aide d'un autre plan d'expérience comme le plan de Box-Behnken couplé à des outils d'optimisation statistique et mathématique tels que la méthode des surfaces de réponse (RSM) (Myers et Montgomery, 2002 ; Tasharrofi et *al.*, 2011).

Au cours des dernières années, l'utilisation de plans d'expériences statistiques pour l'optimisation des milieux de culture a suscité beaucoup d'intérêt et plusieurs publications décrivant l'application de ces méthodes à la production de chitinase ont paru dans la littérature (Kapat et *al.*, 1996 ; Felse et Panda, 1999 ; Gohel et *al.*, 2004 ; Gohel et *al.*, 2006 ; Lopes et *al.*, 2008). Le but de cette étude était de cribler et d'optimiser les facteurs les plus importants affectant la production de chitinase par *Micromonospora echinospora* C33 à l'aide du plan de Plackett-Burman et du plan Box-Behnken couplé avec la technique de RSM. A notre connaissance, cette approche n'a pas été utilisée dans l'optimisation du milieu pour la production de chitinase par cette espèce.

1.1. Criblage des facteurs influençant la production de chitinase *Micromonospora echinospora* C33

L'effet de 11 facteurs sur l'activité chitinolytique *Micromonospora echinospora* C33 a fait l'objet d'un criblage par un plan statistique de Plackett-Burman (Tableau 9). Les facteurs utilisés ainsi que leurs valeurs réelles sont consignés dans le tableau 10.

Tableau 13. La matrice de Plackett-Burman pour l'étude de 11 variables avec 16 expériences.

X₁	X₂	X₃	X₄	X₅	X₆	X₇	X₈	X₉	X₁₀	X₁₁	Y obs	Y pré
1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0,147	0,133
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0,292	0,279
-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0,152	0,139
1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0,169	0,156
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0,203	0,190
1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,389	0,376
-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0,416	0,403
-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	0,136	0,122
-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	0,130	0,116
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	0,157	0,144
-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0,534	0,520
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,126	0,112
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,156	0,224
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,194	0,224
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,199	0,224
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,188	0,224

Le tableau 13 présente en plus de la matrice de Plackett-Burman, les valeurs expérimentales et les valeurs prédites par le modèle utilisé. L'examen du tableau 13 indique que les réponses obtenues en termes d'activité chitinolytique, estimées par la méthode DNS varient de 0,126 (essai 12) à 0,534 U/ml (essai 11). Aussi, les valeurs prédites trouvées par le modèle sont très proches de celles observées dans toute la série d'expériences. Les calculs statistiques et de régression multilinéaire sont consignés dans le tableau 14 et sont analysés en utilisant le logiciel MINITAB version 17.

1.1.1. Test de t-Student (diagramme de Pareto)

Les résultats du plan d'expérience ont également été analysés au moyen du diagramme de Pareto normalisé (Figure 8). L'effet standard est estimé pour calculer une valeur statistique *t*-Student pour chaque effet. La ligne verticale sur le diagramme (fixée à la valeur critique *t* pour un risque $\alpha = 0,05$) permet d'évaluer les effets qui sont statistiquement significatifs. Les barres, s'étendant au-delà de la ligne, correspondent aux effets qui sont statistiquement significatifs à un niveau de confiance de 95 %. Les barres sont également affichées dans l'ordre de la valeur des effets, avec les effets les plus importants en haut. Une valeur de test *t* élevée et une faible probabilité indiquaient une signification élevée (Niladevi et al., 2009).

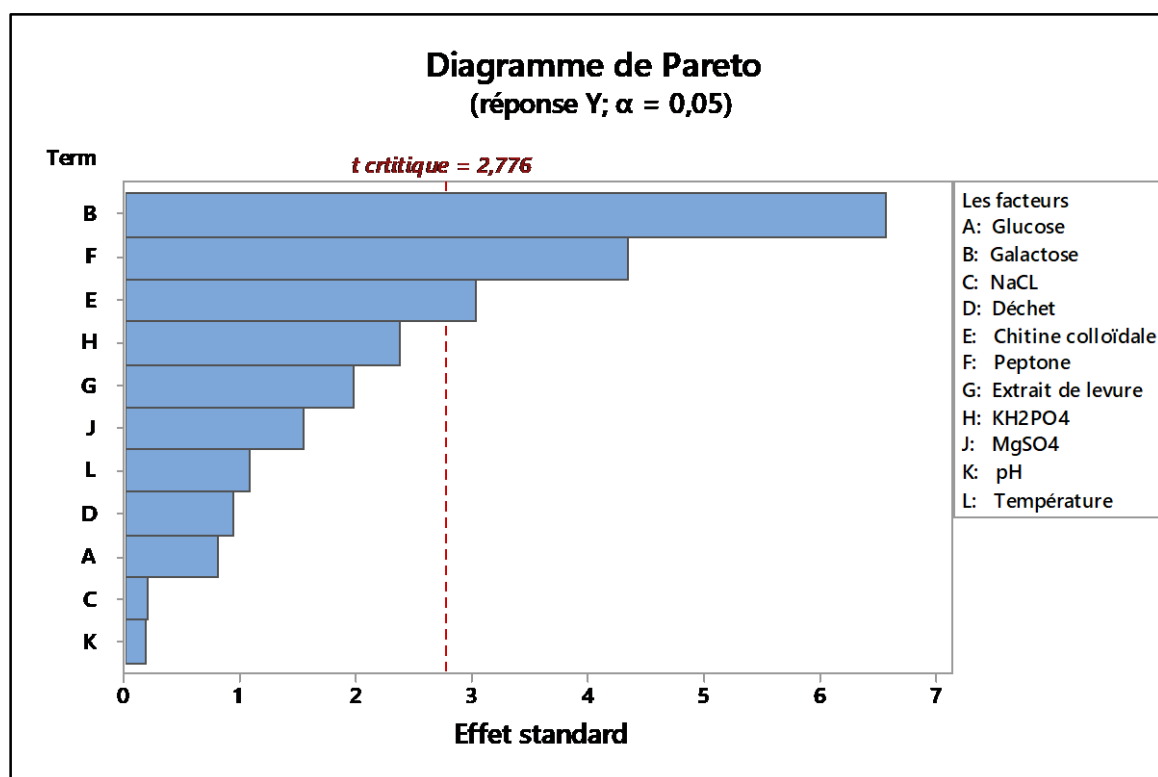


Figure 8. Diagrammes de Pareto des principaux effets obtenus à partir du plan de Plackett-Burman.

Selon la Fig. 8, le galactose; la peptone ; et la chitine colloïdale sont les facteurs ayant un effet significatifs sur la production de chitinases par *Micromonosora echinospora* C33, respectivement.

1.1.2. Analyse de variance (ANOVA)

L'analyse de variance (ANOVA) est nécessaire pour tester la signification et l'adéquation du modèle avec les résultats expérimentaux. En utilisant les valeurs de Fisher F et les probabilités p. Le tableau 14 indique l'Analyse de la variance pour la production des chitinases par *Micromonospora echinospora* C33.

Tableau 14. Analyse de la variance pour la production des chitinases par *Micromonospora echinospora* C33.

Source	degré de liberté	Somme des carrés	moyenne des carrés	valeur-F	valeur-P
Modèle Linéaire	11	0,207761	0,018887	7,82	0,031
X₁=Glucose	1	0,001525	0,001525	0,63	0,471
X₂=Galactose	1	0,104765	0,104765	43,35	0,003
X₃=NaCl	1	0,000087	0,000087	0,04	0,859
X₄= carapace de crevette	1	0,002108	0,002108	0,87	0,403
X₅=Chitine colloïdale	1	0,022251	0,022251	9,21	0,039
X₆=Peptone	1	0,045608	0,045608	18,87	0,012
X₇=Extrait de levure	1	0,009329	0,009329	3,86	0,11
X₈=KH₂PO₄	1	0,013549	0,013549	5,61	0,077
X₉=MgSO₄	1	0,005720	0,005720	2,37	0,199
X₁₀=pH	1	0,000073	0,000073	0,03	0,870
X₁₁=Température	1	0,002745	0,002745	1,14	0,347
Erreur	4	0,009667	0,002417		
Courbure	1	0,008555	0,008555	23,08	0,017
Erreur Expérimentale	3	0,001112	0,000371		
Total	15	0,217428			

$$R^2 = 95,55\%$$

Les valeurs de P inférieures à 0,05, indiquent que les facteurs sont très significatifs. Le coefficient de régression et le coefficient de détermination (R^2) montrent que notre modèle est hautement significatif ($P < 0,05$) et $R^2 = 0,9555$, ce qui indique que 95,55% 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. Le galactose ($P = 0,003$), la peptone ($P = 0,012$), la chitine colloïdale ($P = 0,039$) avec des valeurs P faibles ($P < 0,05$) sont considérés comme des facteurs significatifs qui influent fortement sur la production de

chitinase par la *Micromonospora echinospora* C33. Les résultats révélés par l'analyse de la variance sont en accord avec ceux du diagramme de Pareto.

Les microorganismes sont des producteurs potentiels d'enzymes chitinolytiques et la composition du milieu peut affecter de manière significative leur production (Souza et al., 2005). Les sources de carbone sont des facteurs importants pour la production enzymatique, en particulier lorsqu'elles jouent le rôle d'inducteur d'enzyme. La chitine colloïdale s'est révélée être un meilleur substrat pour la production de chitinase chez *Microbispora* (Nawani et al., 2002). Andronopoulou et Vorgias (2004) précédemment ont signalé que la chitine colloïdale était la meilleure source de chitine pour la production de chitinase par *Thermococcus chitonophagus* (Andronopoulou et Vorgias, 2004). 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 et Reese, 1969). Les sources de carbone autres que la chitine telle que le glucose, ne sont pas significatives pour augmenter la production de chitinase par rapport à la chitine (Ridout et al., 1988; Ulhoa et Peberdy, 1991; Gupta et al., 1995). ce qui est en accord avec nos résultats. Tsujibo et al. ont observé que la production de chitinase chez *Streptomyces thermoviolaceus* était pratiquement indétectable lorsque du glucose était ajouté au milieu de culture, même en présence de chitine (Tsujibo et al., 1999). Des résultats similaires ont également été observés avec la chitinase produite par *Alcaligenes xylosoxydans*, dans laquelle les niveaux les plus élevés de chitinase étaient détectés lorsque la chitine était utilisée comme source de carbone, mais lorsque le glucose était utilisé la production était nettement affectée (Ulhoa et peberdy, 1991).

Les sources d'azote peuvent aussi affecter la production des chitinases, dans notre étude, l'ajout de peptone au milieu de culture a un effet sur la production des chitinases. , son effet est positif et significatif. Vaidya et al., (2001) ont rapporté par optimisation paramétrique que les sources d'azote inorganiques n'étaient pas significatives, alors que les sources d'azote organiques telles que la peptone étaient significatives. Vaidya et al., 2001 et Gohel et al. (2007) ont rapporté un effet significatif de la peptone sur la production de chitinase par *Pantoea dispersa* (Gohel and Naseby, 2007). Tous ces résultats sont conformes aux nôtres. Par contre Singh et al. 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. (2008) chez *Streptomyces* sp. Da11 (Han et al., 2009). Pour la deuxième source qui est l'extrait de levure n'a pas d'effet

significatif sur la production de chitinase. Nawani et Kapadnis ont indiqué que la diminution de la concentration d'extrait de levure peut favoriser la production de chitinase (Nawani et Kapadnis, 2005), chez *Streptomyces* sp. La diminution de la concentration d'extrait de levure et de sulfate d'ammonium peut favoriser la production de chitinase (Nawani et Kapadnis, 2005).

