

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA
Faculté de Technologie
Département de Chimie Industrielle

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie Industrielle

ETUDE DES MECANISMES ET DES FACTEURS DE LA
BIODEGRADATION DES ACIDES HUMIQUES SOUS L'EFFET
DES PEROXYDASES LIBEREES PAR DES BACTERIES
MYCELIENNES ISOLEES LOCALEMENT.

Par

Djamila FODIL épouse LOUZRI

Devant le jury composé de :

| | | | |
|-------------------|--------------------------|---------------------------------|------------|
| F. SAIDI | Professeur | Université Saad Dahlab de Blida | Présidente |
| A. AOUABED | Professeur | Université Saad Dahlab de Blida | Examineur |
| M. BOUDJENIBA | Professeur | ENS- Kouba | Examineur |
| R. FOURAR EL-AIDI | Maître de conférence (A) | ENS- Kouba | Examineur |
| A.RIBA | Maître de conférence (A) | Université de Boumerdes | Examineur |
| A. BADIS | Professeur | Université Saad Dahlab de Blida | Directeur |

Blida, Juillet 2013

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Industrielle (LBMI) du Département de Chimie Industrielle, Faculté de Technologie, Université Saàd Dahlab-Blida (USDB) et au Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules (LMB) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS, Tunisie).

La présente étude a été effectuée sous la direction de Monsieur BADIS Abdelmalek, Professeur à USDB. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir suivi de près tout au long de la partie expérimentale et durant la rédaction des articles et de la thèse. Je lui exprime toute ma reconnaissance et mes remerciements les plus vifs.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à Monsieur le professeur BEJAR Samir, directeur du laboratoire LMB (CBS, Tunisie), pour son accueil dans son laboratoire pour faire une grande partie de l'expérimentation.

Je remercie très sincèrement Madame SAIDI Feyrouz, Professeur à USDB, de m'avoir honoré de présider mon jury de thèse.

Je remercie infiniment Monsieur AOUABED Ali, Professeur à USDB, d'avoir accepté de juger ce présent travail.

J'exprime mes profonds remerciements à Monsieur RIBA Amar, Maître de Conférences à l'université de Boumerdes, d'avoir accepté d'être membre examinateur dans le jury de la thèse.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Monsieur BOUDJENIBA Messaoud, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger, et à Monsieur FOURAR EL-AIDI Rabah, Maître de Conférences dans la même Ecole, qui ont accepté d'être membres de ce jury.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Monsieur JAOUADI Bassem, Docteur au LMB (CBS, Tunisie) pour sa bienveillance, sa disponibilité permanente, ses qualités humaines et scientifiques, pour ses précieux et judicieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

De même titre, je tiens à remercier Madame ZARAI JAOUADI Nadia, chercheuse au LMB de m'avoir fait bénéficier de son expérience et de ses connaissances scientifiques tout au long de mon stage.

En fin, je tiens à remercier vivement mes collègues enseignants et amis : Mme. Benguerouira, Mme. Alliouche, Mme. Aggoun, Mme. Belal, et Mr Eddouaouda pour leurs conseils qui n'ont jamais cessé pendant ce travail de recherche.

ملخص

تضمن الجزء الأول من هذه الدراسة عزل سلالة سترپتوميسات (شفت بـ AM2) من عينة تربة جزائرية من منطقة متيجة. تمتاز هذه السلالة بمقدرتها على إزالة اللون الداكن لوسط يحتوي على 0.5% من الأحماض الهيومية وبوجود آثار من الجلوكوز. تعتبر هذه المركبات مصدرا للمواد المسرطنة التي يمكن تواجدها في المياه الصالحة للشرب. أعطت هذه السلالة نشاطا إنزيميا من نوع البيروكسيداز، وبالتالي فقد أختيرت للدراسات اللاحقة وتم تحديدها بناء على معرفة تسلسل الجين المشفر لـ ARN 16S .

تم تنقية نوعين من البيروكسيداز HaP1 و HaP2 من السلالة *Streptomyces sp AM2* واستنادا على التحليل الطيفي الكتلي MALDI – TOF تم تحديد الكتل الجزيئية لهذين الإنزيمين بـ 40351.11 و 25175.19 دالتون على التوالي واعتبارهما أحاديي التركيب.

تم تحديد تسلسل الأحماض الأمينية -NH₂-الطرفية لكل من HaP1 و HaP2 فكانت على الترتيب، AQCANATTVSDEACCVLLP و ATCADGTTVANDACCVLFPILDNQ و تم تحديد قيم نشاطيهما الأمثلين عند pH 6.0 و 7.5 على التوالي. أظهرت التجارب القياسية على ركيزة 2,4-dichlorophénol (2,4-DCP) أن للإنزيمين نشاط أقصى عند درجة حرارة 55 °م. كان HaP2 مستقرا لمدة 24 سا عند 55 °م و نصف حياة لمدة 90 دقيقة عند 65 °م. نشير كذلك أن الكبريتة التأكسدية لكل من HaP1 و HaP2 متشابهة ولكن درجة الإستقرار وقيم RZ كانت مختلفة تماما. وُجدَ بأن الإنزيمين يحتويان على بروتينات الهيم والتي تؤكسد مجموعة عريضة من الركائز بوجود الماء الأكسجيني مع تخصص أكبر لـ HaP2.

أظهر كل من الإنزيمين نشاطا اتجاه الأحماض الهيومية، جياكول، 2,4-DCP، 3,4-dichlorophénols، 2,4,5-trichlorophénols، و H₂O₂. تتعاون هذه البروكسيدازات من أجل التفكيك الكلي للأحماض الهيومية، فيمكن أن تلعب دورا مهما في تحولات المواد الهيومية في التربة وخاصة في إزالة الأحماض الهيومية الموجودة في المياه الصالحة للشرب وذلك باستعمال طرق المعالجة النهائية في المفاعلات البيولوجية.

الكلمات المفتاحية : الأحماض الهيومية – التحلل الحيوي – السترپتوميسات – البروكسيداز.

RESUME

Une étude préliminaire a consisté l'isolement d'une souche de Streptomycètes codée AM2 à partir d'un échantillon du sol algérien de la région de Mitidja. Cette souche a la caractéristique de décolorer le milieu contenant 0,5% d'acides humiques (AHs) en présence des traces du glucose. Ces macromolécules (AHs) sont à l'origine des THM, substances très toxiques cancérigènes par fois retrouvées dans les eaux potables. La souche AM2 a donné une activité enzymatique de type peroxydases, très significative et par voie de conséquence, elle a été sélectionnée pour une étude ultérieure d'identification en se basant sur le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S.

Ainsi, à partir de cette souche, deux peroxydases HaP1 et HaP2 ont été purifiées. Ces deux enzymes ont été déterminées comme des monomères ayant respectivement les masses moléculaires de 40351,11 et 25175,19 Da en se basant sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Les séquences des acides aminés « N-terminal » de l'HaP1 et de l'HaP2 ont été identifiées respectivement, AQCANATTVSDEACCVLLP et ATCADGTTVANDACCVLFPILDNQ et leurs valeurs optimales d'activité du pH sont respectivement 6 et 7,5.

Les essais standards sur le substrat 2,4-dichlorophénol (2,4-DCP) ont montré que les deux enzymes ayant une activité maximale à 55 °C. HaP2 était stable à 55 °C pour plus de 24 h et avait une demi-durée de vie de 90 min à 65 °C. Bien que les propriétés catalytiques et l'énantioselectivité dans la sulfoxydation de HaP1 et de HaP2 sont presque identiques, mais leur stabilités et leur valeurs de Reinheitszahl (RZ) étaient considérablement différentes.

Les deux peroxydases sont des hémoprotéines qui catalysent l'oxydation d'une large gamme de substrats en présence de peroxyde d'hydrogène, avec un éventail plus large de la spécificité de substrat démontrée par HaP2.

Les deux peroxydases ont montré une activité contre les AHs, le guaiacol, le 2,4-DCP, le 3,4-dihydroxyphénylalanine, chlorophénols, 2,4,5-trichlorophénols en présence de peroxyde d'hydrogène.

Ces peroxydases en combinaison synergique présentaient des activités de dégradation puissantes qui leur ont permis d'accomplir la dégradation totale des acides humiques et donc peuvent jouer un rôle important dans les transformations de l'humus dans le sol et surtout dans l'élimination des AHs présents dans les eaux potables par l'utilisation des voies de traitement de finitions en bioréacteurs.

Mots clés : Acides Humiques – Biodégradabilité – Streptomycètes – Peroxydases.

ABSTRACT

A preliminary study involved the isolation of streptomycetes strain coded AM2 from an Algerian soil sample at Mitidja region. This strain has the discoloration characteristic of the medium containing 0.5% humic acid (HAs) in the presence of traces of glucose. These macromolecules (HAs) are at the origin of THMs, highly toxic carcinogens found in drinking water. This strain AM2 gave an enzymatic activity such as peroxidases, very significant and consequently she was selected for further study identification based on sequencing of the gene encoding for the ARN 16S.

Thus, two extracellular peroxidases called HaP1 and HaP2 were isolated from the *Streptomyces* sp. strain AM2 and, based on MALDI-TOF analysis, the purified enzymes were determined as monomers with molecular masses of 40351.11 and 25175.19 Da, respectively.

The N-terminal amino acid sequences of HaP1 and HaP2 were identified, and their optimum pH values were determined to be 6 and 7.5, respectively. Standard 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) assays showed that both enzymes had maximal activity at 55 °C. HaP2 was stable at 55 °C for more than 24 h and had a half-life of 90 min at 65 °C. Although the catalytic properties and the enantioselectivity in sulfoxidations of HaP1 and HaP2 were nearly identical, the stabilities and the Reinheitszahl (RZ) values were substantially different. Both peroxidases were found to be heme proteins that catalyzed the oxidation of a wide range of substrates in the presence of hydrogen peroxide, with a broader range of substrate specificity being exhibited by HaP2. The characterization of peroxidase activity revealed activity against HAs, guaiacol, 2,4-DCP, 1-3,4-dihydroxyphenylalanine, 2,4,5-trichlorophenol and other chlorophenols in the presence of hydrogen peroxide.

These peroxidases in synergistic combination showed strong degradation activities that allowed them to accomplish the complete degradation of HAs and thus may play an important role in the transformation of humus in the soil and especially in the elimination of humic acids present in drinking waters by using finishes processing pathways in bioreactors.

Keywords: Humic Acids – Biodegradation – Streptomycetes – Peroxidases.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| Introduction générale..... | 16 |
| CHAPITRE 1 : ACIDES HUMIQUES : Formation, Structure, Rôle et Biodégradabilité..... | 19 |
| 1.1. Formation des AHs dans les milieux naturels..... | 19 |
| 1.1.1.Introduction..... | 19 |
| 1.1.2.Humification..... | 19 |
| 1.1.2. 1.Théorie de la lignine (voie 1)..... | 20 |
| 1.1.2. 2.Théorie des polyphénols (voies 2 et 3)..... | 21 |
| 1.1.2.3.Théorie de la condensation amino-saccharidique (voie 4)..... | 22 |
| 1.1.3. Agents d'humification..... | 23 |
| 1.1.4. Résistances des substances humiques à la biodégradation..... | 24 |
| 1.1.4.1.Fraction labile..... | 24 |
| 1.1.4.2.Fraction de stabilité moyenne..... | 25 |
| 1.1.4.3.Fraction très stable..... | 25 |
| 1. 2. Caractéristiques structurales et chimiques des acides humiques..... | 26 |
| 1.2.1. Modèles structuraux des acides humiques..... | 27 |
| 1.2.2. Extraction et purification des acides humiques à partir du sol..... | 29 |
| 1.2.3. Nature des acides humiques extraits à partir de l'eau de surface..... | 30 |
| 1.3. Biodégradation des acides humiques..... | 32 |
| 1.4. Rôle des acides humiques..... | 35 |
| 1.5. Effet néfaste des acides humiques sur l'eau potable..... | 36 |
| 1.5.1. Concentration des THM dans l'eau potable..... | 37 |
| 1.5.2. Exposition de la population aux THM..... | 37 |
| 1.5.2.1. Effet cancérigènes des THM..... | 37 |
| 1.6.Conclusion..... | 38 |
| CHAPITRE 2 : STREPTOMYCETES : Microorganismes d'intérêt..... | 39 |
| 2.1.Introduction..... | 39 |

| | |
|--|----|
| 2.2. Différenciation morphologique des streptomycètes..... | 39 |
| 2.3. Cycle de développement des streptomycètes..... | 40 |
| 2.4. Identification des streptomycètes..... | 41 |
| 2.5. Métabolisme des streptomycètes..... | 42 |
| 2.6. Substances bioactives produites par les streptomycètes..... | 42 |
| 2.6.1. Streptomycètes producteurs d'antibiotiques..... | 43 |
| 2.6.2. Streptomycètes : Producteurs d'enzymes de dégradation..... | 44 |
| 2.6.2.1. Enzymes de dégradation des composés organiques naturels..... | 44 |
| 2.6.2.2. Enzymes de dégradation des composés organiques de synthèse..... | 45 |
| 2.7. Matériel génétique des streptomycètes..... | 45 |
| 2.8. Conclusion..... | 46 |

CHAPITRE 3 : PEROXYDASES : Roles dans la biotechnologie industrielle et environnementales.....

| | |
|--|----|
| 3.1. Introduction..... | 47 |
| 3.2. Importance des peroxydases..... | 48 |
| 3.3. Nomenclature et classification des peroxydases..... | 49 |
| 3.4. Activité biologique des peroxydases..... | 50 |
| 3.5. Activité chimique des peroxydases..... | 50 |
| 3.6. Peroxydases hémiques..... | 51 |
| 3.6.1. Interactions structurales entre l'hème (Hème) et son environnement protéique..... | 51 |
| 3.7. Peroxydases de lignine..... | 53 |
| 3.8. Peroxydases à Manganèses..... | 56 |
| 3.9. Peroxydases versatiles..... | 58 |
| 3.10. Conclusion..... | 59 |

CHAPITRE 4 : MATERIEL ET METHODES.....

| | |
|---|----|
| 4.1. Site d'étude et échantillonnage..... | 61 |
| 4.2. Extraction et caractérisation des acides humiques..... | 61 |
| 4.2.1. Extraction des acides humiques..... | 61 |
| 4.2.2. Préparation et purification des acides humiques..... | 62 |
| 4.2.3. Caractérisation des acides humiques..... | 62 |

| | |
|---|----|
| 4.2.3.1. Par spectroscopie UV-visible et détermination du rapport E_{465}/E_{665} | 62 |
| 4.2.3.2. Par spectroscopie infrarouge..... | 63 |
| 4.2.3.3. Par microscope électronique à balayage..... | 63 |
| 4.3. Isolement des souches de streptomycètes..... | 63 |
| 4.3.1. Milieu d'isolement..... | 63 |
| 4.3.2. Technique d'isolement et incubation..... | 64 |
| 4.3.3. Choix des isolats de streptomycètes..... | 64 |
| 4.3.4. Purification et conservation des streptomycètes..... | 64 |
| 4.4. Sélection des souches de streptomycètes à fort potentiel dégradatif des AHs..... | 65 |
| 4.5. Quantification des AHs dans le milieu de culture..... | 65 |
| 4.6. Identification phénotypique de la souche sélectionnée..... | 66 |
| 4.6.1. Etude morphologique..... | 66 |
| 4.6.2. Etude chimique des constituants cellulaires..... | 66 |
| 4.6.3. Etude physiologique et biochimique..... | 68 |
| 4.7. Identification génotypique par la technique ARN 16S..... | 69 |
| 4.7.1. Extraction de l'ADN génomique (ADNg) à partir de la souche AM2..... | 69 |
| 4.7.2. Électrophorèse sur gel d'agarose..... | 70 |
| 4.7.3. Dosage de l'ADN..... | 71 |
| 4.7.3.1. Méthode spectrophotométrique..... | 71 |
| 4.7.3.2. Méthode utilisant la fluorescence émise par le BET (méthode empirique)..... | 71 |
| 4.7.4. Purification de fragments d'ADN par la méthode d'élution..... | 71 |
| 4.7.5. Amplification génique de l'ADN ou technique PCR..... | 72 |
| 4.7.6. Séquençage de l'ADNr 16S et analyse phylogénétique..... | 73 |
| 4.8. Cinétique d'élimination et de biodégradation des AHS durant l'incubation..... | 73 |
| 4.9. Procédure de purification des peroxydases produites par la souche AM2..... | 74 |
| 4.9.1. Extraction de peroxydase..... | 74 |
| 4.9.1.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium..... | 74 |
| 4.9.1.3. Filtration sur gel-Sephacryl S200..... | 75 |
| 4.9.1.4. Chromatographie échangeuse d'anions sur Q-Sepharose..... | 75 |
| 4.9.2. Dosage de l'activité peroxydase..... | 76 |
| 4.9.3. Méthodes analytiques des peroxydases..... | 77 |
| 4.9.3.1. Dosage des protéines peroxydasiques par la méthode de Bradford..... | 77 |

| | |
|---|-----------|
| 4.9.3.2. Séparation des peroxydases sur gel d'acrylamide..... | 78 |
| 4.9.3.3. Détermination des extrémités NH ₂ -terminales par la méthode d'Edman..... | 78 |
| 4.9.3.4. Spectrométrie de masse MALDI-TOF..... | 79 |
| 4.10. Caractérisation physicochimique de la peroxydase..... | 80 |
| 4.10.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité des peroxydases..... | 80 |
| 4.10.2. Température optimale et stabilité thermique des peroxydases..... | 81 |
| 4.10.3. Effet des inhibiteurs et des ions de métaux lourds..... | 81 |
| 4.10.4. Spécificité du substrat..... | 81 |
| 4.10.5. Effets de la concentration de H ₂ O ₂ sur la stabilité des peroxydases..... | 82 |
| 4.10.6. Dosages par les méthodes spectrales..... | 83 |
| 4.10.7. Sulfoxydation catalytique de peroxydases..... | 83 |
| CHAPITRE 5 : RESULTATS ET DISCUSSION..... | 84 |
| 5.1: Isolement et identification d'une souche a fort potentiel dégradatif des acides humiques..... | 84 |
| 5.1.1. Caractérisations des acides humiques..... | 84 |
| 5.1.1.1. Spectroscopie UV-visible et Rapport E ₄₆₅ / E ₆₆₅ | 84 |
| 5.1.1.2. Par Spectroscopie infrarouges..... | 86 |
| 5.1.1.3. Par microscope Electronique à Balayage (MEB)..... | 89 |
| 5.1.2. Isolement et sélection des souches de streptomycètes à fort potentiel dégradatif des AHs..... | 91 |
| 5.1.3. Identification phénotypique des souches sélectionnées..... | 91 |
| 5.1.3.1. Etude morphologique..... | 91 |
| 5.1.3.2. Etude chimiotaxonomique..... | 92 |
| 5.1.3.3. Etude physiologique et biochimique..... | 92 |
| 5.1.4. Identification génotypique par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S..... | 93 |
| 5.1.5. Conclusion..... | 95 |
| 5.2. Biodégradation des AHs par la souche AM2..... | 95 |
| 5.2.1. Cinétique de biodégradation des acides humiques extraits..... | 95 |
| 5.2.2. Changements de structure d'acides humiques pendant l'incubation..... | 98 |
| 5.2.3. Génération des métabolites de dégradation..... | 99 |
| 5.2.4. Conclusion..... | 99 |

| | |
|--|------------|
| 5.3. Caractérisation biochimique et moléculaire des peroxydases produites par AM2..... | 100 |
| 5.3.1. Purification des peroxydases HaP1 et HaP2..... | 100 |
| 5.3.2. SDS/PAGE et zymogramme..... | 102 |
| 5.3.3. Détermination de la taille par MALDI-TOF..... | 103 |
| 5.3.4. Séquençage de l'extrémité NH ₂ -terminale de HaP1 et HaP2..... | 103 |
| 5.3.5. Effet des inhibiteurs et des ions métalliques sur l'activité de HaP1 et HaP2..... | 105 |
| 5.3.6. Effet du pH sur l'activité et la stabilité des peroxydases HaP1 et HaP2.... | 107 |
| 5.3.7. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de HaP1 et HaP2..... | 109 |
| 5.3.8. Spécificité du substrat pour HaP1 et HaP2..... | 110 |
| 5.3.9. Activité de HaP1 et HaP2 en fonction de la concentration de H ₂ O ₂ | 110 |
| 5.3.10. Caractérisation spectrale du cofacteur à hème..... | 112 |
| 5.3.11. Énantiosélectivité de HaP1 et HaP2..... | 114 |
| 5.3.12. Conclusion..... | 114 |
| Discussion générale..... | 116 |
| CONCLUSION GENERALE..... | 119 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 122 |
| ANNEXE..... | 145 |

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Schéma simplifiant les voies de formation des substances humiques. | 20 |
| Figure 2a : Structure moléculaire de la lignine. | 20 |
| Figure 2b : Trois unités phénylpropanoïdes de la lignine. | 21 |
| Figure 3 : Schéma simplifiant la théorie de polyphénols de formation des substances humiques. | 22 |
| Figure 4 : Schéma simplifiant la voie de condensation de sucres et acides aminés. | 23 |
| Figure 5 : Modèle structural des acides humiques selon Stevensen (1982). | 28 |
| Figure 6 : Dernier modèle de la structure des AHs proposé par Grinhut <i>et al.</i> (2007). | 28 |
| Figure 7 : Mécanismes de biodégradation des AHs et de la lignine par les champignons. | 34 |
| Figure 8 : Mécanismes de biodégradation et transformation des SHs. | 34 |
| Figure 9 : Streptomycètes : Bactéries filamenteuses. | 39 |
| Figure 10 : Isolement des streptomycètes à partir du sol. | 40 |
| Figure 11 : Cycle de différenciation chez les streptomycètes. | 40 |
| Figure 12 : Modèle d'une peroxydase du raifort. | 50 |
| Figure 13 : Structure de la peroxydase à hème du navet. | 52 |
| Figure 14 : Structure du complexe acide benzhydroxamique, l'hème, le calcium et les acides aminés chez les peroxydases. | 52 |
| Figure 15 : Structure de la peroxydase du navet. | 53 |
| Figure 16 : Structure d'une peroxydase de lignine fongique. | 54 |
| Figure 17 : Structure en ruban des peroxydases à Mn de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . | 56 |
| Figure 18 : Structure en ruban de la peroxydase versatile. | 58 |
| Figure 19 : Spectre UV-visible de l'AHS. | 84 |
| Figure 20 : Spectre UV-visible de l'AHC. | 85 |
| Figure 21 : Spectre infrarouge de l'AHS. | 86 |
| Figure 22 : Spectre infrarouge de l'AHC. | 87 |
| Figure 23 : Morphologie des AHS extraits du sol de Meftah et des AHC. | 89 |
| Figure 24 : Spectres d'éléments majeurs présents dans l'échantillon d'AHS. | 90 |

| | |
|---|-----|
| Figure 25 : Spectres d'éléments majeurs présents dans l'échantillon d'AHC..... | 90 |
| Figure 26 : Mycélium aérien sur ISP2..... | 92 |
| Figure 27 : Mycélium du substrat sur ISP2..... | 92 |
| Figure 28 : Observation par microscope optique des spores exogènes sur le MA de la souche AM2..... | 92 |
| Figure 29 : Analyse du produit PCR de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche AM2..... | 93 |
| Figure 30 : Carte de restriction du plasmide pAM2-16S..... | 94 |
| Figure 31 : Arbre phylogénétique de la souche AM2..... | 95 |
| Figure 32 : Cinétique d'élimination des AHS par la souche AM2..... | 96 |
| Figure 33 : Cinétique de biodégradation des AHS par AM2..... | 96 |
| Figure 34 : Spectres IR des AHs incubés avec la souche AM2 pendant 28 jours à 30 °C..... | 98 |
| Figure 35 : Les sous produits de dégradation des AHS détectés par HPLC..... | 99 |
| Figure 36 : Profile de purification des peroxydases HaP1 et HaP2 de AM2..... | 101 |
| Figure 37 : Analyse par SDS/PAGE de HaP1 et HaP2..... | 103 |
| Figure 38a : Effet du pH sur l'activité des peroxydases HaP1 et HaP2..... | 107 |
| Figure 38b : Effet du pH sur la stabilité des peroxydases HaP1 et HaP2..... | 108 |
| Figure 39a : Effet de la température sur l'activité des peroxydases HaP1 et HaP2.... | 108 |
| Figure 39b : Effet de la température sur la stabilité de HaP1..... | 109 |
| Figure 39c : Effet de la température sur la stabilité de HaP2..... | 109 |
| Figure 40 : Effet de la concentration de H ₂ O ₂ sur l'activité de HaP1 et HaP2... | 111 |
| Figure 41 : Cycle catalytique de la peroxydase..... | 112 |
| Figure 42 : Spectres UV/Vis des peroxydases HaP1(a) et HaP2 (b)..... | 113 |
| Tableau 1 : Propriétés générales des AHs et leurs effets dans le sol..... | 36 |
| Tableau 2 : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les streptomycètes..... | 43 |
| Tableau 3 : Molécules bioactives produites par les microorganismes..... | 44 |
| Tableau 4 : Les séquences des différents oligonucléotides utilisés dans cette étude pour les amplifications du gène de l'ARN 16S de la souche AM2..... | 69 |
| Tableau 5 : Rapports E ₄₆₅ / E ₆₆₅ calculés pour les deux différents AHs analysés.. | 85 |
| Tableau 6 : Bandes d'absorption (en cm ⁻¹) et vibrateurs associés des AHs étudiés..... | 88 |
| Tableau 7 : Pourcentage atomique approximatif des éléments majeurs présents dans AHS et AHC..... | 90 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 8 : Etapes de purification des peroxydases HaP1 et HaP2 de la souche AM2..... | 102 |
| Tableau 9 : Les sequences N-terminales des 19 et 24 acides aminés respectifs de HaP1 et HaP2..... | 104 |
| Tableau 10 : Effet des inhibiteurs sur l'activité de HaP1 et HaP2..... | 106 |
| Tableau 11 : Pourcentage de l'énantiosélectivité obtenue par oxydation énantioselective des sulfures aromatiques..... | 114 |

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : acide désoxyribonucléique
- AHS** : Acides humiques extraits du sol
- AHC** : Acides humiques commercialisés
- Amp** : ampicilline
- ARN** : acide ribonucléique
- BET** : Bromure d'éthidium
- CPG**: chromatographie en phase gazeuse
- Da** : Dalton
- DO** : densité optique
- DyP** : dye de-colourising peroxidase
- E.C.** : Enzyme classification
- EDTA** : Ethylène Diamine Tétracétique Acid
- G** : guanine
- G+C**: Guanine + Cytosine
- HPLC** : High Performance Liquid Chromatography
- IUBMB** : International Union of Biochemistry and Molecular Biology
- IHSS** : International Humic Substances Society
- kDa** : kilodalton
- L-DHPA** : dihydroxyphénylalanine
- MLP** : milieu liquide pauvre
- MM** : Masse moléculaire
- PCR** : polymerase chain reaction
- pH**: potentiel Hydrogène
- picomole** : 1.0×10^{-6} micromoles
- rpm** : rotations par minute
- SAB** : Serum Albumine Bovine
- SDS** : sodium dodecyl sulfate
- sec**: seconde
- Structure 3D** : structure tridimensionnelle
- THM** : Tri-Halo-Méthane
- U** : Unité
- UI** : Unité Internationale
- UV** : Ultraviolet
- µmol** : micromole

INTRODUCTION GENERALE

Les substances humiques (SHs) sont des composés organiques naturelles les plus répandus dans les environnements terrestres et aquatiques dont la fraction majeure est représentée par les acides humiques (AHs) [1] [2].

Ces macromolécules peuvent être définies comme un ensemble de composés électro-négatifs, riches en carbone, de taille variable, de nature polycondensée et résistante à la biodégradation [3]. Ils sont connus par leurs effets physiques, chimiques et biologiques sur le sol et l'ensemble des écosystèmes [4]. La conformation spatiale de la structure harmonieuse des AHs détermine leurs caractéristiques chimiques et physiques [5] [6]. Cependant, la nature de cette structure ainsi que la compréhension des processus responsables de leur biodégradation est encore fait l'objet de plusieurs débats scientifiques [7] [8].

Les processus responsables de la minéralisation et de la biodégradation des AHs sont presque totalement méconnus. Les premières recherches concernant la biodégradabilité des AHs ont été réalisées à l'aide des champignons. Des travaux plus récents ont été aussi effectués sur les mécanismes et les paramètres qui influent sur la biodégradation des AHs dans différents milieux [8]. Par contre, peu d'études ont été publiées sur l'emploi des souches bactériennes et d'actinomycètes dans le domaine de la dégradation des AHs [9] [10].