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 joue un rôle régulateur important dans la synthèse des métabolites primaires et secondaires chez les microorganismes (Dean, 1972). Nos résultats ont montré que la concentration de PO_4 (KH_2PO_4) régule positivement la production des chitinases ce qui est en accord avec les résultats de Gasmi et al. 2017 pour la production de chitinase chez *Streptomyces griseorubens*, mais dans notre cas sans un effet significatif. Le MgSO_4 influe également sur la production de chitinase chez *Streptomyces* sp. (Han et al., 2008). Ce qui n'est pas en accord avec nos résultats. Le (KH_2PO_4) et (MgSO_4) ont des effets non significatif sur la production de chitinase par *Chitolyticbacter meiyuanensis*, *Paenibacillus sabina* et *Pseudomonas fluorescens* (Hao et al., 2012; Pate et al., 2007) ce qui en accord avec nos résultats.

Compte tenu des résultats obtenus à l'aide du logiciel MINITAB 17, une relation empirique entre la réponse Y et les variables sélectionnées est atteinte et est exprimée par l'équation polynomiale du premier ordre qui représente la régression finale :

$$Y = 0.2246 - 0.0113X_1 + 0.0934X_2 - 0.0027X_3 - 0.0133X_4 - 0.0431X_5 + 0.0616X_6 + 0.0279X_7 + 0.0336X_8 - 0.0218X_9 + 0.0025X_{10} - 0.0151X_{11}$$

Avec Y est la réponse (activité de chitinase)

1.1.3. Courbe factoriel des effets principaux

Le logiciel statistique MINITAB génère les graphes des effets principaux sous forme d'une droite représentante de la variation de la réponse moyenne à deux niveaux pour chaque facteur (Fig. 9). Lorsque la ligne est horizontale (parallèle à l'axe des x voire confondue), le facteur n'a pas d'effet sur la réponse, plus l'inclinaison de la droite dans la position verticale des points tracés est grande, plus l'effet principal est important (Abdelwahed et al., 2014)

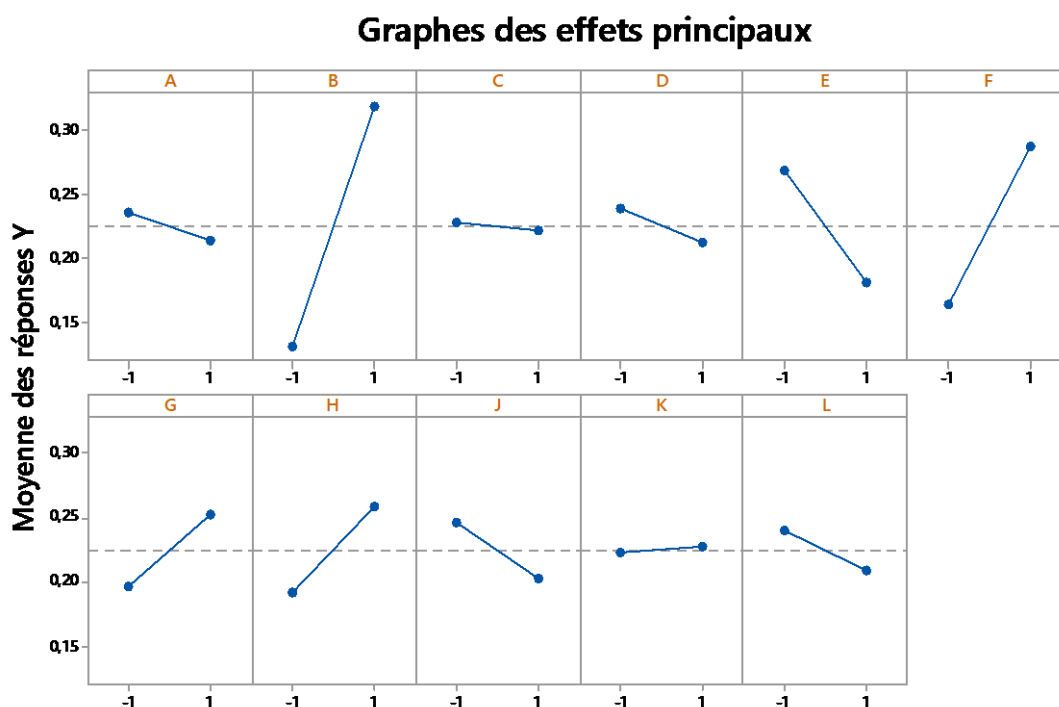


Figure 9. Les principaux diagrammes d'effets pour le système.

A:Glucose, B:Galactose, C:NaCl, D: carapace de crevette , E:Chitine colloïdale, F:Peptone, G:Extrait de levure, H: KH_2PO_4 , J: MgSO_4 , K:pH, L:Température.

D'après la figure 09. On remarque que les facteurs galactose, peptone, extrait de levure et KH_2PO_4 ont un effet synergique sur l'activité enzymatique, alors que glucose, carapace de crevette, la chitine colloïdale, MgSO_4 et la température ont un effet antagoniste. Les facteurs NaCl et le pH ont un effet négligeable sur l'activité.

L'effet antagoniste du glucose est due à la répression catabolique qui est un phénomène mis en place lorsque des bactéries, mais aussi des levures ou des champignons, sont cultivées en présence de deux (voire plusieurs) sources de carbone. Appelée aussi « effet glucose », elle est l'un des mécanismes les plus conservés chez les microorganismes. Elle les protège d'un gaspillage d'énergie en leur évitant de synthétiser des protéines superflues dans des conditions données (Anne, 2018). Prasad et Palanivelu ont trouvé que le glucose réprime les gènes codants de chitinase chez *Thermomyces lanuginosus* (Prasad et Palanivelu, 2012).

1.2. Plan de Box-Behnken

Les résultats de la conception expérimentale ont été étudiés et interprétés par le logiciel MINITAB 17 pour estimer la réponse de la variable dépendante dans l'ensemble des

expériences et pour ajuster les données expérimentales à une équation polynomiale de deuxième degré.

Le tableau 12 montre les valeurs réelles et codées des variables sélectionnées pour le plan de Box-Behnken. Le tableau 15 décrit les valeurs prédites et observées de la réponse (activité de chitinase) générée par ce plan.

Tableau 15. Matrice du plan de Box-Behnken à trois facteurs (valeurs codées), avec les valeurs de réponses (activités chitinolytiques) observées et prédites.

X ₁	X ₂	X ₃	Y obs	Y préd
-1	-1	0	0,232431	0,265263
1	-1	0	0,175016	0,235731
-1	1	0	0,147299	0,086584
1	1	0	0,820439	0,787607
-1	0	-1	0,269388	0,281679
1	0	-1	0,566362	0,550770
-1	0	1	0,290506	0,306097
1	0	1	0,720788	0,708496
0	-1	-1	0,208673	0,163550
0	1	-1	0,389497	0,437920
0	-1	1	0,390817	0,342394
0	1	1	0,396097	0,441220
0	0	0	0,285887	0,351441
0	0	0	0,429754	0,351441
0	0	0	0,338682	0,351441

R² = 94,36%

R ajusté = 84,20%

Une analyse de régression multiple a été appliquée sur les données expérimentales (tableau 16), et une équation polynomiale du second degré a été déterminée pour expliquer la production de la chitinase par *Micromonospora echinospora* C33 :

$$Y = 0,3514 + 0,1679X_1 + 0,0933X_2 + 0,0455X_3 + 0,0539X_1 \times X_1 - 0,0616X_2 \times X_2 + 0,0564X_3 \times X_3 + 0,1826X_1 \times X_2 + 0,0333X_1 \times X_3 - 0,0439X_2 \times X_3$$

Avec Y = la réponse (activité chitinolytique).

L'analyse statistique des variables présente un coefficient de détermination $R^2 = 0,9436$. Cela signifie que 94,36 % de la variation de la production de la chitinase peut être expliqué par ce modèle. Donc ce modèle est représentatif du système et confirme la forte relation qui existe entre la production de la chitinase et les facteurs sélectionnés. La similarité entre la valeur de R^2 (94,36%) et R ajusté (84,20%) montre la validité du modèle pour prédire la réponse. Parmi les trois facteurs testés, le galactose est celui qui a l'impact le plus important sur l'activité enzymatique de la chitinase, selon le coefficient linéaire le plus élevé (0,1679), suivi de la peptone (0,0933) et de la chitine colloïdale (0,0455).

1.2.1. Analyses de la variance

L'analyse de variance ANOVA du modèle de régression quadratique est nécessaire pour tester la signification et la pertinence du modèle. Si le modèle constitue un bon prédicteur des résultats expérimentaux, la valeur de F du modèle doit être supérieure à la valeur de F tabulée (Table de Fisher annexe n° 4) pour un certain nombre de degrés de liberté. Les résultats obtenus (Tableau 16) montrent que le modèle est hautement significatif au seuil de 5 %. Ceci est justifié par le fait que la valeur du F calculée est plus grande que la valeur de F tabulée soit : $F=9.29 \gg F_{0.05 (9, 5)} \text{ tabulé} = 4.77$. L'analyse de la variance (ANOVA) indique que le modèle est très significatif (tableau 16) et adéquat pour la description de la production de l'enzyme par *Micromonospora echinospora* C33. La valeur de la probabilité (P) est également utilisée comme un outil afin de déterminer l'importance de chaque facteur. Plus la valeur de P est faible, plus la corrélation avec le coefficient correspondant est significative (Sreekumar et Krishnan, 2010).

Tableau 16. Analyse de la variance pour la production des chitinases par *Micromonospora echinospora* C33.

Source	degré de liberté	Somme des carrés	moyenne des carrés	valeur-F	valeur-P
Modèle	9	0,496131	0,055126	9,29	0,012
Linéaire	3	0,311676	0,103892	17,51	0,004
X₁=Galactose	1	0,225450	0,225450	37,99	0,002
X₂=Peptone	1	0,069638	0,069638	11,73	0,019
X₃=Chitine colloïdale	1	0,016588	0,016588	2,80	0,155
carrée	3	0,038881	0,012960	2,18	0,208
X₁*X₁	1	0,010736	0,010736	1,81	0,236
X₂*X₂	1	0,013996	0,013996	2,36	0,185
X₃*X₃	1	0,011744	0,011744	1,98	0,219
Interaction bidirectionnelle	3	0,145574	0,048525	8,18	0,023
X₁*X₂	1	0,133428	0,133428	22,48	0,005
X₁*X₃	1	0,004443	0,004443	0,75	0,426
X₂*X₃	1	0,007704	0,007704	1,30	0,306
Erreur	5	0,029672	0,005934		
Manque d'ajustement	3	0,019079	0,006360	1,20	0,484
Erreur Expérimental	2	0,010593	0,005297		
Totale	14	0,525803			

L'analyse de régression des données expérimentales (tableau 16), montre également que les effets du galactose et de la peptone sur la synthèse enzymatique sont significatifs ($P < 0,05$), tandis que l'impact de la chitine colloïdale est insignifiant en raison de sa valeur P ($0,155 > 0,05$). Tous les facteurs n'ont montré aucun effet quadratique significatif sur la production d'enzymes. L'interaction entre la concentration de galactose et la concentration de peptone est également significative, comme le montrent les faibles valeurs de P ($P < 0,05$) du terme interactif. Mais l'autre interaction s'est avérée insignifiante, étant donné que la valeur de p était supérieure à $0,05$.