Au fait, les thématiques de recherche sur les AHs se résument sur deux points essentiels, l'étude de la structure, d'une part et, de comprendre les processus de leur biodégradation, d'autre part. Ainsi, du point de vue application environnementale, les efforts des laboratoires spécialisés s'appuient sur les possibilités d'éliminer ces macromolécules présentes dans les eaux destinées à la production de l'eau potable et qui sont à l'origine de sérieux problèmes liés à la santé du consommateur (formation des substances cancérigènes de type THM, au cours des étapes de désinfection par chloration et l'apparition d'une maladie chronique touchant les os longs suite à la consommation directe des eaux de surface riches en AHs) [11].

Dans ce contexte, les peroxydases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et utilisé en biotechnologie environnementale et qui peuvent répondre aux besoins spécifiques liés à un procédé de traitement de finition appliqué aux eaux potables. Par ailleurs, la purification de nouvelles peroxydases à partir des streptomycètes pourrait, donc, ouvrir de nouvelles perspectives pour mieux les adapter en vue d'un usage industriel moins onéreux et exploré.

En Algérie, les travaux sur la biodégradation des AHs ont été entrepris depuis les années 1992 [12] [12] et poursuivis par [14] et [15] [16]. En addition, le peu de données disponibles sur la caractérisation et la purification des peroxydases à partir de streptomycètes, actives dans la biodégradation des AHs, nous a incité à entreprendre ce sujet de recherche.

A cet effet, les principaux objectifs de ce présent travail de recherche sont :

- Criblage et sélection des souches de streptomycètes à fort potentiel dégradatif des AHs.
- Purification et caractérisation biochimique et moléculaire des peroxydases responsables de la dégradation de ces macromolécules.
- Etude des propriétés physicochimiques et cinétiques des peroxydases et leurs rôles individuels et synergiques dans la biodégradation des acides humiques naturels.

Ce présent manuscrit s'articule autour de trois parties :

La première partie est une approche bibliographique permettant de replacer les connaissances de bases et le contexte de l'étude. A cet effet, de nombreux points de la thématique sur les substances humiques et leur biodégradabilité ont été abordés aussi bien sur leur aspect fondamental qu'appliqué. Une recherche bibliographique succincte a été faite sur les streptomycètes, leur taxonomie et leur importance. Egalement, nous traitons ici les peroxydases en tant que biomolécules d'intérêt et, surtout leurs applications en technologie industrielle et environnementale. Nous présentons dans la deuxième partie de la thèse le matériel et les méthodes utilisés pour concrétiser l'expérimentation. Une description détaillée de différents protocoles expérimentaux a été effectuée ainsi

que des annexes ont été mis à la fin de la thèse pour mieux préciser les techniques et les méthodes employées.

La troisième partie présentera les résultats obtenus ainsi que les interprétations et discussions qu'ils peuvent susciter. Cette partie renferme les résultats relatifs à l'extraction et à la caractérisation des acides humiques et aussi pour l'isolement et l'identification de la souche à fort potentiel dégradatif des AHs. Puis nous présentons les résultats de la cinétique de dégradation des AHs avec la mise en évidence des produits générés lors de cette biodégradation. Nous clôturons cette partie par les résultats sur les peroxydases : Purification et caractérisation physico-chimique et biochimique.

Enfin, en guise de conclusion générale nous synthétisons les résultats acquis et dégagerons les perspectives de la poursuite de ce travail de recherche.

CHAPITRE 1 : ACIDES HUMIQUES : Formation, structure, rôle et biodégradabilité

1.1. Formation des AHs dans les milieux naturels

1.1.1. Introduction

La matière organique fraîche (MOF), formée de déchets végétaux, animaux et microbiens des sols, constitue la matière première de l'humus. Ces biomolécules de types polyphénols, carbohydrates, protéines et lipides se décomposent tout d'abord sous l'action de microorganismes pour former la matière organique (MO) du sol. Cette MO s'incorpore lentement dans les sols par le processus d'humification qui conduit à la formation d'une MO stable appelée "humus" [17] .

Les matières humiques proviennent de la décomposition et de la réorganisation des MO contenues dans les sols [18]. Les agents microbiens présents dans le sol jouent un rôle crucial dans l'humification des matières organiques [19] .

1.1.2. Humification

Les substances humiques (SHs) sont le résultat de l'humification qui est simplifiée par le schéma représenté dans la figure 1. Celle-ci résulte soit de la néoformation de composés humiques à partir des composés organiques du sol, soit de l'héritage et de la transformation des biomolécules du sol.

Pour les pédologues, l'humification est la transformation de l'humus libre en humus lié. Pour les biochimistes, l'humification est un phénomène de polycondensation oxydative conduisant à des substances brunes, présentes aussi bien dans l'humus libre que dans l'humus lié [20] [21] [22].

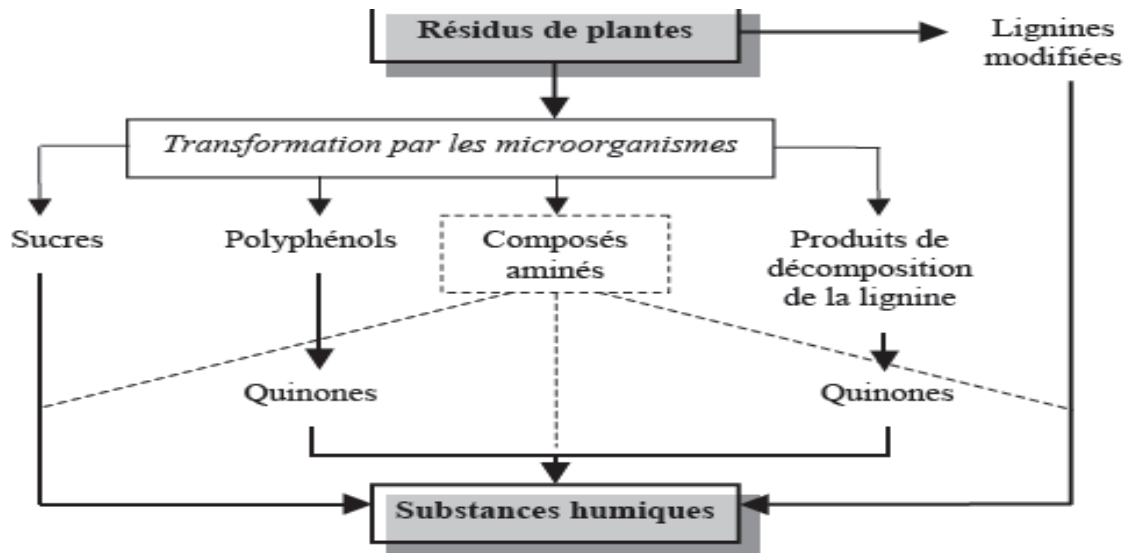


Figure 1 : Schéma simplifiant les voies de formation des substances humiques [23].

Actuellement, trois théories ont été mises pour expliquer la formation des substances humiques :

1.1.2. 1 Théorie de la lignine (voie 1)

La lignine, difficilement biodégradable, est formée d'un assemblage de trois unités phénylpropanoïdes reliées entre elles par différents liaisons de type carbone et éther oxydes (Figure 2, a et b).

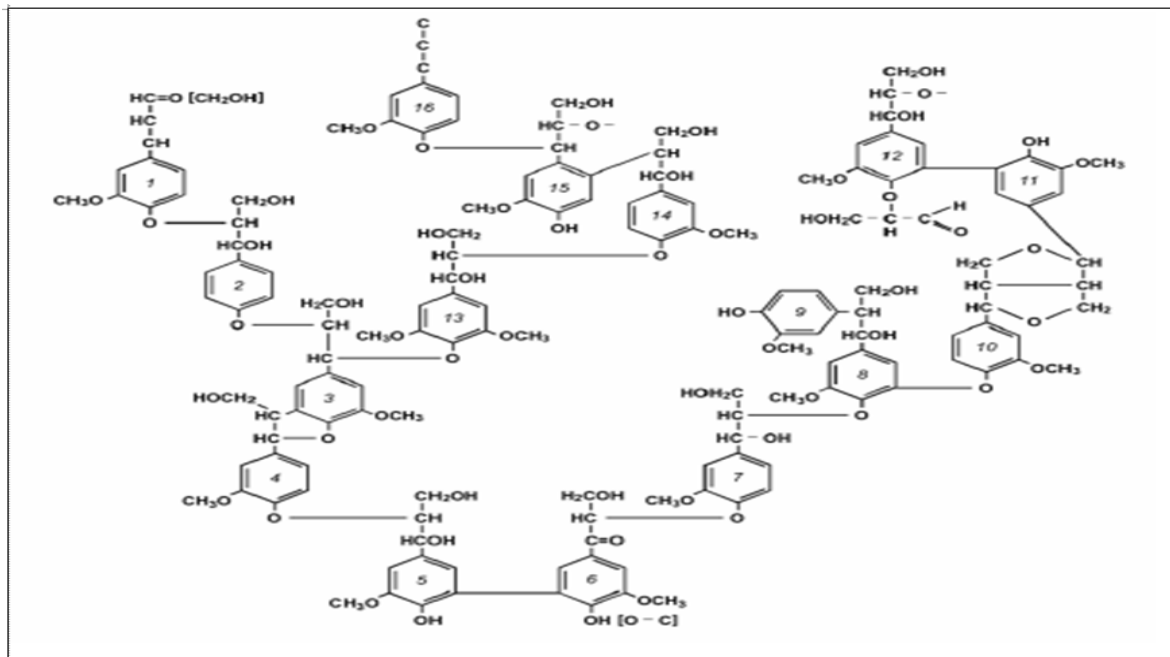


Figure 2 a : Structure de la lignine selon [24].

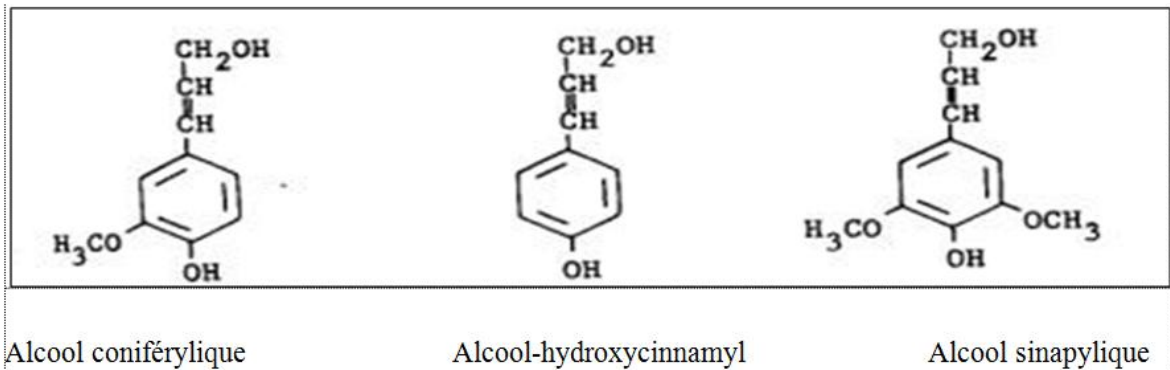


Figure 2 b : Trois unités phénylpropanoïdes de la lignine.

Pendant plusieurs années, la formation des SHs a été attribuée principalement à une modification de la lignine. Selon cette théorie, le résidu de la lignine, issu par dégradation microbienne incomplète, constitue le squelette de l'humus [25].

La modification de la lignine consiste en la perte des groupements méthoxyles (OCH₃), en la production d'ortho-hydroxyphénols et en l'oxydation des chaînes aliphatiques périphériques pour former les groupements carboxyliques libres (COOH). Ce matériel modifié, est soumis à d'autres changements inconnus pour former d'abord les AHs et ensuite les acides fulviques (AF) [26].

Cette voie de la théorie lignoprotéique de Waksman [27] est justifiée par des similitudes existantes entre la lignine et les AHs telles que : Une biodégradabilité faible par la majorité des champignons et des bactéries, une solubilité dans les alcalins et différents solvants et une présence de groupements méthoxyles [19] [28].

1.1.2. 2. Théorie des polyphénols (voies 2 et 3)

Dans la voie 2 (figure 3), les acides et les aldéhydes phénoliques issus de la lignine pendant l'attaque microbienne sont convertis en quinones par des enzymes spécifiques [19] [29]. Ceux-ci sont ensuite autopolymérisés ou recombinaisonnés avec des composés azotés pour former l'humus [24] [30].

La voie 3 est semblable à la voie 2, sauf que dans cette dernière, les polyphénols sont synthétisés par les microorganismes à partir des composés organiques non ligneux principalement cellulosiques.

Dans le concept de Flaig [31], c'est la synthèse des quinones quel que soit leur voie, qui est l'étape primordiale dans la formation des SHs. La lignine libérée de son lien avec la cellulose pendant la décomposition des résidus végétaux est soumise à une oxydation intramoléculaire conduisant à une formation d'unités primaires structurales (dérivés du phénylpropane). Les chaînes latérales des unités de la lignine sont oxydées, une démethylation se produit et les polyphénols résultants sont convertis en quinones par des polyphénoloxydases. Kononova [18] a démontré le rôle des myxobacteries dans la synthèse des AHs en décomposant préférentiellement la cellulose avant la lignine pour libérer les polyphénols [22] [23].

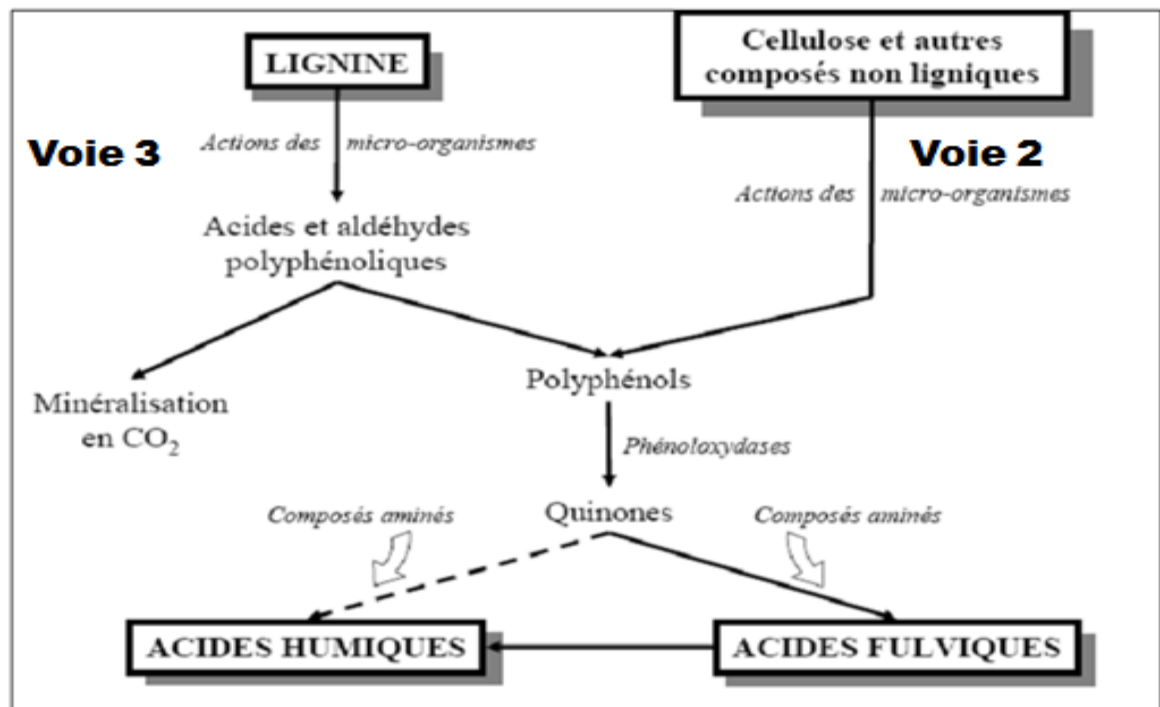


Figure 3 : Schéma simplifiant la théorie de polyphénols de formation des substances humiques (voies 2 et 3) [33].

1.1.2. 3. Théorie de la condensation amino-saccharidique (voie 4)

Selon ce concept, les sucres réduits et les amines, sous-produits du métabolisme microbien, subissent une polymérisation non enzymatique pour former les polymères bruns et azotés [19] [24] [32]. La réaction initiale de la condensation sucre-amine implique l'addition de l'amine au groupement aldéhydique du sucre pour former une N-glycosylamine. Cette glycosylamine se fragmente en N-1-

amino-deoxy-2-cetose conduisant à la formation d'aldéhydes et de cétones à trois carbones (l'acétol, le diacétyl, etc.) ou par déshydratation, conduit à la formation des réductones et d'hydroxyméthyl furfurals. Tous ces composés sont fortement réactifs et se polymérisent spontanément en présence de composés aminés pour former des SHs de couleur brune (Figure 4) [19].

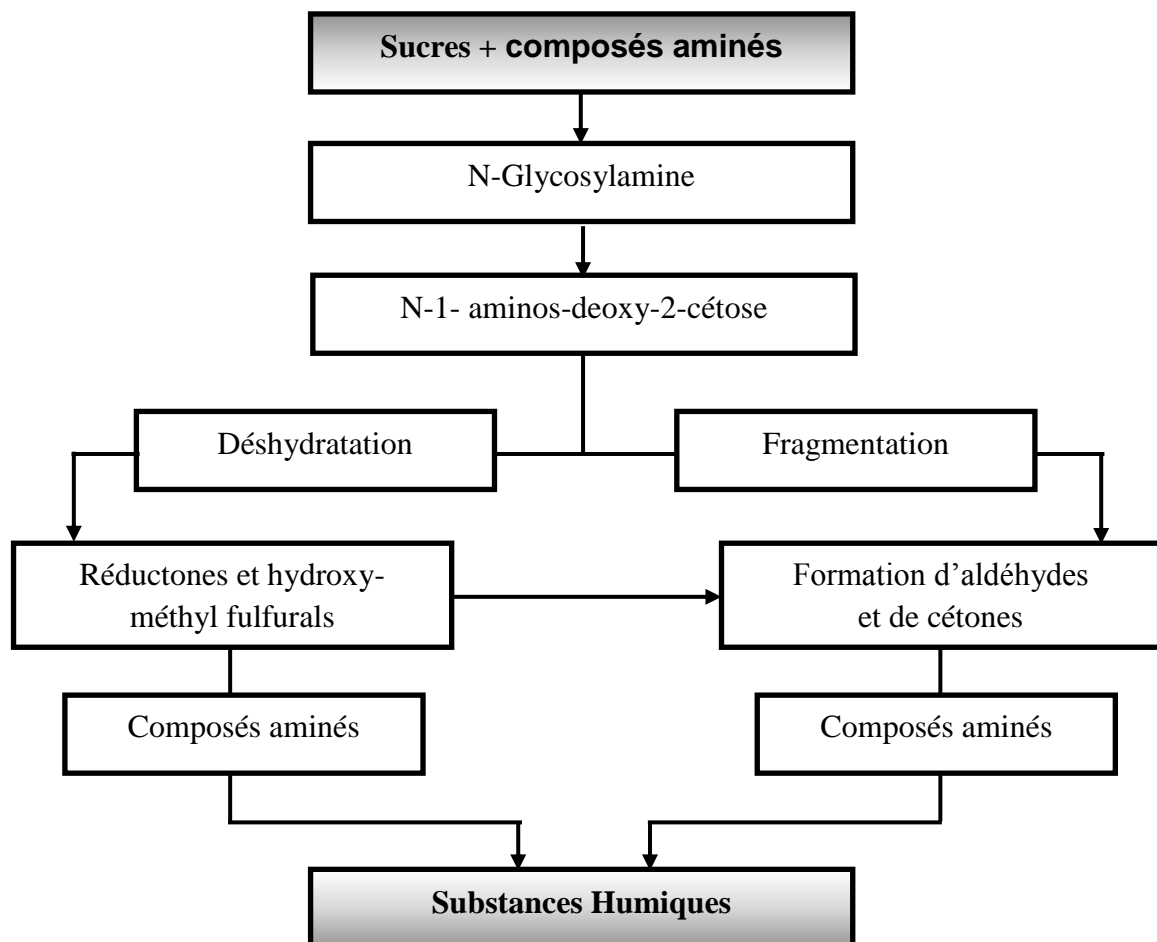


Figure 4: Schéma simplifiant la voie de condensation amino-saccharidique (Voie 4) [23].

1.1.3. Agents d'humification

La biomasse joue un rôle essentiel dans l'humification à la fois direct (par transformation de la biomasse morte) et indirect (par l'action enzymatique qu'elle exerce au cours des différentes étapes de l'humification). A ce titre, la biomasse microbienne représente en moyenne 2 à 5% de la matière organique totale du sol. Elle augmente considérablement, mais de façon éphémère, après l'introduction de la MOF très fermentescible et riche en azote.

Les microorganismes agissent sur les constituants de la MOF par la sécrétion de diverses enzymes dont trois classes ont été définies [34] [35].

- Enzymes de dépolymérisation, qui simplifient les molécules en libérant les "précurseurs".
- Enzymes de minéralisation, libérant l'azote et le phosphore sous ses formes minérales.
- Enzymes d'humification agissant par oxydation des composés phénoliques pour libérer les quinones.

Les bactéries prolifèrent dans les milieux les plus riches en composés azotés et légèrement acides, elles sont surtout abondantes autour des racines de certaines plantes (graminées, légumineuses). La plupart d'entre elles sont hétérotrophes et saprophytes, elles décomposent les celluloses, les sucres, qui constituent des sources d'énergie, et sont pour la plus grande part minéralisés sous forme de CO₂. Les bactéries protéolytiques hydrolysent les protéines des protoplastes en libérant des acides aminés, qui subissent à leur tour l'ammonification. Toutes ces activités microbiennes contribuent par la suite à la formation de l'humus dont le rôle essentiel est attribué aux bactéries et aux champignons [36] [37] .

1.1.4. Résistances des substances humiques à la biodégradation

Les composés humiques sont divisés en trois fractions : labile, stabilité moyenne et très stable [38] [39]

1.1.4. 1. Fraction labile

Il s'agit évidemment des formes « jeunes », celles qui résultent d'une polymérisation faible et incomplète des molécules solubles et qui ont contracté très rapidement des liaisons chimiques avec les argiles : comme les AHs jeunes résultant de l'évolution de produits solubles sont constitués surtout de chaînes de glucides. La décomposition de ces fractions est accélérée par les alternances saisonnières très contrastées [39] [40].

1.1.4. 2. Fraction de stabilité moyenne

Il s'agit de la fraction de l'humine, provenant d'une oxydation rapide de la lignine, dans les litières dites « améliorantes », c'est-à-dire les plus riches en azote [39] [40].

Ceci montre la stabilité moyenne de cette forme d'humine qui, bien que jeune, est relativement insensible à l'action des saisons. Les caractéristiques de l'humine, mesurées dans les milieux les plus actifs (50 à 60 % du carbone total), attestent la stabilité relative de cette fraction à l'égard de la biodégradation [40].

1.1.4. 3. Fraction très stable

Il s'agit des fractions les plus évoluées : AHs gris très polymérisés (abondants dans les sols à climats dont les saisons sont très contrastées) et l'humine résultant de la « surévolution » des AHs gris. Les expériences de [38] ont montré l'opposition entre les deux formes d'AHs :

- Ceux instables et très sensibles aux alternances saisonnières de type « climat atlantique », c'est-à-dire, sans contraste de température et d'humidité trop marqués. Par contre, ils sont biodégradés à nouveau en été.
- Ceux des climats tropicaux (vertisols) sont parfaitement stables, et absolument insensibles aux contrastes saisonniers. Il est possible de transformer par polymérisation provoquée, les AHs instables en AHs stables de type tropical [39].

Les recherches ont, au contraire, montré qu'il était nécessaire de diviser les composés humiques en deux grands groupes, fondamentalement différents selon la stabilité [39].

- Les composés humiques jeunes, encore faiblement polymérisés, comprenant la presque totalité des AF, une partie des AHs et de l'humine, subissent une dégradation microbienne [39].
- Les composés humiques stables à grosses molécules sont constitués d'AHs gris et d'humine très évolués et liés de façon intime aux argiles [39].

1. 2. Caractéristiques structurelles et chimiques des acides humiques

Les acides humiques sont structurellement des macromolécules complexes ayant une apparence brune-noire en solution de pH supérieur à 2. Ils sont généralement hétérogènes et sont principalement constitués de carbone, d'oxygène, d'hydrogène, d'azote et occasionnellement de soufre et de phosphore.

Malgré plusieurs décennies de recherche, la structure des AHs reste jusqu'à présent mal définie. Les connaissances actuelles se limitent à des études comportementales, à des hypothèses de structure (modélisation et mise en évidence de fragments), mais la biochimie de formation de ces composés reste l'un des aspects les moins connus [39] [41] [42] [43].

Le concept général des AHs est que ce sont des macromolécules complexes dans lesquelles sont liés des acides aminés, des aminoglycoses, des peptides, des cycles aromatiques et des composés aliphatiques. Les ponts entre les différentes entités sont des groupes OH phénoliques libres ou fixés, des structures quinoniques, des atomes d'azote et d'oxygène, et des groupes carboxyliques liés à des noyaux aromatiques [39] [41][42] [43].

Cependant, malgré cette difficulté de définir une structure spécifique des AHs, il est indispensable de reconnaître les principaux groupements fonctionnels présents dans les AHs et qui sont responsables de leur réactivités. Ce sont essentiellement des groupements carboxyliques, phénoliques et alcooliques, carbonyles, des quinones, des cétones et des groupements amines.

Sposito [44] souligne que quatre propriétés dominent les caractéristiques les AHs :

- Polyfonctionnalité : l'existence d'une variété de groupements fonctionnels et leur large réactivité typique aux mélanges de polymères hétérogènes;
- Charge négative : le développement d'une charge négative sur le squelette macromoléculaire qu'affecte la réactivité des groupements fonctionnels et la conformation de la macromolécule;
- Hydrophile : la tendance à former de fortes liaisons hydrogènes avec des molécules d'eau solvatant les groupes polaires comme COOH et OH, etc.;

- Labilité structurale : la capacité à former des associations intermoléculaires et à changer de conformation moléculaire en réponse aux changements des conditions de pH, d'oxydoréduction, de concentration d'électrolyte et de complexation des groupements fonctionnels.

Les résultats de ces recherches ont montré l'existence de deux groupes d'AH à propriétés entièrement différentes :

- Les AHs « jeunes », encore peu polymérisés, donc encore proches des AF qui sont peu résistants à la biodégradation microbienne (AH bruns). Ces AHs jeunes peuvent provenir des milieux biologiquement actifs, ils résultent de la polymérisation rapide de composés hydrosolubles par oxydation enzymatique [45]. Également, ils peuvent provenir des milieux acides et peu actifs (d'une fragmentation progressive des molécules de lignine) [39].
- Les AHs « évolués », à grosse molécule, à des noyaux phénoliques très importants par rapport aux chaînes aliphatiques (AH gris). Leur liaison avec les argiles est très intime et ils sont résistants à la dégradation microbienne [46] [39].

1.2.1. Modèles structuraux des acides humiques

La structure tridimensionnelle des AHs est le résultat de polymérisations et d'assemblages aléatoires complexes des unités structurales, consolidées par des liaisons hydrogènes, de forces de Van der Waal, et des interactions entre les électrons π de noyaux aromatiques voisins. Ces modèles privilégient les réactions d'estérification entre des acides gras et les groupements OH phénoliques. Sur ces constatations a été basée l'hypothèse des briques constitutives dont les cycles aromatiques sont plus nombreux dans les AHs [19] [30].

Parmi ces modèles, celui de Stevenson (Figure 5), qui représente les AHs comme des macromolécules aromatiques complexes [23].