1.2.2. Tracés des surfaces de réponse

a. Courbe iso-réponse

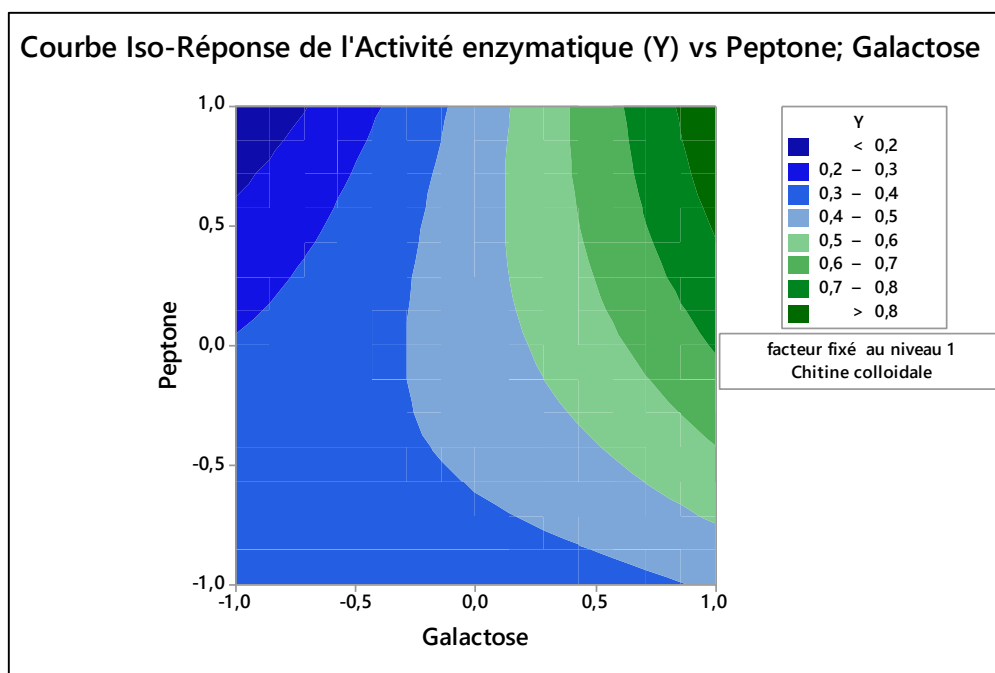


Figure 10. Courbe iso-réponse de l'interaction significative.

Les valeurs de rendement pour différentes concentrations des variables peuvent être prédites à partir des courbes d'iso-réponse (Box et *al.*, 1978; Box et Wilson, 1951; Khuri et Cornell, 1987). Une interaction est dite significative, lorsque la dépendance entre les niveaux des facteurs influe sur le changement de la réponse en se déplaçant des niveaux bas à des niveaux élevés, la courbe d'iso-réponse présentée dans la figure 16 montre que la production la plus élevée de l'activité enzymatique a été enregistrée lorsque les deux facteurs (peptone et galactose) sont fixés à leurs niveau supérieur (+1) (15 et 5g/l respectivement) tout en fixant la chitine colloïdale à sa valeur maximale (+1).

D'après l'analyse de la variance ANOVA, l'interaction entre le galactose et la peptone est la plus importante avec un $P = 0,005$; la courbe d'iso-réponse de l'interaction significative entre le galactose et la peptone montre que la peptone a un effet antagoniste dans l'intervalle -1,0(0 g/L) à -0,5(1.25 g/L).

Le tableau 17 récapitule les valeurs réelles de la variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration du galactose et de la peptone, correspondantes à la courbe d'iso-réponse (Figure 10).

Tableau 17. L'activité enzymatique pour les différentes concentrations de galactose et de peptone.

La quantité (g/l)		L'activité enzymatique (U/ml)
La peptone	Le galactose	
15	0	<0,2
12,5-13,75	0-1,25	0,2-0,3
10-12,5	0-1,875	0,3-0,4
10	0-4,375	
10-15	0-1,875	
11,25-15	2,5	0,4-0,5
10,625	3,75-5	
12,5	3,75	0,5-0,6
12,5-15	4,375	0,6-0,7
13,75	4,5	0,7-0,8
15	5	>0,8

b. Courbe des surfaces de réponse

Les courbes des surfaces de réponse représentent la variation de la réponse en fonction de deux facteurs tout en maintenant les autres facteurs à des niveaux fixes et sont plus utiles pour comprendre à la fois les effets principaux et l'interaction de ces deux facteurs. Les valeurs de rendement pour différentes concentrations de la variable peuvent également être prédites à partir des courbes de surface de réponse. La valeur maximale prévisible est indiquée par la surface limitée dans le diagramme de surface de réponse (Meruvu et Rami Reddy Donthireddy, 2014).

La figure 11 représente la courbe tridimensionnelle de la surface de réponse calculée à partir de l'effet d'interaction de la concentration du galactose et de la peptone sur la production de l'enzyme (représenté par l'activité enzymatique), tandis que la chitine colloïdale est maintenue à son niveau maximal. La courbe de surface de réponse indique que l'activité enzymatique se maximise pour des niveaux de Galactose =+1 (5g/L), Peptone =+1(15g/L).

Surface de Réponse de l'Activité enzymatique (Y) vs Peptone; Galactose

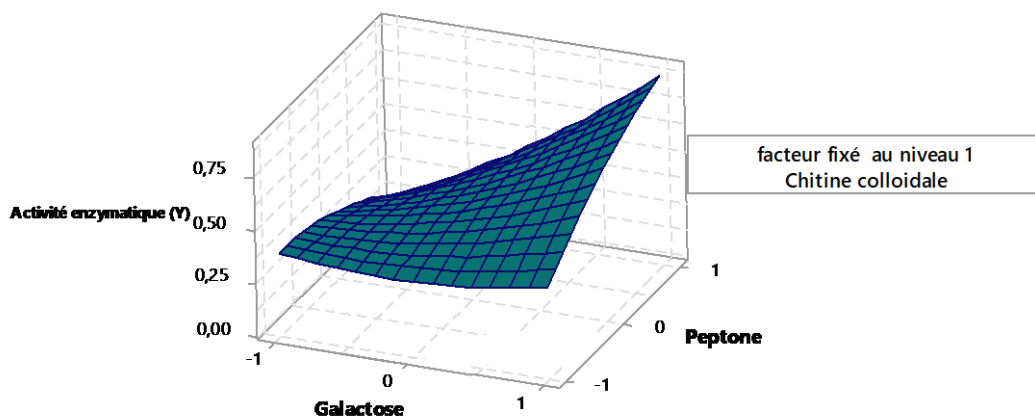


Figure 11. Surface de réponse de l'activité enzymatique(y) vs peptone: galactose

Le modèle prévoit que le niveau optimal des facteurs étudiés (Galactose =+1, Peptone =+1 et Chitine colloïdale =+1) produirait une activité maximale de Y prédite = 0,8790 U/ml.

Tableau 18. Les valeurs optimales codées et réelles des facteurs significatives.

Variables	Galactose	Peptone	Chitine colloïdale
Valeur codée	+1	+1	+1
Valeur réelle	5 g/L	15 g/L	10%

Pour vérifier la contribution des conditions optimale, un essai expérimental a été mis en œuvre avec les valeurs prédites du modèle statistique, le résultat indique que l'efficacité de la production maximale a été obtenue lorsque les valeurs de chaque paramètre sont définies comme des valeurs optimales, qui sont en bonne concordance avec les valeurs prédites du modèle de régression.

Une Expérience de confirmation est réalisée avec les optima calculés (Tableau 18) afin de confirmer la validité du modèle (Tableau 19).

Tableau 19. Activités chitinolytique de la souche *Micromonospora echinospora* C33.

Activité chitinolytique U/ml	
Prédite	Observée
0,8790	0,8283

Cette grande similitude entre les résultats prévus et les résultats observés reflète la précision et l'applicabilité du modèle de Box-Behnken dans les processus d'optimisation.

2. Etude des cinétiques de croissance et de production de la chitinase

Micromonospora echinospora C33

Pour suivre la cinétique de production de l'enzyme par notre souche, on a effectué une fermentation dans les conditions optimales. Des échantillons sont prélevés à des intervalles de temps réguliers (1 jour) au cours de la croissance, et des mesures de l'activité enzymatique et de la biomasse (poids sec) sont réalisées.

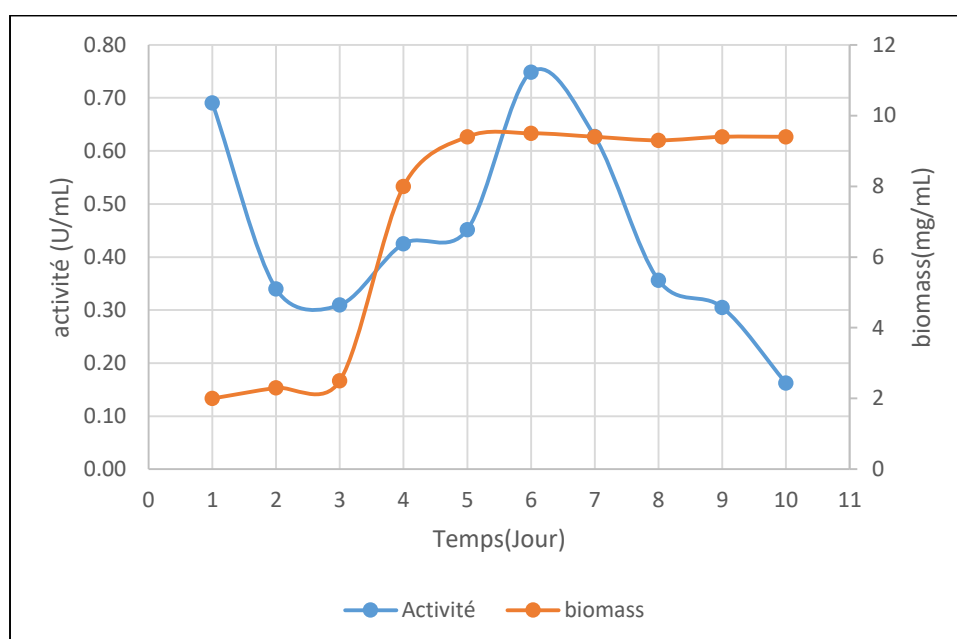


Figure 12. Cinétique de croissance et de production de la chitinase par *Micromonospora echinospora* C33.

La cinétique de la croissance *Micromonospora echinospora* C33 est similaire aux cinétiques classiques de la croissance des microorganismes avec une phase de latence (les trois premiers jours), une phase exponentielle (de 3^{ème} jour au 5^{ème} jour) et une phase stationnaire au-delà de 6^{ème} jour (Figure 12).