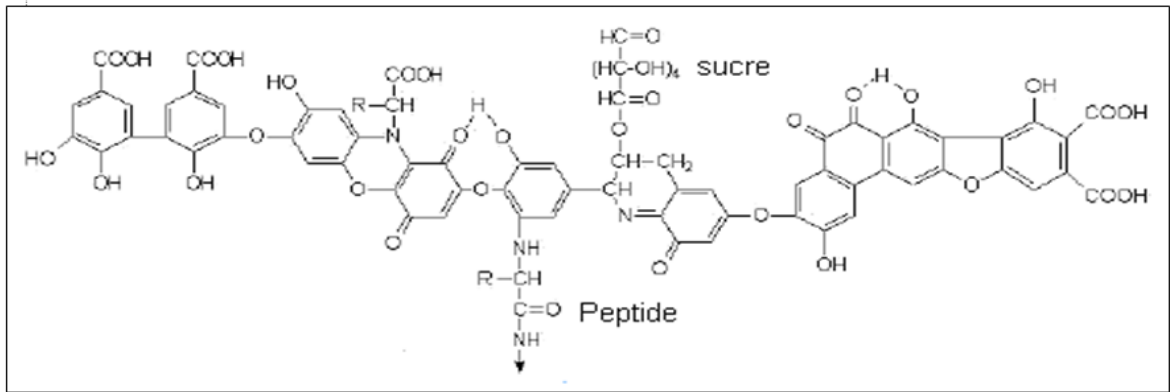


Figure 5 : Modèle structural des acides humiques selon [23].

Grinhut *et al.* [47] (Figure 6) ont proposé le dernier modèle des AHs qui est basé sur l'ensemble d'informations acquises suite à de nombreuses analyses par les outils modernes comme suit : MM : 6386 Da ; Analyses élémentaires : C : 53,9 ; N : 5,0 ; H : 5,8 ; O : 35,1 ; C/N : 10,7 ; Groupements fonctionnels (cmol/g) : carboxyl : 376 ; phenols : 188 ; acidité totale : 564 ; Distribution du % de C basée sur l'RMN : aliphatique : 18,1 ; aromatique : 20,9 ; carbohydrates : 8,4 ; cétone : 4,5 ; phénolique : 4,2 ; Autres groupements 15,3. La structure a été construite en utilisant le programme ACD/ChemSketch.

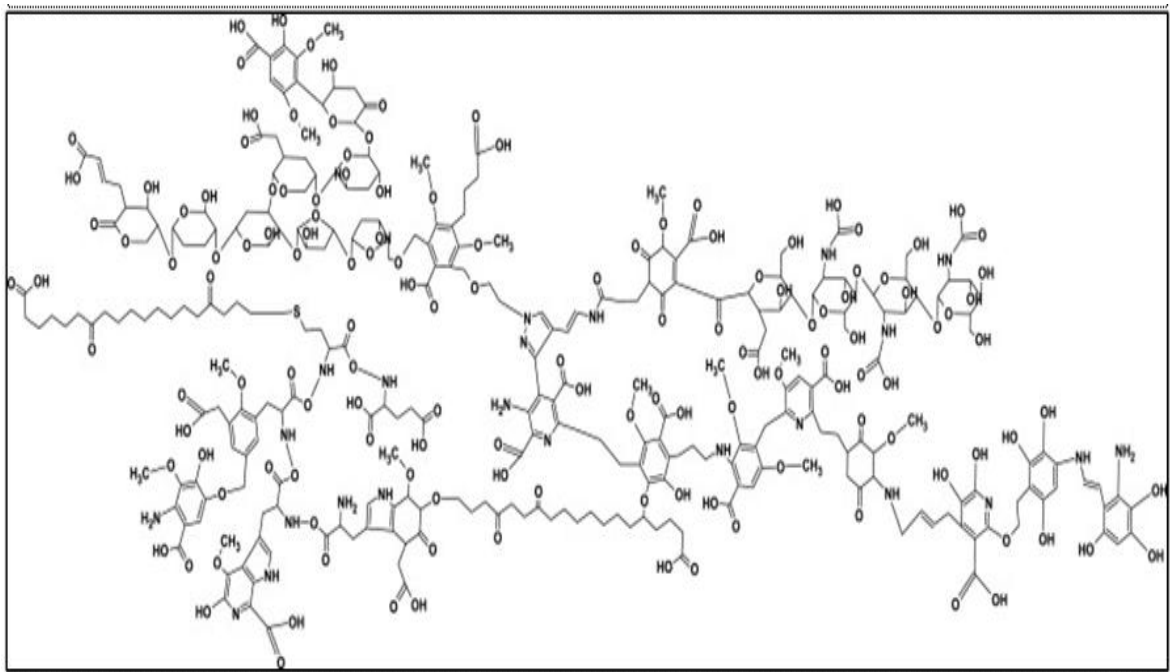


Figure 6: Dernier modèle de la structure des AHs proposé par Grinhut *et al.* [47] basé sur le modèle de Stevenson [23].

1.2.2. Extraction et purification des acides humiques à partir du sol

Les propriétés de la matière organique du sol et plus particulièrement celle des SHs ne peuvent être bien étudiées qu'à l'état libre, donc débarrassées de ses composants inorganiques (sable, argile et autres constituants inorganiques). De ce fait, l'isolation de la matière humique de sa matrice inorganique constitue une première étape dans l'étude de ses propriétés acide-base et de complexations de celle-ci [41].

L'extraction des matières humiques des sols a fait l'objet de nombreux travaux. On ne pourra pas passer en revue dans le cadre de la présente étude les différentes techniques qui ont été proposées, mais nous pouvons citer les travaux de [23] et [48] qui ont réalisé des études comparatives sur les extractions des AHs et AF avec différents solvants dont les principaux sont :

- Solution aqueuse de soude 1%, utilisée à chaud ou à froid, précédée d'un traitement à l'acide chlorhydrique de concentration 2 à 5% chaud ou froid ;
- Solution aqueuse de pyrophosphate de sodium 0.1M utilisé à chaud ou à froid ;
- Solution aqueuse d'un mélange de pyrophosphate et de soude.

Flaig [48] préconise donc l'emploi de la méthode de Kononova [18] qui utilise un mélange $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1M + NaOH 0,1M avec un rapport sol/liquide de 5/100.

Duchaufour [39] a présenté une méthode basée sur plusieurs extractions successives dont les principales étapes sont :

- élimination des matières végétales légères par des liqueurs organiques lourdes (mélange alcool/bromoforme) ;
- extraction des matériaux humiques solubles par des solutions à pH croissant qu'on utilise successivement sur le même échantillon. Il s'agit des solutions de pyrophosphate tamponné à pH 7 par H_2SO_4 , de pyrophosphate 0,1 M à pH 9,8 et de soude 0,1M à pH 12.

Cette méthode permet une extraction assez complète et reproductible de la matière humique du sol mais elle est un peu longue d'où le bromoforme est un produit toxique.

La méthode idéale d'extraction de la matière humique est celle qui remplit les conditions suivantes :

- la méthode doit donner un matériel humique non altéré;
- la matière humique obtenue ne doit pas contenir des impuretés inorganiques comme les cations polyvalents;
- la méthode doit être universelle, c'est-à-dire, applicable à tous les types d'échantillons de sol.

Suite à un grand nombre de techniques d'extraction, la Société Internationale des Substances Humiques (IHSS) a proposé un protocole qui s'avère être un des plus efficaces. Ce protocole a été mis en place afin d'uniformiser et d'apporter une base commune aux chercheurs amenés à travailler dans ce domaine. Le protocole détaillé de IHSS sera présenté dans le chapitre matériel et méthodes.

Depuis longtemps la plupart des laboratoires utilisent les solutions alcalines (pyrophosphates de sodium 0,1M) pour l'extraction des composés humiques, on obtient ainsi une solution foncée, qui après acidification, donne un précipité floconneux brun (AH), alors que les AF restent insolubles. Les AHs peuvent être eux-mêmes subdivisés en fractions : plus ou moins "condensées" ou acides humatomélaniques et AHs bruns, peu condensés et très stables [37] [41].

1.2.3. Nature des acides humiques extraits à partir de l'eau de surface

Les substances humiques peuvent être également présentes dans l'eau souterraine en raison de la proximité de charbon, de la dissolution de paillis d'écorce, des débris organiques enterrés, des eaux usées provenant de l'industrie du cuir et du bois (tannins et lignines) et des effluents des usines de pâtes et papier (lignines).

Les matières humiques sont généralement définies par rapport à la technique d'extraction utilisée. Parmi les différents procédés retenus, l'utilisation de résines macroporeuses adsorbantes de types XAD qui semble le procédé le plus intéressant [48]. Les substances sont alors définies comme la fraction organique qui s'adsorbe sur la résine XAD à pH acide et les acides organiques non retenus sont appelés acides hydrophiles selon [49]. La méthode établie par [50] qui s'appuie sur cette technique est aujourd'hui proposée aussi par l'IHSS [51].

La composition élémentaire moyenne des SHs est de 40 à 60% carbone, 4 à 6% d'hydrogène, 0,5 à 2% d'azote, 30 à 50% d'oxygène, moins de 1% de soufre et de phosphore et jusqu'à 10% de résidu [52]. Elle est en fonction du milieu aquatique mais aussi des saisons [53].

Les SHs incluent dans leur structure des sites aliphatiques et aromatiques. La partie aliphatique, majoritaire, reste très mal caractérisée. Elle engloberait vraisemblablement des composés comme des protéines, des acides aminés et des sucres [48] [54].

Les sites aromatiques peuvent représenter jusqu'à 30% du carbone [55]. Ils sont représentés par des noyaux aromatiques simples (substitués par des chaînes alkyles et des groupements carboxyles, cétones et hydroxyles) et des structures polycycliques (polyaromatiques et composés de type furane et pyridine) [56] [57].

Les principaux modèles de structure proposés pour les SHs extraits de l'eau ne représentent que leur partie aromatique. C'est le cas du modèle établi par Christman [58], qui s'inspire des résultats de Liao *et al* [56].

Le caractère aromatique des matières humiques est reconnu par de nombreux auteurs comme responsable de la forte réactivité de ces composés avec les oxydants tels que le chlore [48] [52].

Cette réactivité des SHs avec le chlore se traduit par une forte demande en oxydant, une diminution de la couleur et la formation de nombreux produits chlorés, exprimés globalement sous le terme de composés organohalogénés totaux et des produits non chlorés. Le chloroforme et les acides dichloro et trichloroacétiques sont les principaux sous-produits de chloration analysables formés par chloration de SHs aquatiques [59] [60] [61] [62] [63] [64].

Certains des composés organo-chlorés formés présentent des propriétés mutagènes [62] [65] [66] [67] [68] et en particulier le chloro-3 (dichlorométhyl)-4 hydroxy-5 (5H) furanone -2 ou « MX » et son isomère « E-MX », récemment identifiés lors de la chloration des eaux et des solutions de substances humiques [48] [69].

1.3. Biodégradation des acides humiques

La MO tient un rôle primordial dans l'activité microbiologique d'un milieu. Quelles que soient les origines (indigène, allochtone ou anthropogène) les composés organiques dissous et/ou particulaires servent de source d'énergie aux microorganismes et constituent également la matière première nécessaire à la multiplication des populations microbiennes [18].

Les microorganismes ont besoin de trouver dans leur environnement les éléments constitutifs de leur cellule (C, H, O, N, P, S, etc.). Ces éléments se trouvent dans la MO sous forme de molécules simples ou moins complexes : oses, amidon, cellulose, protéines, etc.

Les perméases, enzymes contrôlant l'entrée des substances organiques et des ions par transport actif à l'intérieur des cellules, permettent le passage des molécules organiques solubles de faible poids moléculaire (monomères et oligomères <1000 Da). Hisano *et al.* [70] remarquaient que la MO ne peut plus être directement incorporée par les bactéries lorsque le diamètre des molécules est supérieur à 0,1µm. Ainsi, les polymères organiques de PM élevé doivent préalablement subir une hydrolyse enzymatique.

Celle-ci conduit à des processus de dégradation et dépolymérisation, qui permettent aux molécules formées d'être métabolisées par les microorganismes. Ces hydrolyses sont possibles grâce à la présence d'enzymes extracellulaires [19].

Enfin, une réactivité microbiologique ou « bioréactivité », traduisant les possibilités d'utilisation de la MO par une population microbienne, peut être alors définie par deux principaux termes :

La biodisponibilité : exprime le potentiel d'interaction entre la MO et le microorganisme. Cette notion considère que l'utilisation de composés organiques ne doit pas nécessairement résulter de leur fragmentation en plus petites entités ou même jusqu'à minéralisation mais intègre aussi la dégradation extracellulaire des composés par les exoenzymes microbiens [71].

La biodégradabilité : représente l'utilisation effective de la MO par les microorganismes et traduit l'expression mesurable du potentiel d'interaction. Au

sens strict, la biodégradabilité englobe deux processus, d'une part l'utilisation directe par le microorganisme ou après décomposition pour la biosynthèse de nouveau matériel cellulaire et d'autre part la minéralisation pour obtenir de l'énergie et des nutriments inorganiques [71].

Les AHs ne sont pas biodégradables qu'après une éventuelle adaptation progressive de certains microorganismes possédant les enzymes capables d'attaquer cette macromolécule. Le principe de « l'infaillibilité microbienne » cité par Alexander et Rogers dit que : « pour toute molécule il existe quelque part un microorganisme capable de la dégrader dans certaines conditions du milieu [71] [72].

La biodégradation des AHs a été démontrée en condition aérobie avec formation de métabolites facilement biodégradables. Il existe actuellement un certain nombre de travaux qui s'intéressent à la prédiction informatisée de la biodégradabilité à partir des réactions connues de biodégradation.

Différents microorganismes peuvent dégrader les AHs, et cette dégradation est limitée selon l'effet de la nature des AHs et de leurs tailles moléculaires [40]. La dégradation des AHs a lieu après des réactions chimiques ou enzymatiques. Cette dégradation peut être suivie en utilisant plusieurs méthodes d'analyses par exemple les techniques spectroscopiques qui apportent des informations précises concernant la structure des AHs. Actuellement l'utilisation des AHs du commerce est l'une des meilleures méthodes disponibles pour expliquer leurs biodégradation [73]. Certaines bactéries peuvent dégrader ou décolorer les AHs, y compris les actinomycètes tels que les espèces du genre *Streptomyces*, ou d'autres bactéries à savoir les *Pseudomonas* [74]. La dégradation est assurée par des enzymes extracellulaires après une fixation des SHs sur les surfaces de ces bactéries filamenteuses [75].

Dans la plupart des cas, la biodégradation est assurée par une attaque enzymatique des carbohydrates afin d'assurer la source du carbone [40] [76] [77] [78] [79] [80]. Une stimulation de la biodégradation peut y avoir en présence de Mn^{2+} [81].

Le schéma des figures 7 et 8 résumant les différentes voies d'attaque microbiennes et leurs mécanismes sur les AHs.

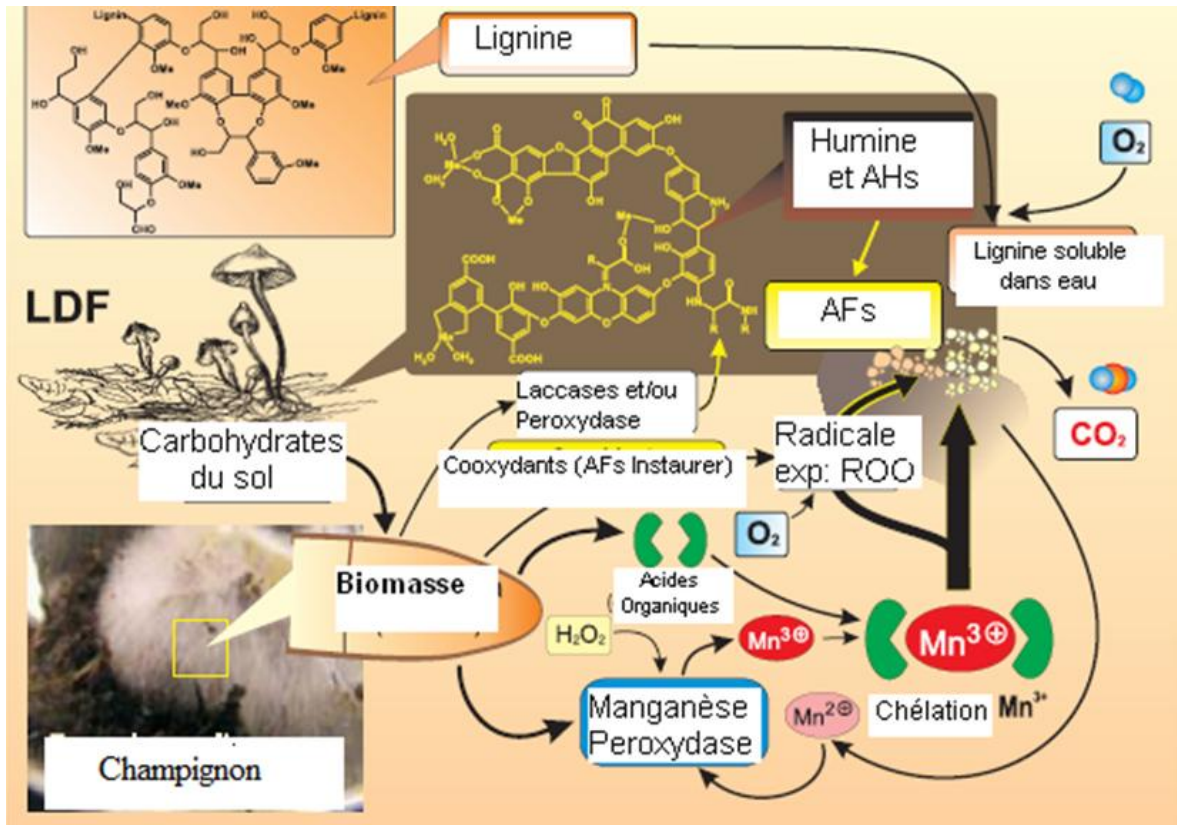


Figure 7 : Mécanismes de biodégradation des AHs et de la lignine par les champignons [40].

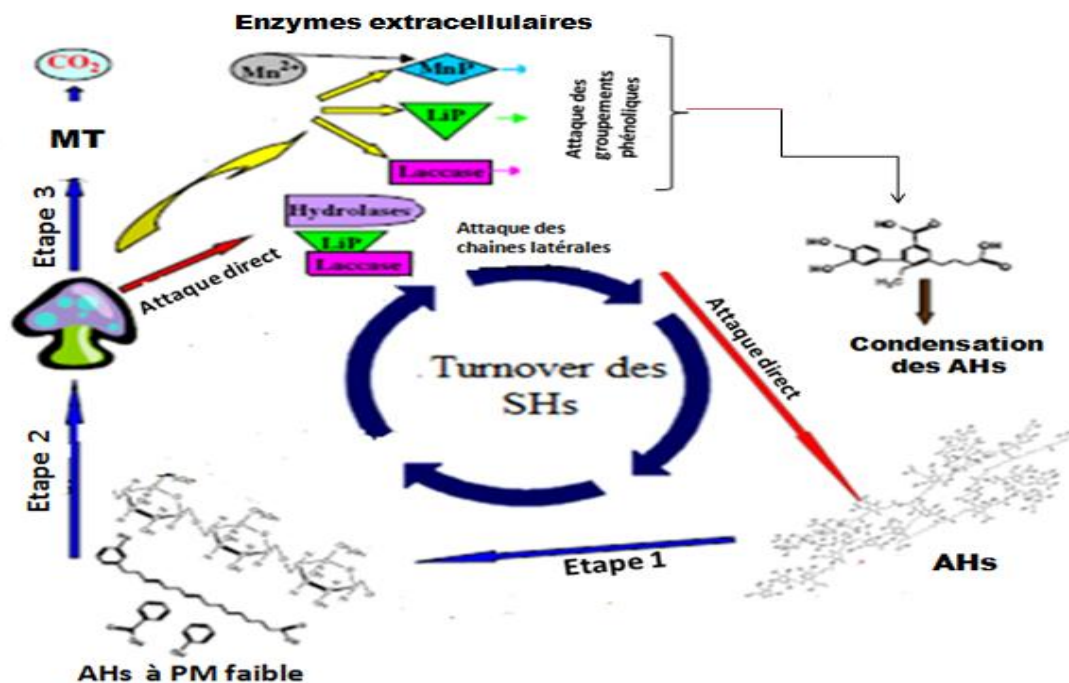


Figure 8 : Mécanismes de biodégradation et transformation des AHs. Etapes de dégradation de la macromolécule : Etape 1 (dégradation des AHs à PM élevé) ; Etape 2 (dégradation des AHs à PM faible ; Etape 3 (minéralisation totale) [8].

On peut notamment citer les travaux de [47] sur l'étude de la dégradation des AHs par les champignons, qui montre que les couches superficielles du sol sont composées d'une plus grande proportion de champignons capables de dégrader les substances réfractaires dont font partie entre autre, les AHs des horizons de surface.

1.4. Rôle des acides humiques

Le rôle et l'importance des AHs dans les sols sont prouvés depuis longtemps. Par leur présence dans tous les milieux, leurs multiples propriétés, réductrices, tensioactives et surtout leur pouvoir « séquestrant » (adsorbant, complexant, chélatant) vis-à-vis de composés organiques et minéraux (métaux et pesticides entre autres) leur confèrent un rôle essentiel dans la solubilisation, l'accumulation, la biodisponibilité, la dégradation, le transport et les échanges de ces composés dans les eaux, les sols et les sédiments [82].

La nature acide des groupements fonctionnels confère aux AHs un caractère de polyélectrolytes de type anionique dont résultent leurs propriétés complexantes vis-à-vis des ions métalliques Eyeraguibel, B.(2004), « Caractérisation des substances humiques biomimétiques-effets sur les végétaux », Thèse, Toulouse.

Le tableau 1 résume les différentes propriétés des AHs.

Tableau 1: Propriétés générales des AHs et leurs effets dans le sol.

| Propriétés | Remarques | Effets dans le sol |
|--|--|--|
| Rétention de l'eau | Retiennent jusqu'à 20 fois leurs poids en eau | Aident à prévenir le dessèchement et améliorent la rétention de l'eau dans les sols sableux. |
| Liaison avec les argiles. | Cimentent les particules des sols en formant des agrégats. | Permettent l'échange gazeux, la perméabilité et stabilisent la structure du sol. |
| Chélation | Forment des complexes stables avec Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , et autres cations polyvalents. | Favorisent la biodisponibilité des micronutriments pour les plantes. |
| Effet tampon | Possèdent un grand pouvoir tampon. | Permettent de maintenir une réaction uniforme dans le sol. |
| Echange de cation | L'acidité totale varie de 300 à 1400 cmol/Kg. | Augmentent la capacité et les échanges cationiques. |
| Minéralisation | La décomposition donne : CO_2 , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} . | Source nutritive pour les plantes de N, P et S. |
| Combinaison avec les molécules organiques | Modifie la bioactivité et la biodégradation des pesticides. | Modifie le taux d'application des pesticides |

1.5. Effet néfaste des acides humiques

Les THM sont des composés de formule générale CHX_3 où X est un halogène. Ils sont des sous-produits de la chloration de l'eau formés principalement par réaction du chlore avec des substances organiques comme les AHs et AF présents dans l'eau.

Le chloroforme est généralement le principal THM mesuré dans l'eau potable (jusqu'à 90% en poids de tous les THM), mais sa proportion par rapport à

l'ensemble des THM peut varier de façon significative selon la teneur de l'eau brute en bromure (qui peut entraîner alors une formation de sous-produits bromés) et selon le pH de l'eau [83] [84].

Les THM ne représentent toutefois qu'une fraction des produits qui peuvent se former lors de la chloration de l'eau. Parmi les autres sous-produits susceptibles d'être formés, on retrouve des acides acétiques halogénés, des acétonitriles halogénés, des cétones halogénées, des aldéhydes chlorées, des chlorophénols, du trichloronitrométhane (chloropicrine) [85], du 3-chloro-4- (dichlorométhyle)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) [86], etc.

1.5.1. Concentrations des THM dans l'eau potable

Les concentrations de THM (et autres sous-produits de la chloration) peuvent être très variables d'un réseau à l'autre. En général, les concentrations les plus élevées se retrouvent dans l'eau traitée provenant de sources à fortes teneurs en matières organiques, comme les lacs et les rivières, et les concentrations les plus faibles, dans les sources souterraines [87] [88] [89]. Les teneurs en THM peuvent donc varier de façon importante en fonction de la MO, de la qualité de l'eau et les paramètres de traitement de l'eau [90] [91] [92].

1.5.2. Exposition de la population aux THM

Selon les informations disponibles, pour la population générale, la principale source d'exposition aux THM est l'eau utilisée à des fins de consommation et à d'autres fins domestiques [93].

1.5.2.1. Effets cancérigènes des THM

Dans l'ensemble, les principaux types de tumeurs observés chez les rongeurs (rat et souris) exposés à des THM ou à des acides acétiques sont le cancer du foie, des reins et du colon [83] [94] [95].

De nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées afin d'évaluer le risque de cancer chez les populations exposées à ces produits. Jusqu'à maintenant un seul cas de cancer de la vessie a été observé de façon assez constante chez les consommateurs d'eau chlorée [95] [96].

I.6. Conclusion

Les acides humiques sont des composés à poids moléculaire le plus élevé de la MO et sont considérés comme des supramacromolécules. Ils sont formés dans le sol, l'eau et les sédiments et constituent le réservoir le plus stable de la MO. Ils sont difficilement biodégradables par la microflore tellurique et les champignons et les actinomycètes sont aptes à transformer et dégrader ces macromolécules grâce à des enzymes hydrolytiques extracellulaires dont on peut citer les laccases et les peroxydases.

La présence des AHs dans les milieux naturels est très bénéfique car ils jouent un rôle très important dans l'amélioration de la texture, la structure et surtout dans la fertilisation de sol mais aussi dans la dépollution des sols contaminés par les métaux lourds, pesticides, insecticides, pétrole, HAP, etc. Cependant, la présence des AHs dans les eaux de surface peut influencer la qualité de l'eau potable après subir un traitement par chloration d'où la formation des THM, connus par ses caractères carcinogènes. La nécessité d'utiliser les bioprocédés est fortement recommandée dans les étapes de traitement de finition pour éliminer les AHs présents dans les eaux potables.

CHAPITRE 2 : STREPTOMYCETES : Microorganismes d'intérêt

2.1. Introduction

Le genre *Streptomyces* désigne des bactéries filamenteuses appartenant à l'ordre des *Actinomycetales* (figure 9). Ce genre a été caractérisé par Selman Waksman (1888-1973) et Arthur Trautwein Henrici (1889-1943). Les espèces appartenant à ce genre sont principalement retrouvées dans les couches superficielles du sol (même en profondeur) où leur développement et leur dispersion sont facilités par leur croissance mycélienne et leur capacité de sporulation. Ce sont des bactéries saprophytes, assurant leur croissance à partir de la dégradation des MO du sol grâce à de nombreuses enzymes hydrolytiques extracellulaires, participant ainsi activement à la formation de l'humus.

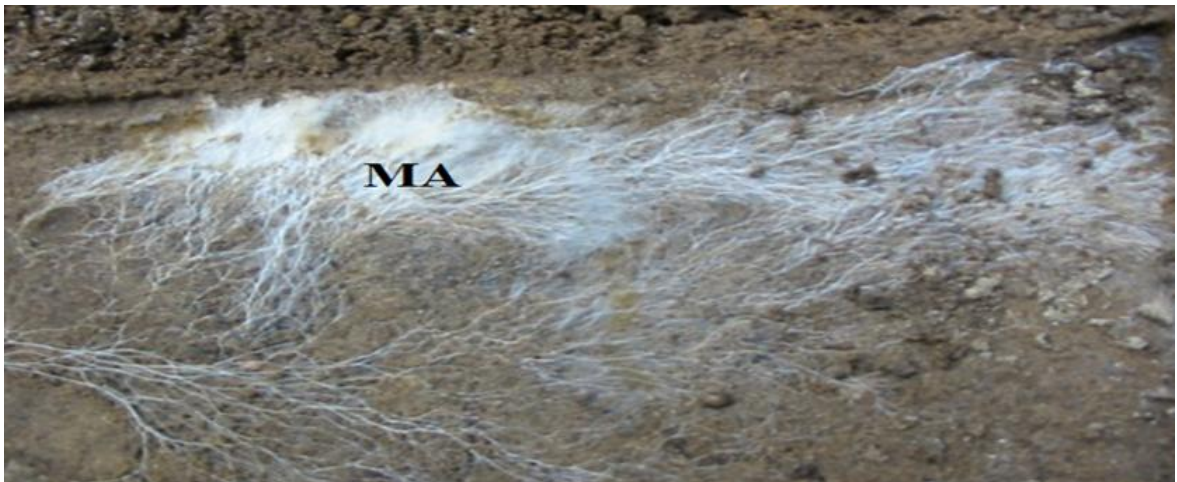


Figure 9 : Streptomycètes : Bactéries filamenteuses abondantes dans les couches superficielles du sol. Le mycélien aérien (MA) est fortement dispersé assurant leur croissance rapide.