La production des enzymes est également représentée dans la figure 11. L'activité chitinolytique a commencé avec une valeur élevée dès le 1^{er} jour mais elle a brusquement décliné pour se stabiliser vers une valeur de 0,3 U/ml. Au-delà du 3^{ème} jour, une augmentation progressive est observée pour atteindre une valeur maximale de 0,75 U/ml au 6^{ème} jour de

fermentation cette période coïncide avec la phase exponentielle de la croissance. Par la suite, l'activité a progressivement diminué avec le temps.

L'atteinte de l'activité chitinase maximale après 6 jours d'incubation a été rapportée chez différentes souches productrices de chitinase : *Streptomyces sp* NK528 (Nawani et al., 2005) ; *Serratia marcescens* 97 (Sudhakar, 2010) et *Streptomyces sp.* PTK19 (Thiagarajan, 2011), de même que *Planococcus rifitoensis* (Essghaier et al., 2010) ; *Micromonospora brevicatiana* (RE14) et *Streptomyces pseudogriseolus* (BH1) (Mane et al., 2009) ont obtenu un maximum de production de chitinase après 5 jours d'incubation.

3. Purification de la chitinase

Tableau 20. Purification de la chitinase produites par *Micromonospora echinospora* C33.

	Protéines Totales (mg/ml)	activité Totale	Activité Spécifique (U/mg)	Degré de purification	Rendement (%)
Extrait brut	0.52	0.80	1.54	1.00	100
Après précipitation	1.68	0.29	0.17	0.11	36.43
Dialyse 1	0.94	0.28	0.30	1.73	35.29
Chromatographie d'affinité	0.38	0.24	0.64	2.10	30.20
Dialyse 2	0.07	0.22	3.00	4.72	27.41

Ce tableau résume les étapes de purification de la chitinase qui se déroule selon la méthode de Mukherjee et Sen (2006). Une précipitation par le sulfate d'ammonium suivie d'une dialyse puis une chromatographie d'affinité à base de chitine colloïdale (Mukherjee et Sen, 2006).

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., 2016). 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). A ce stade, l'activité spécifique est passée de 1,54 à 0,17 U/mg avec un rendement de 36,43 %. Après cette étape on est passé à l'étape de dialyse qui est réalisée dans le but d'éliminer l'excès de sel, de solvants organiques ou de molécules de petits poids moléculaires de la solution (Rosenberg, 2005). A ce niveau l'activité spécifique a augmenté jusqu'à 0,30 et le rendement a atteint 35,29 %.

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.*, 2008). L'activité spécifique a augmenté jusqu'à 0,64 et le rendement a atteint 30,20 %. Après cette étape une autre dialyse est réalisée où l'activité spécifique a augmenté jusqu'à 3 et le rendement a atteint 27,41 %. Avec un degré de purification de 4,72.

L'activité spécifique de l'extrait brut était de 1,54, et elle est passée à 3 après la chromatographie d'affinité et la dialyse avec un rendement de purification de 27,41% et un degré de purification de 4,72.

4. Caractérisation partielle de l'enzyme purifiée

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

4.1. Effet du pH sur la chitinase de *Micromonospora echinospora* C33

L'effet du pH est complexe puisqu'il agit sur l'équilibre des réactions qui implique la libération ou la capture d'un proton. Les valeurs pKa (constantes d'ionisation) des résidus du site actif d'une enzyme sont importantes pour la fonctionnalité du mécanisme catalytique de l'enzyme. Leurs valeurs affectent la marge à laquelle l'enzyme peut fonctionner (Nielsen et McCammon, 2003). Le pH agit aussi sur la conformation de la protéine et l'ionisation des groupes impliqués dans la catalyse au niveau du site actif de l'enzyme, l'enzyme pourrait se dénaturer après une incubation prolongée dans des pH inconvenants (Gerhartz, 1990).

Le pH optimal de l'extrait brut de chitinase a été déterminé en incubant la chitinase à différents pH (3,0-10,0) à 50 °C. On remarque que notre chitinase était active dans un large intervalle de pH auquel le pH optimal de l'activité chitinase a été observé à pH 8 (Figure 13). Un résultat similaire a été obtenu pour la chitinase de *Streptomyces canus*, *Micromonospora Brevicatiana*, *Streptomyces pseudogriseolus*, *Alteromonas* sp. et de *Bacillus circulans* (Mane et Deshmukh, 2009 ; Tsujibo et al., 1992 ; Wiwat et al., 1999). La chitinase thermostable de *Streptomyces thermoviolaceus* est active à un pH optimum compris entre 8,0 et 10,0 (Tsujibo et al., 1993).

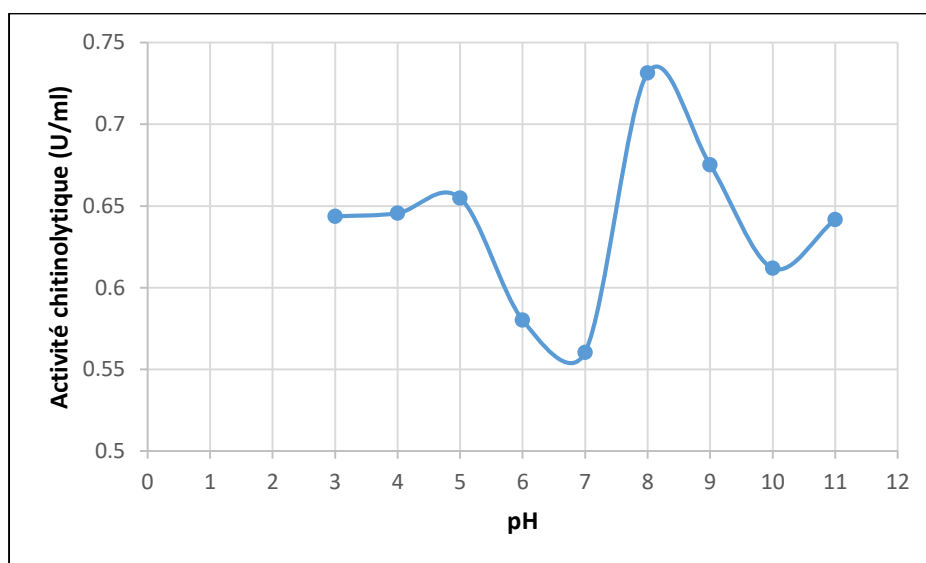


Figure 13. Effet du pH sur l'activité de la chitinase de *Micromonospora echinospora* C33.

4.2. Effet de la température sur la chitinase de *Micromonospora echinospora* C33

Les enzymes sont des protéines. Elles peuvent être dénaturées à des températures élevées, tandis que les basses températures ne fournissent pas une énergie d'activation suffisante pour l'activité catalytique de l'enzyme. Les chitinases bactériennes sont actives dans un large intervalle de température (Shekhar et al., 2006). L'effet de la température sur l'activité chitinolytique de *Micromonospora echinospora* C33 a été déterminé par le dosage standard en utilisant la chitine colloïdale comme substrat dans une marge allant de 20 à 70 °C.

L'enzyme étudiée a montré une activité maximale de 0,71U/ml à 30 °C. Au-delà de cette température, l'activité diminue progressivement avec l'augmentation de la température (Figure 14), ce qui démontre la dépendance de l'enzyme à la température. Ces résultats concordent avec ceux obtenus pour *Streptomyces violaceusniger* (Shekhar et al., 2006),

Streptomyces rubiginosus SP 24 (Jha et al., 2016), *Streptomyces* sp. (Kim et al., 2003) avec une température optimal de 30 °C. Une activité maximale a également été observée dans la marge de température de 30 à 40 ° C pour *Bacillus* sp. (Cheba et al., 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (Wang et Chang, 1997), *Enterobacter agglomerans* (Chernin et al., 1995) et *Streptomyces albovinacicus* (El-sayed et al., 1999).

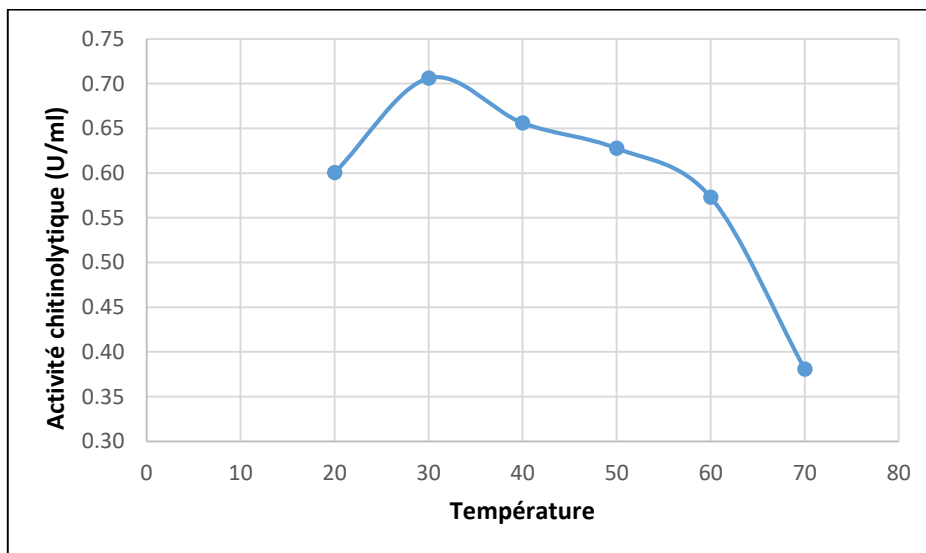


Figure 14. Effet de la température sur l'activité de la chitinase de *Micromonospora echinospora* C33.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les chitinases ont de nombreuses applications telles que la préparation de chitoooligosaccharides pharmaceutiquement importants, l'isolement des protoplastes fongiques, l'estimation de la biomasse fongique, le traitement des déchets chitineux et le contrôle des champignons phytopathogènes. Par conséquent, la production et la purification des chitinases, en particulier à partir de sources bactériennes, ont reçu une attention considérable au cours des dernières décennies, et certaines chitinases aux caractéristiques nouvelles ont été isolées chez quelques espèces bactériennes. Cependant, ce champ d'étude n'est pas encore suffisamment développé et bien que les résultats obtenus jusqu'à présent soient prometteurs, les chitinases sont encore rarement appliquées. De ce fait, il conviendrait de poursuivre des recherches dans cette voie. À notre connaissance, les chitinases de l'espèce *Micromonospora echinospora* n'ont pas encore été étudiées. En fait, on sait très peu de choses sur les capacités enzymatiques de cette espèce.

L'objectif principal de cette étude est d'optimiser les conditions de croissance pour une production maximale des chitinases par *Micromonospora echinospora* C33, ainsi qu'une caractérisation partielle de l'enzyme, ce qui pourrait être utile pour améliorer l'activité catalytique de l'enzyme.

Au cours de la dernière décennie, plusieurs méthodes d'optimisation ont été utilisées pour améliorer la production d'enzymes. Les plans d'expériences (Design of experiments – DOE-) s'est avéré être la méthode la plus efficace. Ils apportent des améliorations substantielles en termes d'optimisation par rapport aux techniques d'optimisation classiques telles que l'OFAT (one factor at a time). Cette méthodologie s'appuie sur des outils statistiques pour conduire et mettre en place un plan expérimental détaillé afin d'extraire le maximum d'informations avec le plus petit nombre d'essais.