2.2. Différenciation morphologique des streptomycètes

On peut isoler les streptomycètes à partir du sol en utilisant des milieux sélectifs (milieu chitine ou d'acides humiques + ATB). On peut facilement connaître les streptomycètes sur une boîte de Pétri en observant la formation du mycélium (hyphes) (figure 10). Les streptomycètes ressemblent aux champignons mais avec des contours typiques (ce qu'on appelait avant les champignons rayonnants). Sur un milieu de culture solide, la germination d'une spore produit des filaments mycéliens à croissance apicale (par les extrémités) et capables de se ramifier.

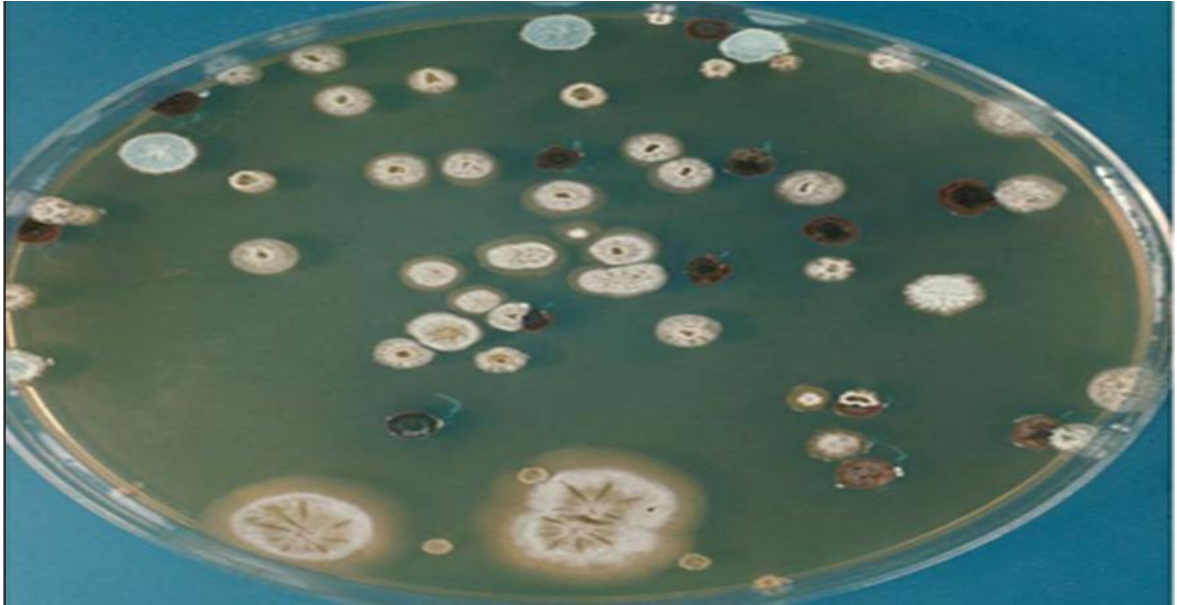


Figure 10 : Isolement des streptomycètes à partir du sol en utilisant des milieux sélectifs. Colonies représentant les différentes séries de couleurs de MA.

2.3. Cycle de développement des streptomycètes

Le cycle de développement de streptomycètes débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium primaire, formé d'hyphes non séptées, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées comme le montre la figure 11 [97].

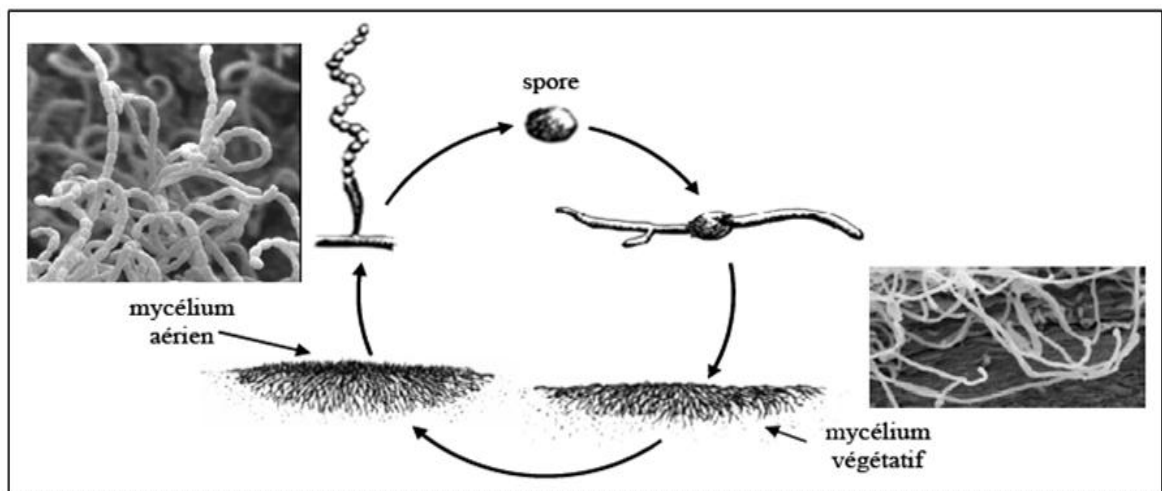


Figure 11 : Cycle de différenciation culturelle chez les streptomycètes [97].

2. 4. Identification des streptomycètes

La taxonomie des streptomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires (ex. hybridation ADN/ADN) séparent les espèces.

La taxonomie des streptomycètes fut marquée par quatre périodes essentielles dont chacune a apporté de nouveaux critères de classification.

Durant la première période, seuls les critères macro et micro morphologiques (mycélium fragmenté ou non, présence ou non de mycélium aérien, couleur des mycélia, production de spores, etc.) permettaient de différencier les genres entre eux. Ceci a donné lieu à la création de nombreux genres dont les limites entre eux n'étaient pas toujours nettes, ce qui a engendré beaucoup de confusion [98].

La seconde période voit l'utilisation de la chimiotaxonomie basée sur la composition cellulaire en acides aminés, en sucres, en acides mycoliques (lipides pariétaux complexes et insaturés), et en phospholipides membranaires.

La troisième période qui a débuté dans les années 1970 et a trouvé son apogée entre 1980 et 1990, combine l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques pour différencier les espèces de chaque genre entre elles. Ainsi, est née la taxonomie numérique avec l'obtention de dendrogrammes qui ont permis d'apporter beaucoup de clarté au niveau de la composition en espèces [99].

La quatrième période a débuté durant les années 1980 et s'étend jusqu'à l'heure actuelle. Elle consiste en l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires, notamment l'hybridation ADN-ADN et le séquençage de l'ADN correspondant à l'ARN ribosomique 16S, qui ont permis de tracer toute la phylogénie des streptomycètes [100] [101] [102].

Grâce au séquençage de l'ARN 16S, certains genres bactériens non mycéliens furent inclus dans l'ordre des *Actinomycetales*, tandis que d'autres en furent exclus [100].

Il est à noter que chez les streptomycètes, les deux moyens largement utilisés pour l'identification de ce genre bactérien, sont d'une part le suivi des aspects macroscopiques et des caractères culturels sur milieux de cultures spécifiques, et d'autre part, l'analyse de la séquence nucléotidique du gène ARNr 16S. Ces deux moyens ont permis l'identification de plusieurs souches appartenant à ce genre [103] [103] [104] [105] [106] [107].

2.5. Métabolisme des streptomycètes

Deux propriétés les plus significatives des streptomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs parmi lesquels on compte les deux tiers des antibiotiques produits par des microorganismes. Ces propriétés traduisent la richesse tout à fait remarquable du métabolisme cellulaire de ce groupe microbien [108].

Ces bactéries sont aérobies, mésophiles, leur température optimale est de 25-30 °C, leur pH optimal est de 6,5-8 [109].

Les streptomycètes sont généralement hétérotrophes, certains étant chimioautotrophes, ils peuvent utiliser une grande variété de substances comme sources de carbone et d'azote tels la chitine, la kératine, la cellulose, le xylane, le nitrate, les polluants pétroliers comme le benzène, polychloro-bisphényl, la gélatine, le xylénol, la caséine, l'urée, les pesticides comme l'atrazine [110] [111] [112] [113] [114] [115] [116] [117] [118] [119].

Les streptomycètes produisent un grand nombre de métabolites secondaires tels que : l'acide indolacétique [120], les toxines, les pigments et les antibiotiques [121] [122].

2.6. Substances bioactives produites par les streptomycètes

Les streptomycètes représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques et d'enzymes extracellulaires.

2.6.1. Streptomycètes producteurs d'antibiotiques

Depuis 1940, la fabrication des antibiotiques a pris une part dominante dans l'industrie pharmaceutique, représentant près de 25% de son chiffre d'affaire.

Le tableau 2 illustre quelques exemples d'antibiotiques produits par les streptomycètes. En ce qui concerne l'activité antifongique des streptomycètes, elle ne se limite pas seulement aux champignons filamenteux mais s'étend aux levures et aux dermatophytes. A titre d'exemple, la souche *Streptomyces mutabilis* présente une activité anticandidale envers *Candida albicans* [123] et la souche *Streptomyces rochei* présente une activité anti dermatophytique vis-à-vis le dermatophyte *Trichophytum rubrum* [124].

Tableau 2 : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les streptomycètes

| Espèce productrice | Antibiotiques | Références |
|---|-----------------|------------|
| 1/ Les agents antibactériens | | |
| <i>Streptomyces griseus</i> | Candicine | [125] |
| <i>Streptomyces lydicus</i> | Streptolydigne | [126] |
| <i>Streptomyces lindensis</i> | Rétamycine | [127] |
| 2/ Les agents antifongiques | | |
| <i>Streptomyces griseochromogenes</i> | Blasticidine | [128] |
| <i>Streptomyces humidus</i> | Phénylacétate | [129] |
| <i>Streptomyces nodosus</i> | Amphotéricine B | [130] |
| <i>Streptomyces ambofaciens</i> | Spiramycine | [122] |
| 3/ Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les streptomycètes | | |
| <i>Streptomyces hygrosopicus</i> | Herbimycine | [131] |

Le nombre le plus élevé des molécules bioactives est produit par les actinomycètes (61%) dont 66% sont des antibiotiques (ATB), et parmi ces ATB 80% sont produits par les streptomycètes (Tableau 3).

Tableau 3 : molécules bioactives produites par les microorganismes

| | Antibiotiques | Autres | Total |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Actinomycètes * | 7900* 66% | 1220* 40% | 9120* 61% |
| Autres bactéries | 1400 (12%) | 240 (9%) | 1640 (11%) |
| Champignons | 2600 (22%) | 1540 (51%) | 4140 (28%) |
| Total | 11900 (100%) | 3000 (100%) | 14900 (100%) |

*environ 80% sont isolés de *Streptomyces* dans chaque catégorie

Ces bactéries ont, en effet, la capacité de produire, dans certaines conditions, des métabolites secondaires particulièrement intéressants pour le monde pharmaceutique.

Ceux-ci sont notamment à l'origine de deux tiers des antibiotiques et des agents anti-tumoraux, ainsi que certains herbicides, des substances antifongiques, et des immunosuppresseurs. A titre d'exemple, l'Augmentin, un antibiotique prescrit en cas d'otite, de sinusite, de bronchites ou encore de cystite, est élaboré à partir d'un mélange d'amoxicilline et d'acide clavulanique. Ce dernier est une «molécule streptomycienne» qui inhibe les bêta-lactamases, enzymes jouant un rôle important dans la résistance aux antibiotiques chez certaines bactéries.

2.6.2. Streptomycètes : Producteurs d'enzymes de dégradation

2.6.2.1. Enzymes de dégradation des composés organiques naturels

Les streptomycètes jouent un rôle dans la dégradation de la MO et donc un rôle dans le recyclage des biopolymères complexes comme la cellulose, la lignocellulose, la pectine et le xylane par la production d'enzymes extracellulaires qui sont d'une importance majeure dans l'industrie.

La dégradation de ces biopolymères par les enzymes peut être le résultat d'une hydrolyse biologique puis d'une oxydation biologique.

Quant à l'hydrolyse biologique, les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines en acides aminés. Les polysaccharides, par exemple l'amidon, est dégradé enzymatiquement pour libérer des oses [132] [133].

Dans le cas de l'oxydation biologique, les enzymes réagissent directement avec l'O₂ comme les cytochromoxydases qui sont des enzymes actives dans la chaîne respiratoire. La plupart du temps, l'oxygène est incorporé directement au substrat (cas des oxygénases). Parfois, il joue le rôle d'un accepteur d'hydrogène (cas des oxydases) [134].

2.6.2.2. Enzymes de dégradation des composés organiques de synthèse

Les capacités de biodégradation des streptomycètes ne se limitent pas seulement aux composés organiques naturels mais concernent également des substrats organiques plus difficiles à dégrader car peu solubles dans l'eau. Il s'agit des hydrocarbures (chaînes hydrocarbonées), de phénols et d'autres composés récalcitrants [135] [136].

Le principal mécanisme enzymatique pour l'assimilation et/ou la détoxification des substrats organiques peu dégradables est l'oxydation enzymatique par les monooxygénases ou dioxygénases: il y a formation de groupes polaires qui permettent l'augmentation de la solubilité de nombreux substrats organiques peu solubles dans l'eau (hydrocarbures ou hydrocarbures aromatiques polycycliques) et de faciliter ainsi leur assimilation [137] [138] [139].

C'est également, le mécanisme de biodégradation des composés nitroaromatiques [140] et des substrats organochlorés tels que les chlorobiphényles [141]. Pour ces derniers, la déchlorination bactérienne a été démontrée en condition anaérobie avec formation de métabolites facilement biodégradables en aérobiose [141].

2.7. Matériel génétique des streptomycètes

Le matériel génétique des streptomycètes est constitué par l'ADN chromosomique ainsi que chez certaines souches par l'ADN plasmidique ou de l'ADN phagique. Les chromosomes de streptomycètes ont la particularité d'être linéaires et de présenter une proportion en bases G et C très élevée, comprise entre 70 et 74%.

Comparés aux chromosomes d' *E. coli* K-12 (la taille = 4,6 Mb) et de *Bacillus subtilis* (taille = 4,2 Mb), les chromosomes de *Streptomyces* sont de très grandes tailles (environ 9 Mb), et présentent une densité en gènes très élevée (89% pour *S. coelicolor*). Le chromosome de *S. coelicolor* a d'ailleurs été le premier génome bactérien identifié comme porteur d'un plus grand nombre de gènes que l'eucaryote *Saccharomyces cerevisiae* [108].