Dans notre travail, l'optimisation des milieux de culture a été réalisée en deux étapes en utilisant deux plans expérimentaux. La première étape consiste à utiliser le plan Plackett-Burman pour évaluer l'effet des composants du milieu (glucose, galactose, NaCl, carapace de crevette, chitine colloïdale, peptone, extrait de levure, KH_2PO_4 , MgSO_4) et des paramètres du milieu (pH et température) sur la production de chitinase. Parmi ces facteurs, le galactose, la chitine colloïdale et la peptone se sont révélés être les variables les plus significatives de la production de chitinase par *Micromonospora echinospora* C33 avec un niveau de confiance supérieur à 95%. En utilisant la courbe d'effet principal des facteurs, les facteurs non

significatifs ont été fixés à leurs niveaux optimaux : Glucose 0 g/L, NaCl 7.5 g/L, extrait de levure 1,5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, MgSO_4 0 g/L, pH 8 et température 30 °C.

Dans la deuxième étape, les facteurs sélectionnés par le plan Plackett-Burman ont fait l'objectif d'une optimisation du milieu de production en utilisant la méthodologie de surface de réponse Box-Behnken. Les valeurs optimisées de ces variables pour la production maximale de chitinase étaient les suivantes : galactose : 5 g/L, chitine colloïdale : 10% et peptone 15 g/L avec une production maximale prévue de chitinase de 0,878 U/ml. Une expérience de conformation avec les valeurs optimales a donné une production de chitinase de 0,828U/ml. La concordance entre la réponse prévue et les données expérimentales obtenues en laboratoire indique la pertinence et l'applicabilité des méthodes de conception expérimentale pour l'optimisation du milieu.

En plus d'établir la composition optimale du milieu de fermentation pour la mise à l'échelle, nous avons pu formuler un modèle polynomial qui décrit l'effet des facteurs significatifs et prédit la quantité et la productivité dans différentes conditions :

$$Y = 0,3514 + 0,1679X_1 + 0,0933X_2 + 0,0455X_3 + 0,0539X_1 \times X_1 - 0,0616X_2 \times X_2 + 0,0564X_3 \times X_3 + 0,1826X_1 \times X_2 + 0,0333X_1 \times X_3 - 0,0439X_2 \times X_3$$

Où, Y est la réponse (activité de chitinase) et X_1 Galactose, X_2 : Peptone, X_3 : chitine colloïdale.

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 4,72 fois avec un rendement de 27,41 % et une activité spécifique de 3,00 U/mg. L'activité de la chitinase purifiée était maximale à 30 °C et à pH 8,0. Ces résultats peuvent constituer une base importante pour les applications industrielles.

Cependant, d'autres travaux peuvent être réalisés telle qu'une :

- Étude de stabilité de l'enzyme, la spécificité du substrat, les mécanismes de catalyse et la sensibilité aux inhibiteurs.
- Une électrophorèse SDS-PAGE et une zymographie afin de connaître le poids moléculaire de cette enzyme ainsi que le nombre de ces sous/unités,
- L'étude de la conformation spatiale ainsi qu'une identification des gènes codant de chitinases chez *Micromonospora echinospora* C33.

REFERENCES

- Aam, B.B., Heggset, E.B., Norberg, A.L., Sørli, M., Vårum, K.M., Eijsink, V.G.H. 2010. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Mar. Drugs* 8, 1482–1517
- Abdelwahed, N.A.M., Ahmed, E.F., El-Gammal, E.W. et al. 2014. Application of statistical design for the optimization of dextranase production by a novel fungus isolated from Red Sea sponge. *Biotech* 3.
- Adinarayana, K., and 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, M.A. 2013. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnol. Adv.* 31, 1786–1795.
- Al Ahmadi Jami, K & Tabatabaei Yazdi, M & Najafi, Mohsen & Shahverdi, Ahmad Reza & Faramarzi, Mohammad & Zarrini, Gholamreza & J, Behravan. 2008. Optimization of Medium and Cultivation Conditions for Chitinase Production by the Newly Isolated: *Aeromonas* sp.. *Biotechnology*.
- Alonso-Vega P, Normand R, Bacigalupe PP, Lajus A, Vallenet D, Carro L, Coll P and Trujillo ME. 2012. Genome sequence of *Micromonospora lupine* *Lupac* 08, isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *J Bacteriol* 194 : 4135–4136.
- 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.
- Anne G. 2018. La répression catabolique ou comment les bactéries choisissent leurs sucres préférés, *Med Sci (Paris)* 34 (6-7) 531-539.
- Barbara Krajewska. 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 35, Issues 2–3, Pages 126-139.
- Bassler, B. L., Yu, C., Lee, Y. C., and Roseman, S. 1991. Chitin utilization by marine bacteria: degradation and catabolism of chitinoligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J. Biol. Chem.* 266: 24276–24286.
- Benhamou N, Asselin A. 1989. Attempted localization of a substrate for chitinase in plant cells reveals abundant N-acetyl D-glucosamine residues in secondary walls. *Biol Cell* 67:341– 350
- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)* 58: 1–26.

- Bhattacharya, D., Nagpure, A., Gupta, R.K., 2007. Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27, 21–28.
- Bibhu Prasad Panda, Mohd. Ali and Saleem Javed. 2007. Fermentation Process Optimization. *Research Journal of Microbiology*, 2: 201-208.
- Blaak H., Schnellmann J., Walter S., Henrissat B. et Schrempf H. 1993. Characteristics of an exochitinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases. *Eur.J.Biochem.* 214:659-669.
- Blumenthal, H.J.; Roseman, S. **1957**. Quantitative estimation of chitin in fungi. *J. Bacteriol.* 74, 222–224.
- Boller, T. 1986. Chitinase: A defense of higher plants against pathogens. *Chitin in Nature and Technology*, Plenum Press, New York, 223–231
- Bouras N. 2005. Régulation de la production d'antibiotiques dithiolopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, France. p:91-103.
- Box, G.E. and Wilson, K.G. 1951. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society*, 13, 1-45.
- Brameld KA, Goddard III WA. 1998. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120:4276–4281
- Brandl, F.; Sommer, F.; Goepferich, A. 2007. Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials*, 28, 134–146.
- Brinda M. et Crawford D.L. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microbial. Tech.* 20:489-493.
- Burman, N.P. 1973. The occurrence and significance of *actinomycetes* in water supply. In *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance* (edited by Sykes and Skinner). Academic Press, London, pp. 219–230.
- Calabrese, V.; Lodi, R.; Tonon, C.; D'Agata, V.; Sapienza, M.; Scapagnini, G.; Mangiameli, A.; Pennisi, G.; Stella, A.M.G.; Butterfield, D.A. 2005. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J. Neurol. Sci.* 233, 145–162.
- Campbell, L. L., and Williams, O. B. 1951. A study of chitin decomposing microorganisms of marine origin. *J. Gen. Microbiol.* 5, 894–905.

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37:D233–8.

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37, D233–D238.

Charpentier M. et Percheron F. 1983. The chitin-degrading enzyme system of a *Streptomyces* species. *Int.J.Biochem.*15:289-292.

Cheba, Ben Amar, Taha Ibrahim Zaghloul, Ahmad Rafik EL-Mahdy, Mohamad Hisham EL-Massry. 2016. Effect of pH and Temperature on *Bacillus* sp. R2 Chitinase Activity and Stability, *Procedia Technology*, Volume 22, Pages 471-477.

Chernin L, Ismailov Z, Haron S, Chet I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter* agglomerans antagonistic to fungal plant pathogens, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (5): 1720-1726.

Cohen-Kupiec R. et Chet I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Curr.Opinion.Biotech.* 9:270-277.

Cross, T. 1981a. The monosporic *actinomycetes*. In *The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria* (edited by Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schlegel). Springer, New York, pp. 2091–2102.

Cross, T. 1981b. Aquatic *actinomycetes*: a critical survey of the occurrence, growth and role of *actinomycetes* in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* 50: 397–423.

Dahiya N, Tewari R, Tiwari RP, Hoondal GS. 2005. Production of an antifungal chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4 and its application in protoplast production. *World J Microbiol Biotechnol* (in press).

Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 773–782.

Danilenko. V.N; Mironov. V.A; and Elizarov. S.M. 2005. Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in *Actinomycetes*: A Review. *App. Biochem.* 41(4), 319-329.

Day, R.B.; Okada, M.; Ito, Y.; Tsukada, K.; Zaghoulani, H.; Shibuya, N.; Stacey, G. 2001. Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. *Plant Physiol.* 126, 1162–1173.

De Jong, A.J.; Heidstra, R.; Spaink, H.P.; Hartog, M.V.; Meijer, E.A.; Hendriks, T.; Schiavo, F.L.; Terzi, M.; Bisseling, T.; Van Kammen, A.; De Vries, S.C. *Rhizobium Lipooligosaccharides Rescue a Carrot Somatic Embryo Mutant.* *Plant Cell.* 1993. 5, 615–620.

Dean ACR. 1972. Influence of environment on the control of enzyme synthesis. *J Appl Chem Biotechnol* 22:245–259.

Dubey, K. K., Haque, S., Jawed, A., Singh, B. P., and Behera, B. K. 2010. Construction of recombinant *Escherichia coli* for enhanced bioconversion of colchicine into 3-demethylated colchicine at 70 l bioreactor level. *Process Biochem.* 45, 1036–1042.

Dutta P K, Ravikumar M N V & Dutta J. 2002. Chitin and chitosan for versatile applications, *JMS Polym Rev*, C42 307.

Ekborg, N. A., Morrill, W., Burgoyne, A. M., Li, L., and Distel, D. L. 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.

Elilbol, Murat. 2004. Optimization of Medium Composition for Actinorhodin Production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) With Response Surface Methodology. *Process Biochemistry.* 39. 1057-1062.

El-sayed E, Ezzat SM, Ghaly MF, Mansour M, El-Bohey MA. 1999. Purification and characterization of two chitinases from *Streptomyces albovinaceus* S-22. *J. Union Arb. Biol.* 8 (B). Microbiology and viruses 149-163.

El-Sayed E.S.A., Ezzat S.M., Ghaly M.F., Mansour M., et El-Bohey M.A. 2000. Purification and characterization of two chitinases from *Streptomyces albovinaceus* S-22. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16:87-89.

Essghaier, Badiia & Rouaissi, Mustapha & Boudabous, Abdellatif & Jijakli, M & Sadfi Zouaoui, Najla. 2010. Production and partial characterization of chitinase from a halotolerant *Planococcus rifitoensis* strain M2-26. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 26. 977-984.

Felse PA and Panda T. 1999. Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. *Process Biochem.* 34: 563-566.

Fuchs, R. L., McPherson, S. A., and Drahos, D. J. 1986. Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 504–509.

Fujii T. et Miyashita K. 1993. Multiple domain structure in a chitinase gene (ChiC) of *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 139:677-686.

G. E. P. Box & D. W. Behnken. 1960. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables, *Technometrics*, 2:4, 455-475.

Gacto, M., Vicente-Soler, J., Cansado, J. and Villa T. 2000. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 961-967.

Gao, J., Bauer, M. W., Shockley, K. R., Pysz, M. A., and Kelly, R. M. 2003. Growth of hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* on chitin involves two family 18 chitinases. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3119–3128.

Gasmi, M., Kitouni, M., Carro, L. et al. 2019. Chitinolytic actinobacteria isolated from an Algerian semi-arid soil: development of an antifungal chitinase-dependent assay and GH18 chitinase gene identification *Ann Microbiol.* 69: 395.

Gerhartz W (ed). 1990. *Enzymes in industry: production and applications*. VCH, Weinheim.

Gohel V, Chaudhary T, Vyas P and Chhatpar HS. 2006. Statistical screening of medium components for the production of chitinase by the marine isolate *Pantoea dispersa*. *Biochem. Eng. J.* 28: 50-56.

Gohel V, Trivedi S, Vyas P and Chhatpar HS. 2004. Formulation of medium constituents by multiresponse analysis of central composite design to enhance chitinase production in *Pantoea dispersa*. *Indian J. Exp. Biol.* 42: 1123-1131.

Gomes R.C., Alviano C.S., Linhares L.F. et Coelho R.R. 2000. Chitinolytic Activity of Actinomycetes from a Cerrado Soil and their Potential in Biocontrol. *Appl. Microbiol.* 3:146-150.

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.

González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., & Genilloud, O. 2005. *Actinomycetes* isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(3), 401–15.

Gooday, G. W. 1986. Chitinase activities in mammals, fungi and bacteria. *Chitin in Nature and Technology*, Plenum Press, New York, 241–261.

Gooday, G. W. 1990. The ecology of chitin degradation. *Adv. Microb. Ecol.* 11, 387–430.

Goodfellow M. et Williams S.T. 1983. Ecology of *actinomycetes*. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:189-216.

Goodfellow, M and O'Donnell, A. 1989. Search and discovery of industrially significant actinomycetes. In *Microbial Products: New Approaches* ed. Baumberg, S., Hunter, I. and Rhodes, M. Cambridge, UK. Cambridge University Press.

Goodfellow, M. and J.A. Haynes. 1984. Actinomycetes in marine sediments. In *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes* (edited by Ortiz-Ortiz, Bojalil and Yakoleff). Academic Press, Orlando, pp. 453–472

Graham, LS, Sticklen, MB. 1994. Plant chitinases *Can J Bot* 72:1057-1083.

Grenier J, Benhamou N, Asselin A. 1991. Colloidal goldcomplexed chitosanase: a new probe for ultrastructural localization of chitosan in fungi. *J Gen Microbiol* 137:2007–2015.

Gupta R, Saxena RK, Chaturvedi P, Viridi JS. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *Appl Bacteriol*;78:378–83.

Han P, Yang C, Liang X, Li L. 2016. Identification and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from “Baozhu” pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.). *Food Chem* 196:808–814.

Han Y, Zhiyong L, Miao X and Zhang F. 2008. Statistical optimization of medium components to improve the chitinase activity of *Streptomyces* sp. Da11 associated with the South China Sea sponge *Craniella australiensis*. *Process Biochem.* 43: 1088-1093.

Hao, Zhikui & Cai, Yujie & Liao, Xiangru & Zhang, Xiaoli & Fang, Zhiyou & Zhang, Dabing. 2012. Optimization of nutrition factors on chitinase production from a newly isolated Chitolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1. *Brazilian Journal of Microbiology.* 43.

Harish Prashanth, K.V., Tharanathan R.N. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview, *Trends in Food Science &Technology*, Volume 18, Issue 3, Pages 117-131.

Hawtin R.E., Arnold K., Ayres M.D., Zanutto P.M., Howard S.C., Gooday G.W. et al. 1995. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology.* 212:673-685.

Henrissat B., and Bairoch A. 1993. New families In the Classification of Glycosyl Hydrolyses Based on Amino Acid Sequence Similarities, *BiochemJ*, 293, 781-788.

Herring, P.J. 1979. Marine Ecology and natural products. *Pure Appl. Chem.*, 51, 1901–1911.

Hirsch AM and Valdes M. 2010. *Micromonospora* : an important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol Biochem* 42:536–542.

Horan, A.C. 1999. Secondary metabolite production, *actinomycetes*, other than *Streptomyces*. In Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation (edited by Flickinger and Drew). Wiley, New York, pp. 2333–2348.

Horinouchi. S. 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *streptomyces griseus*. Frontiers, in Bioscience 7: 2045-2057.

Hoster F., Schmitz J.E. et Daniel R. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms: Isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. Appl.Microbiol.Biotechnol. 66:434-442.

Huber M., Cabib E. et Miller L.H. 1991. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. Proc.Natl.Acad.Sci.88:2807-2810.

Huber, R., Stöhr, J., Hohenhaus, S., Rachel, R., Burggraf, S., Jannasch, H., et al. 1995. *Thermococcus chitonophagus* sp. a novel, chitin-degrading, hyperthermophilic archaeum from a deep-sea hydrothermal vent environment. Arch. Microbiol. 164, 255–264.

Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD. 1996. visual molecular dynamics. J Mol Graph 880;14:33–8.

Hunter, J.C., D.E. Eveleigh and G. Casella. 1981. Actinomycetes of a salt marsh. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt. 1 Suppl. 11: 195–200.

Iverson K., Bromel M., Anderson A.W. et Freeman T. 1984. Bacterial symbionts in the sugar beet root maggot *Tetanops myopaeformis* (von Röder). Appl. Environ.Microbiol.47:22-27.

Jakimowicz D. 2007. Chromosome segregation and cell division during the growth and differentiation of *Streptomyces*. Postepy Hig. Med. Dosw. 61: 565-575.

Jayakumar, R., Nwe, N., Tokura, S., & Tamura, H. 2007. Sulfated chitin and chi-tosan as novel biomaterials.International Journal of Biological Macromolecules, 40, 175–181

Jensen, H.L. 1930. The genus *Micromonospora* Ørskov, a little known group of soil microorganisms. Proc. Linnean Soc. N.S.W. 55: 231–248.

Jha, S., Modi, H.A., Jha, C.K. 2016. Characterization of extracellular chitinase produced from *Streptomyces rubiginosus* isolated from rhizosphere of Gossypium sp. Cogent Food Agric. 2, 1198225.

Kapat A, Rakshit SK and Panda T. 1996. Optimization of carbon and nitrogen sources in the medium and environmental factors for enhanced production of chitinase by *Trichoderma harzianum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 15: 13-20.

Kawamoto, I. 1989. Genus *Micromonospora* Ørskov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4 (edited by Williams, Sharpe and Holt). Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 2442–2450.

Khuri, A.L. and Cornell, J.A. 1987. Response Surfaces: Designs and Analyses. Marcel Dekker Inc., New York.

Kim KJ, Yang YJ & Kim JG. 2003. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *J Biochem Mol Biol*, 36, 185.

Koch, C., R.M. Kroppenstedt, F.A. Rainey and E. Stackebrandt. 1996. 16S ribosomal DNA analysis of the genera *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangium*, and *Pilimelia* and emendation of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 765–768.

Koga D, Isogai A, Sakuda S, Matsumoto S, Suzuki A, Kimura S, Ide A. 1987. Specific inhibition of *Bombyx mori* chitinase by allosamidin. *Agric Biol Chem* 51: 471-476.

Koga, D., Mitsutomi, M., Kono, M., Matsumiya, M., 1999. Biochemistry of chitinases. *EXS* 87, 111–123.

Koga, D., Sasaki, Y., Uchiumi, Y., Hirai, N., Arakane, Y., Nagamatsu, Y. 1997. Purification and characterization of *Bombyx mori* chitinases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 757–767.

Kroppenstedt, R.M. 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics* (edited by Goodfellow and Minnikin). Academic Press, London, pp. 173–199.

Kurita, K. 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.* 26: 1921–1971.

Lacey J. 1997. Actinomycetes in composts. *ann. agric. Environ. med.* 4:113-121.

Lechevalier M.P. et Lechevalier H.A. 1981. Introduction to the order actinomycetales. In: *The prokaryotes*, Vol.2. Ed. Springer-Verlag, Berlin. p:1915-1922.

Li H, Greene LH. 2010. Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding. *PLoS One*;5:e8654.

Locci R. et Sharples G.P. 1984. Morphology. In: *The biology of Actinomycetes*. Ed. Academic Press, London., UK, p:165-199.

- Lopes MA, Gomes DS, Bello Koblitz MG, Pirovani CP, Cezar De Mattos Cascardo J, Goes-Neto A and Micheli F. 2008. Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the basidiomycete, *Monilophthora pernicioso*. *Mycol. Res.* 112: 399-406.
- Lu Y and Mei L. 2007. Optimization of fermentation conditions for P450 BM-3 monooxygenase production by hybrid design methodology. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 8: 27-32.
- Madhumathi, K., Sudheesh Kumar, P. T., Abilash, S., Sreeja, V., Tamura, H., Manzoor, K., et al. 2010. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 21, 807–813.
- Mane UV, Deshmukh AM. 2009. Chitin degrading potential of three aquatic actinomycetes and its optimization. *Afr J Biotechnol.*; 8(23): 6617-6620.
- Manocha MS, Zhonghua Z. 1997. Immunochemical and cytochemical localization of chitinase and chitin in infected hosts of a biotrophic mycoparasite, *Piptocephalis virginiana*. *Mycologia* 89:185–194.
- Meruvu, Rami Reddy Donthireddy. 2014. Optimization Studies for Chitinase Production from *Parapeneopsis hardwickii* (spear shrimp) exoskeleton by solid-state fermentation with marine isolate *Citrobacter freundii* str. nov. haritD11. *Arabian Journal for Science and Engineering*. Volume 39, Issue 7, pp 5297–5306.
- Mitsutomi M., Hata T. et Kuwahara T. 1995. Purification and characterization of novel chitinases from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J. Ferment. Bioeng.* 80:153-158.
- Miyashita K., Fujii T. et Sawada Y. 1991. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* 137:2065-2072.
- Monreal J, Reese ET. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol* 15:689–696.
- Mukherjee G, Sen SK. 2006. Purification, Characterization, and Antifungal Activity of Chitinase from *Streptomyces venezuelae* P10. *Curr Microbiol* 53:265–269.
- Mullins, J. 1993. A study of the ecology and taxonomy of *Micromonospora* in the natural environment. PhD Thesis. University of Warwick.
- Murao S, Kuwada T, Itoh H, Oyama H, Shin T 1992. Purification and characterization of a novel type of chitinase from *Vibrio alginolyticus* TK-22. *Biosci Biotechnol Biochem* 56:368–369.

- Muzzarelli, R.A.A. 2010. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Mar. Drugs*, 8, 292–312.
- Myers RH and Montgomery D. 2002. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. Wiley, New York.
- Naveena, B.J., Md. Altaf, K. Bhadrayya, S.S. Madhavendra and G. Reddy. 2005. Direct fermentation of starch to L (+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate medium optimization using RSM. *Process Biochem.*, 40, 681-690.
- Nawani N.N., Kapadnis B.P. 2005. Optimiztion of chitinase production using statistics based experimental designs, *Process Biochem.* 40 . 651–660.
- Nawani NN, Kapadnis BP, Das AD, Rao AS, Mahajan SK. 2002. Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. *J Appl Microbiol* ; 93: 965–75.
- Nawani, N.N., Kapadnis, B.P. 2003. Chitin degrading potential of bacteria from extreme and moderate environment. *Indian Journal of Experimental Biology* 41, 248-254.
- Nielsen, J.E. and McCammon, J.A. 2003. On the evaluation and optimisation of protein X-ray structures for pKa calculations. *Protein Sci.* 12: 313– 326.
- Niladevi KN, Sukumaran RK, Jacob N, Anisha GS, Prema P. 2009. Optimization of laccase production from a novel strain-*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiol. Res.*, 164: 105-113.
- Ordentlich, A., Elad, Y., and Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 78: 84–88.
- Orunsi NA, Trinci APJ. 1985. Growth of bacteria on chitin, fungal cell walls and fungal biomass, and the effect of extracellular enzymes produced by these cultures on the antifungal activity of amphotericin B. *Microbiol* 43:17–30.
- Ou. X; Zhang. B; Zhang. L; Dong. K; Liu. C; Zhao. G; and Ding. X. 2008. SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Acta. Biochim. Biophys Sin*, 40 (10) 877-882.
- Oyeleye, A., Normi, Y.M. 2018. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Bioscience. Rep.* 38.
- 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.

- Patil R.S., Ghormade V. et Deshpande M.V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enz.Microbial. Techn.* 26: 473-483.
- Plackett, R.L. and Burman, J.P. 1946. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*, 33, 305-325.
- Pope AMS, Davis DAL. 1979. The influence of carbohydrates on the growth of fungal pathogens in vitro and in vivo. *Postgrad Med J* 55:674–676.
- Prasad M., Palanivelu P. 2012. Overexpression of a Chitinase Gene from the Thermophilic Fungus, *Thermomyces lanuginosus* in *Saccharomyces cerevisiae* and Characterization of the Recombinant Chitinase. *J Microb Biochem Technol*, 4:3.
- Prescott L. M., Harley J.P., Klein .D.A. 2003. Microbiologie. De Boeck & Larcier.
- Razdan, A.; Pettersson, D. 1994. Effect of chitin and chitosan on nutrient digestibility and plasma lipid concentrations in broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 72, 277–288.
- Revah-Moiseev S, Carrod PA. 1981. Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single cell protein. *Biotechnol Bioeng* 23:1067–1078.
- Ridout C.J., Coley-Smith J.R., Lynch J.R. 1988. Fractionation of extracellular enzymes from a mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*, *Enzyme Microb. Technol.* 10 180–187.
- Romaguera, A., Menge, U., Breves, R., and Diekmann, H. 1992. Chitinases of *Streptomyces olivaceoviridis* and significance of processing for multiplicity. *J. Bacteriol.* 174, 3450–3454.
- Rosenberg IM. 2005. Protein Analysis and Purification. Birkhäuser Boston, Place of publication not identified.
- Saito, A., Fujii, T., Yoneyama, T., Redenbach, M., Ohno, T., Watanabe, T., et al. 1999. Highmultiplicity of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 710–718.
- Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S, Suzuki A. 1987. Search for microbial insect growth regulators. II. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J Antibiot* 40:296–300.
- Sakuda, S., Nishinato, Y., Ohi, M., Watanabe, M., Takayama, S., Isogai, A., and Yamada, Y. 1990. Effects of demethylallosamidine, apotent yeast chitinase inhibitor, on the cell division of yeast. *Agricul.Biol. Chem.* 54: 1333–1335.
- San-Lang, W.; Shih, I.-L.; Wang, C.-H.; Tseng, K.-C.; Chang, W.-T.; Twu, Y.-K.; Ro, J.-J.; Wang, C.-L. 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 321–328.

- Schrempf H. 2001. Recognition and degradation of chitin by *Streptomyces*. *Antonie VanLeeuwenhoek*. 79: 285-289.
- Scopes RK. 1994. Protein Purification. Springer New York, New York, NY
- Shahabuddin M. et Vinetz J.M. 1999. Chitinases of human parasites and their implications as antiparasitic targets. *EXS*. 87:223-34.
- 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.
- 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.
- Shigehiro Hirano. 1996. Chitin Biotechnology Applications, Editor(s): M. Raafat El-Gewely, Biotechnology Annual Review, Elsevier, Volume 2. Pages 237-258.
- Shimosaka, M., Fukumori, Y., Narita, T., Zhang, X. Y., Kodaira, R., Nogawa, M., et al. 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.
- Silveira, R. G., Kakizono, T., Takemoto, S., Nishio, N., and Nagai, S. 1991. Medium optimization by an orthogonal array design for the growth of *Methanosarcina barkeri*. *J. Ferment. Bioeng.* 72,20–25.
- Singh, A., Mehta, G. and Chhatpar, H. 2009. Optimization of medium constituents for improved chitinase production by *Paenibacillus* sp. D1 using statistical approach. *Letters in Applied Microbiology*, 49: 708-714.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. 2017. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in microbiology*.
- Skujin, Š, J., Puk, ěte, A., and McLaren, A. D. 1973. Adsorption and reactions of chitinase and lysozyme on chitin. *Mol. Cell. Biochem.* 2, 221–228.
- Slamova K, Bojarova P, Petraskova L, Kren V. 2010. β -N-acetylhexosaminidase: what's in a name...? *Biotechnol Adv*;28:682–93.
- Somashekar, D., and Joseph, R. 1996. Chitosanases - properties and applications: a review. *Bioresour. Technol.* 55, 35–45.
- Souza, R.F., Soares, R.M.A., Nascimento, R.P., Coelho, R.R.R., Gomes, R.C. 2005. Effect of different carbon sources on endochitinase production by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Curr. Microbiol.*, 51, 16–21.

Sreekumar, Gajapathy & Krishnan, Soundarajan. 2010. Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. African Journal of Biotechnology.

Stoykov, Y.M., Pavlov, A.I., Krastanov, A.I. 2015. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. Eng. Life Sci. 15, 30–38.

Štrojsová, A., and Dyhrman, S. T. 2008. Cell-specific beta-Nacetylglucosaminidase activity in cultures and field populations of eukaryotic marine phytoplankton. FEMS Microbiol. Ecol. 64, 351–361.

Štrojsová, M., and Vrba, J. 2005. Direct detection of digestive enzymes in planktonic rotifers using enzyme-labelled fluorescence (ELF). Mar. Freshwater Res. 56, 189–195.

Sudhakar P. & Nagarajan P. 2010. Production of Chitinase by Solid State Fermentation from Rice Bran. International Journal of Environmental Science and Development. 1. 435-440.

Swiontek Brzezinska, M., Jankiewicz, U., Burkowska, A., Walczak, M., 2014. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. Curr. Microbiol. 68, 71–81.

Tanaka, T., Fujiwara, S., Nishikori, S., Fukui, T., Takagi, M., and Imanaka, T. 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.

Tasharrofi, N., Adrangi, S., Fazeli, M., Rastegar, H., Khoshayand, M. R., & Faramarzi, M. A. 2011. Optimization of Chitinase Production by *Bacillus pumilus* Using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR, 10(4), 759–768.

Terayama H, Takahashi S, Kuzuhara H. 1993. Large scale preparation of N,N'-diacetylchitobiose by enzymatic degradation of chitin and its chemical modification. J Carbohydr Chem 12:81–93.

Thiagarajan V, Revsthi R, Aparanji K, Shivamani P. 2011. Extracellular chitinase production by *Streptomyces* sp. PTK 19 in submerged fermentation and its lytic activity on *Fusarium oxysporium* PTK2 cell wall. I J Curr Sci. 1: 30- 44.

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.

- Tracey, M. A. 1957. Chitin. Rev. Pure Appl. Chem. 7, 1–13.
- Tsujibo H, Hatano N, Okamoto T, Endo H, Miyamoto K, Inamori Y. 1999. Synthesis of chitinase in *Streptomyces thermoviolaceus* is regulated by a two-component sensor-regulator system. FEMS Microbiol Lett 181:83–90.
- Tsujibo H, Yoshida Y, Miyamoto K, Imada C, Okami Y, Inamori Y. 1992. Purification, properties, and partial amino acid sequence of chitinase from a marine *Alteromonas sp.* O-7. Can J Microbiol 38:891–89.
- Tsujibo H., Minoura K., Miyamoto K., Endo H., Moriwaki M. et Inamori Y. 1993. Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Appl. And Environ. Microbiol. 59:620–622.
- Tsujibo, H., Kubota, T., Yamamoto, M., Miyamoto, K., and Inamori, Y. 2003. Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardiopsis prasina* OPC-131. Appl. Environ. Microbiol. 69, 894–900.
- Udaya Prakash NA, Jayanthi M, Sabarinathan R, Kanguane P, Mathew L, Sekar K. 2010. Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. J Mol Evol 70:466–78.
- Ulhoa C.J., Peberdy J.F. 1991. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*, J. Gen. Microbiol. 137 2163–2169.
- Usui, T., Matsui, H., and Isobe, K. 1990. Enzymatic synthesis of useful chito-oligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate. Carbohydr. Res. 203: 65–77.
- Vaidya R.J., Shah I.M., Vyas P.R., Chhatpar H.S. 2001. Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential in antifungal biocontrol, World J. Microbiol. Biotechnol. 17 691–696.
- Vaidya, R., Vyas, P., and Chhatpar, H. 2003. Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*. Enzyme Microb. Technol. 33, 92–96.
- Villagomez-Castro JC, Lopez-Romero E. 1996. Identification and partial characterization of three chitinases from *Entamoeba invadans* with emphasis on their inhibition by allosamidin. Antonie Van Leeuwenhoek 70:41–48.
- Vobis, G. 1992. The genus *Actinoplanes* and related genera. In The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application,

2nd edn, vol. 2 (edited by Balows, Trüper, Dworkin, Harder and Schleifer). Springer Verlag, New York, pp. 1029–1060.

Vrba, J., Filandr, P., Nedoma, J., and Simek, K. 1996. “Different sources of extracellular β -N acetyl hexosaminidases-like activities in freshwaters,” in Chitin Enzymology, ed R. A. A. Muzzarelli (Senigallia: Atec Edizioni), 293–301.

Vyas PR, Deshpande MV. 1991. Enzymatic hydrolysis of chitin by *Myrothecium verrucaria* chitinase complex and its utilization to produce SCP. J Gen Appl Microbiol 37:267–275.

Wagman, G.H. and M.J. Weinstein. 1980. Antibiotic from *Micromonospora*. Annu. Rev. Microbiol. 34: 537–557.

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.

Wang Q, Zhou Z-Y, Sakuda S, Yamada Y. 1993. Purification of allosamidin-sensitive and insensitive chitinases produced by allosamidin-producing *Streptomyces*. Biosci Biotech Biochem 57: 467-470.

Wang SL, Chang WT. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozymes extracellularly produced by pseudomonas aeruginosa K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. App. Environ. Microbiol. 63 (2): 380-386.

Wang SL, Yen YH, Tsiao WJ, Chang WT, Wang CL. 2002. Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. Enzyme Microb Technol 31:337–344.

Watson, E.T., Williams, S.T. 1974. Studies on the ecology of actinomycetes in soil—VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. Soil Biol. Biochem. 6, 43–52.

Weyland, H. 1969. Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. Nature 223: 858.

Weyland, H. 1981. Distribution of actinomycetes on the sea floor. Zentrabl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I. Abt. Orig. Suppl. 11: 185–193.

Williamson, N., Brian, P., Wellington, E.M.H. 2000. Molecular detection of bacterial and *streptomycte* chitinases in the environment. Antonie Van Leeuwenhoek 78, 315-321.

Wiwat C, Siwayaprahm P, Bhumiratana A. 1999. Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No. 4.1 Curr. Microbiol., 39 (3), pp. 134-140.

Wohlkonig A, Huet J, Looze Y, Wintjens R. 2010. Structural relationships in the lysozyme superfamily: significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs. PLoS One.

Yabuki, M., Kasai, Y., Ando, A., and Fujii, T. 1984. Rapid method of converting fungal cells into protoplast with a high regeneration frequency. Exp. Mycol. 8: 386–390.

Yan, Q., Fong, S.S. 2015. Bacterial chitinase: nature and perspectives for sustainable bioproduction. Bioresour. Bioprocess.

Yennamalli RM, Rader AJ, Wolt JD, Sen TZ. 2011. Thermostability in endoglucanases is fold-specific. BMC Struct Biol; 11:10.

Yoshida E, Hidaka M, Fushinobu S, Koyanagi T, Minami H, Tamaki H, et al. 2010. Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family beta-glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. Biochem J; 431:39–49.

Yuan W.M. et Crawford D.L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Appl. Env. Microbiol. 61:3119-3128.

Zenova, G. M., Gracheva, T. A., & Likhacheva, A. A. 1994. Actinomycetes of the genus *Micromonospora* in terrestrial ecosystems. Microbiology, 63, 313–317.

Zenova, G.M. and D.G. Zviagintsev. 2002. Actinomycetes of the genus *Micromonospora* in meadow ecosystems. Mikrobiologiya 71: 662–666.

Zenova, G.M., Y.V. Zakalyukina, V.V. Selyanin and D.G. Zvyagintsev. 2004. Isolation and growth of acidophilic soil actinomycetes from the *Micromonospora* genus. Eurasian Soil Sci. 37: 737–742.

ZoBell, C. E., and Rittenberg, S. C. 1938. The occurrence and characteristics of chitinoclastic bacteria in the sea. J. Bacteriol. 35, 275–287.

ANNEXES

ANNEXE : 01

Milieux de culture

Milieu ISP₂

Extrait de levure4 g
Extrait de malt10 g
D-Glucose4 g
Agar20 g
Eau distillée 1000 ml

pH = 7,3

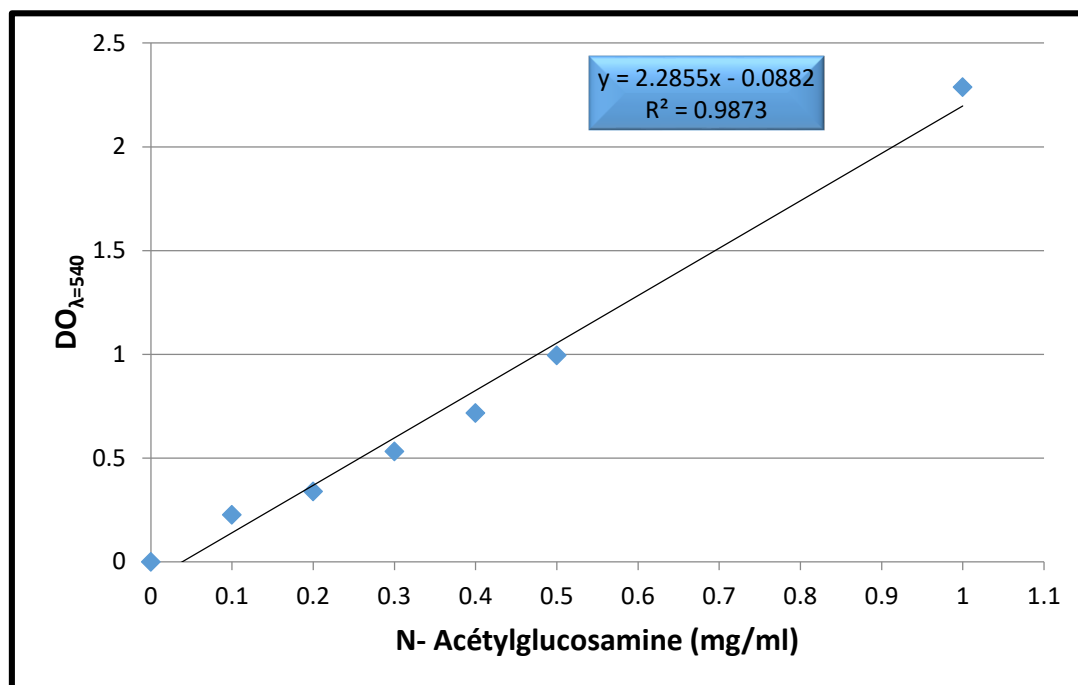
Milieu MCC

Chitine colloïdale..... 0,1 g
KH₂P..... 0,7 g
K₂HPO₄..... 0,3 g
NaCl.....4 g
MgSO₄ · 7H₂O.....0,5 g
FeSO₄ · 7H₂O.....1 mg
ZnSO₄ · 7H₂O.....0,1 mg
MnSO₄ · 7H₂O.....0,1 mg
Agar.....15 g
Eau distillée.....1000 ml

pH = 7,0

ANNEXE: 02

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

ANNEXE: 3

Dosage des protéines (Bradford, 1976)

Composition du réactif de Bradford

Bleu de Coomassie G-250.....100 mg.

Ethanol absolu.....50 ml.

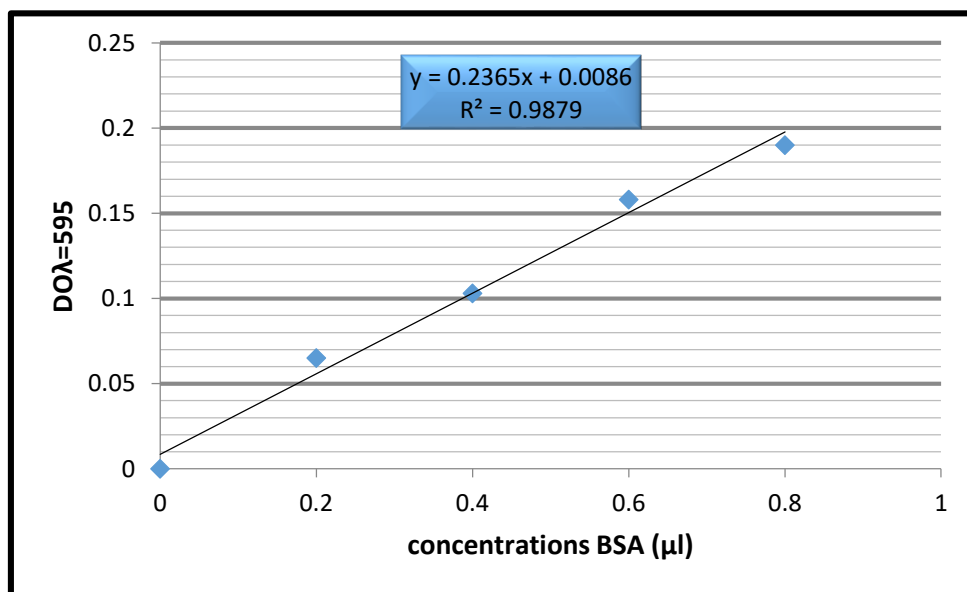
Acide phosphorique à 85%.....100 ml.

Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.

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

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 : 04

Table de Fisher

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993
70	3.978	3.128	2.736	2.503	2.346	2.231	2.143	2.074	2.017	1.969
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951
90	3.947	3.098	2.706	2.473	2.316	2.201	2.113	2.043	1.986	1.938
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927
150	3.904	3.056	2.665	2.432	2.274	2.160	2.071	2.001	1.943	1.894
200	3.888	3.041	2.650	2.417	2.259	2.144	2.056	1.985	1.927	1.878
400	3.865	3.018	2.627	2.394	2.237	2.121	2.032	1.962	1.903	1.854

ANNEXE : 05
Table de *t*-Student

ν	P =0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01
1	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12	0,128	0,260	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756
30	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750
∞	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,96	2,326	2,576

ANNEXE: 06

Tableau de précipitation au sulfate d'ammonium

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

ANNEXE : 07

Préparation des solutions tampons

Tampon acétate de Sodium 50 mM

Acétate de sodium.....4,10 g

Acide acétique glacial.....2,85 ml

Eau distillée stérile.....1000 ml

pH= 5.0

Tampon citrate 0.2M

Dissolution des composants

A : 0.1 M de solution de l'acide citrique

(21.01 g dans 1 L)

B : 0.1 M de solution de citrate de sodium

(29.41 g $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ dans 1L)

A (ml)	B (ml)	pH
46.5	3.5	3.0
33.0	17.0	4.0
20.5	29.5	5.0

Volume total 100 ml.

Tampon sodium phosphate 0.2M

Dissolution des composants

A : 0.2 M de solution de sodium phosphate

monobasique (27,8 g dans 1 L)

B : 0.1 M de solution de sodium phosphate

dibasique (53,65 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ou

71,7 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ dans 1L)

A (ml)	B (ml)	pH
87.7	12.3	6.0
39.0	61.0	7.0
5.3	94.7	8.0

Volume total 200 ml.

Tampon Tris-HCl 0,2M

Dissolution des composants

A : 0.1 M de tris (hydrocymethyl)

aminomethane (24.2 g dans 1 L)

B: 0.2 M HCl, C : 5M NaOH

A (ml)	B (ml)	C	pH
50	5.0	-	9.0
50	-	Ajouté jusqu'à	10
50	-	atteindre le pH	11

Volume total 200 ml.

Résumé

Le but de ce mémoire est de mettre en place un milieu de culture afin d'optimiser la production de la chitinase par la souche *Micromonospora echinospora* C33, en utilisant les plans d'expérience et les méthodes des surfaces de réponse. Cette souche a été précédemment isolée et identifiée à partir d'un sol semi-aride de la région de Laghouat (Algérie). Un premier plan statistique de Plackett-Burman nous a permis d'identifier trois facteurs qui ont un effet significatif sur la production de chitinase. Ces derniers ont fait l'objet d'une optimisation par le plan d'expérience de Box-Behnken couplé à la méthode des RSM. La production maximale de chitinase a été prévue dans un milieu contenant 10% de chitine colloïdale ; 15g/l de peptone ; 5 g/l de galactose, en utilisant les courbes d'iso-réponse du logiciel MINITAB version 17, pour une production maximale de l'enzyme égale à 0,878 U/ml. Ce qui a été confirmé par des cultures en erlenmeyers où la production de la chitinase par *Micromonospora echinospora* C33 a atteint 0,828 U/ml. De ce fait, Le rendement de la production de l'enzyme a été augmenté de 23,42 % après optimisation par rapport au milieu de base 0.194 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 trois étapes majeurs de purification où elle a atteint un seuil de purification de 4,72 ; un rendement de 27,41% et une activité spécifique égale à 3 U/mg. L'activité chitinolytique de l'extrait brut était maximale à 30 °C et à pH 8,0. Ces résultats peuvent constituer une base importante pour les applications industrielles.

Les mots clés : Chitinase ; *Micromonospora echinospora* C33 ; Plackett-Burman ; Box-behnken ; purification ; caractérisation partielle.