Après le séquençage du génome de quelques souches de ce genre bactérien, il a été constaté que le nombre de voies de biosynthèse de métabolites secondaires était beaucoup plus grand que prévu. C'est le cas de *S. coelicolor* [142], le meilleur représentant du genre bactérien génétiquement bien étudié, qui est capable de produire quatre différents antibiotiques.

2.8. Conclusion

Les streptomycètes produisent un grand nombre de métabolites secondaires possédant des structures chimiques et des activités biologiques très variées qui n'existent chez aucun autre genre bactérien. Environ 70 espèces de *Streptomyces* sont d'intérêt majeur, tant sur le plan industriel que sur celui de la recherche fondamentale puisqu'elles présentent, d'une part, un cycle de développement unique chez les procaryotes et, d'autre part, elles sont à l'origine de la production de très nombreuses molécules bioactives, notamment d'antibiotiques et d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. En effet plus de la moitié des antibiotiques connus est produite par les streptomycètes et l'espèce la plus étudiée est *S. coelicolor* et d'un degré moindre *S. avermitilis*.

CHAPITRE : 3 : PEROXYDASES : Rôles dans la biotechnologie industrielle et environnementale

3.1. Introduction

Parmi les milliers d'enzymes identifiées et souvent connues dans les moindres détails, nous allons nous intéresser à l'une des plus répandues qui soient, les peroxydases.

Avant même que la notion d'enzyme eût été formulée, Louis-Antoine Planche constatait en 1810 que des extraits de racine de diverses plantes avaient la propriété d'oxyder et donc de recolorer la teinture de gaïac (incolore à l'état réduit) en présence de peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée), ce qui valut le nom aux enzymes responsables, les peroxydases.

Aujourd'hui, la source la plus commune de peroxydase à usage biotechnologique ou autres est la racine de radis ou de raifort (radis noir). C'est pourquoi les chercheurs la connaissent plutôt sous l'acronyme anglais HRP (*Horse Radish Peroxidase*).

3.2. Importance des peroxydases

Les peroxydases possèdent de sérieux avantages sur les catalyseurs chimiques traditionnels car elles sont efficaces à température modérée et entièrement biodégradables. Seulement leur intérêt industriel dépend aussi de leur capacité de réagir dans les conditions adéquates qui ne correspondent pas forcément à celles de leur environnement naturel.

Récemment, des chercheurs ont mis au point une peroxydase à hème, extraite du champignon *Coprinus cinereus*, plus résistante à la chaleur et au stress oxydatif. Ces chercheurs ont montré que cette peroxydase est susceptible de blanchir des colorants libres. Malheureusement, le champignon producteur de peroxydase ne pousse ni à haute température ni en présence de fortes concentrations de H₂O₂ et l'enzyme devient rapidement inactive dans un tel milieu.

Rivard [143] a enlevé les résidus oxydables autour de l'hème de cette peroxydase, dans le site actif, l'enzyme résultante s'est révélée stable thermiquement et plus résistante au peroxyde d'hydrogène. Dans un second temps, la recombinaison génétique des gènes mutés dans des levures et l'analyse de la réponse de ces hybrides, soumis à un stress identique à celui qu'ils subiraient dans une machine

à laver, a permis d'identifier une «super peroxydase», elle s'est avérée 60 fois plus résistante à l'oxydation.

Les secteurs du bois et du papier s'intéressent de près à ces enzymes qui pourraient permettre de remplacer certains traitements chimiques du bois.

3.3. Nomenclature et classification des peroxydases

Les recommandations pour la nomenclature des enzymes ont été regroupées dans une liste EC (« Enzyme Commission »), publiée la première fois en 1954 puis en 1992 par l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire [144]. Depuis, cette liste est régulièrement actualisée dans les revues scientifiques de biochimie et sur le site internet <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.

Les peroxydases (E.C. 1.11.1.x) utilisent notamment le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme substrat ou d'autres peroxydes, tels que les lipides hydroperoxydes. Les peroxydases à hème (E.C. 1.11.1.7) ont un rôle fondamental dans les différents processus physiologiques tels que la détoxification de l'excès des espèces actives de l'oxygène et la défense contre les pathogènes [145] [146]. Ces enzymes sont généralement regroupées dans deux grandes familles majeures : peroxydases des plantes et les peroxydases des animaux [147]. Les peroxydases des plantes sont des peroxydases à hème très répandues également chez les champignons et les bactéries et ont été récemment subdivisées en trois classes basées sur leur fonction et leur localisation cellulaire [148].

- La classe I strictement intracellulaire, y compris les cytochromes c peroxydases, les ascorbate peroxydases (APX) des plantes ainsi que les catalase-peroxydases des bactéries [149].
- La classe II produite par les champignons, comme la lignine peroxydase de *Phanerochaete chrysosporium*, la peroxydase à manganèse (MnP) du même champignon et la peroxydase produite par *Arthromyces ramosus* (ARP) [150].
- La classe III constituée par les peroxydases végétales, comme celles du raifort (HRP), de l'orge (BP) et du soja (SBP) [151].

3.4. Activité biologique des peroxydases

Ce type d'enzyme, unique dans les cellules vivantes, a notamment pour fonction de décomposer les peroxydes, les dérivés toxiques de l'oxygène (comme par exemple le peroxyde d'hydrogène).

En réalité, il n'y a pas une peroxydase mais des peroxydases car ce type d'enzyme existe chez presque tous les êtres vivants : chez les microorganismes, chez les plantes et chez les animaux. Ce pourrait donc être une molécule très ancienne.

Elle partage avec bien d'autres protéines une structure chimique appelée hème contenant du fer ionisé et capable de se lier à l'oxygène. Le fonctionnement de ces protéines hémiques est le plus souvent lié à la chimie de l'oxygène et de ses dérivés. C'est par exemple le cas des cytochromes (transporteurs respiratoires), de la catalase (une autre enzyme qui décompose l'eau oxygénée) et de divers pigments respiratoires des animaux comme la myoglobine et l'hémoglobine (<http://www.didier-pol.net/1peroxidase.html>).

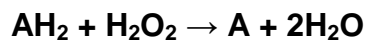
Les peroxydases assurent d'autres fonctions que la décomposition des peroxydes. Certaines interviennent dans le métabolisme de l'iode et sont nécessaires à l'élaboration des hormones thyroïdiennes. D'autres participent au transfert du chlore dans certaines cellules du système immunitaire, permettant ainsi la production d'hypochlorite (la vulgaire eau de Javel) servant à la destruction des microorganismes ingérés [152]. Les plantes en ont besoin pour fabriquer la lignine. A l'inverse, la lignine est exclusivement dégradée par certaines moisissures car elles seules disposent des peroxydases appropriées (champignon de la pourriture blanche du bois) [153]. D'autres microorganismes utilisent des peroxydases pour synthétiser des antibiotiques . Ces enzymes sont donc parmi les plus universelles du monde vivant.

Par ailleurs, elles constituent des outils extrêmement utiles pour le biologiste. On les utilise dans divers protocoles de laboratoire ; pour transférer de l'iode radioactif sur des protéines afin de les marquer [154] ; pour repérer la cible d'anticorps (anticorps conjugués avec la peroxydase dont les réactions colorées permettent la localisation dans les tissus) [155] ; pour établir les trajets extrêmement complexes des neurones dans le système nerveux (après injection de peroxydase au niveau

de terminaisons nerveuses, l'enzyme est transportée par les neurones jusqu'aux corps cellulaires situés dans les centres nerveux où une réaction colorée permet la détection) [156].

3.5. Activité chimique des peroxydases

Un hème est un cofacteur Les peroxydases contiennent parfois un hème, une cystéine ou séléno-cystéine qui font une réaction d'oxydo-réduction. Elles utilisent notamment le peroxyde d'hydrogène comme substrat, mais d'autres composés tels les lipides hydroperoxydes. Les donneurs d'électrons sont plus ou moins variés selon les peroxydases (liés au site actif). Une peroxydase est une enzyme de type oxydase qui catalyse typiquement une réaction de la forme :



Sachant qu'une oxydase est une enzyme catalysant une réaction d'oxydo-réduction impliquant une molécule de dioxygène (O_2) comme accepteur d'électron.

3.6. Peroxydases hémiques

Un hème est un cofacteur contenant un atome de fer servant à accueillir un gaz diatomique (souvent O_2) au centre d'un large anneau organique appelé porphyrine. Toutes les porphyrines ne contiennent pas nécessairement un atome de fer mais la majorité des métalloprotéines qui contiennent des porphyrines ont en fait l'hème comme sous-unité prosthétique (figure 12).

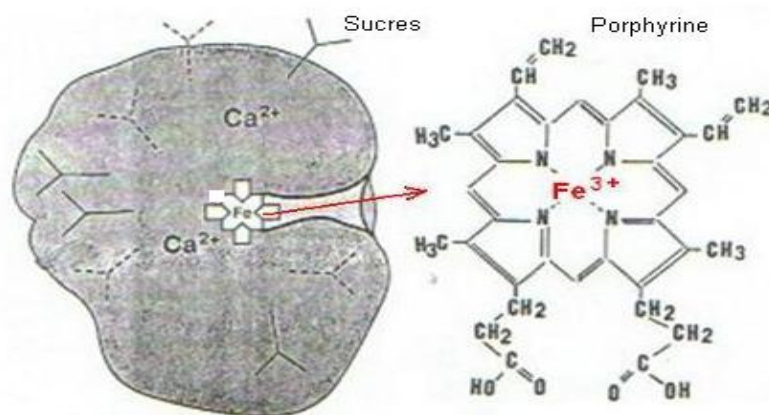


Figure 12 : Modèle d'une peroxydase de raifort [157] .

Il y a trois types d'hèmes biologiquement importantes. Le type le plus commun est appelé hème b. L'hémoglobine et la myoglobine sont des exemples de protéines qui contiennent l'hème b qui n'a pas de lien covalent avec l'apoprotéine dans laquelle il est trouvé.

L'hème a diffère de l'hème b parce qu'il a une chaîne latérale méthyle qui est oxydée en un groupe formyl et une chaîne latérale vinyle remplacée par une chaîne isoprénoïde. Comme l'hème b, l'hème a n'a pas de lien covalent à l'apoprotéine où il est trouvé. Un exemple de protéine contenant un hème a est la cytochrome-c-oxydase. L'hème c diffère de l'hème b par les deux chaînes latérales vinyle ayant un lien covalent avec la protéine elle-même.

3.6.1. Interactions entre l'hémine (Hème) et son environnement protéique

Ceci concerne surtout l'environnement hydrophobe de l'hémine. Ce dernier se trouve dans une poche limitée par des résidus d'acides aminés hydrophobes, les seuls groupements polaires à proximité appartiennent à His 42, Arg 38 et His 170.

La peroxydase présente deux zones [157] :

- une zone proximale par rapport à l'hème, c'est à ce niveau que l'hème est rattaché à l'apoprotéine.
 - une zone distale qui peut recevoir le peroxyde et d'autres petites molécules comme l'eau, le monoxyde de carbone (CO), le cyanide, le fluorure et l'azide. C'est à ce niveau que la sixième liaison de coordination avec le fer est établie.
- Le Fe (III) tend à établir avec son environnement immédiat 6 liaisons de coordination avec des atomes donneurs d'électrons. Si les atomes donneurs sont à champ fort (ex: N), ils imposent une répartition des électrons périphériques du fer qui le rend stable : c'est le fer 'bas-spin' peu réactif. Si les donneurs sont à champ plus faible (ex: O de l'eau), la répartition des électrons périphériques échappe à toute contrainte de leur part, le fer est dans un état électronique instable qui le rend très réactif : c'est le fer haut-spin. Le fer peut également être pentacoordiné. Des techniques physiques permettent de repérer les "états" du fer. Dans la peroxydase, le fer est dans un état haut-spin.

- Les six liaisons de coordination établies avec Fe (III) sont : 4 atomes d'azote (N) de la porphyrine et (01) un azote de His 170 (His proximal) situé à proximité et l'acide aminé His 42 (His distal) situé à l'extrémité opposée est trop éloigné pour établir la sixième coordination. Une molécule d'eau (eau distale) se trouve dans la zone polaire de la sixième coordination.

La peroxydase présente deux atomes de calciums situés dans les zones distale et proximale par rapport à l'hémine. Chaque atome de calcium est heptacoordonné (7 liaisons) avec des donneurs d'oxygène correspondant aux radicaux des acides aminés comme le COOH de Asp, le OH de Ser et Thr et à H₂O (eau distale).

Les figures 13-15 montrent bien la structure des peroxydases.

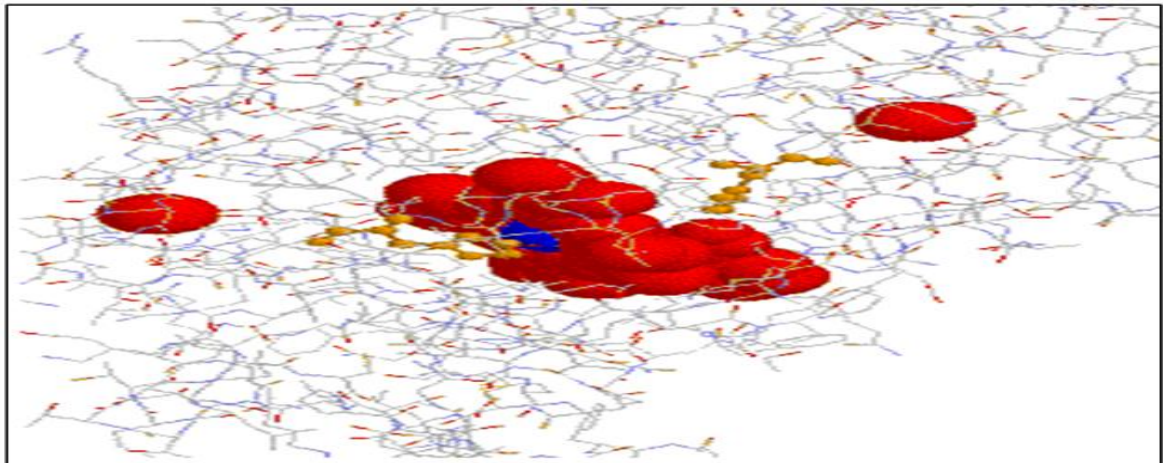


Figure 13 : Structure de la peroxydase à hème du navet. L'hème est représentée en rouge, l'atome Fe est en bleu, His 42 et His 170 sont en orange. [158].

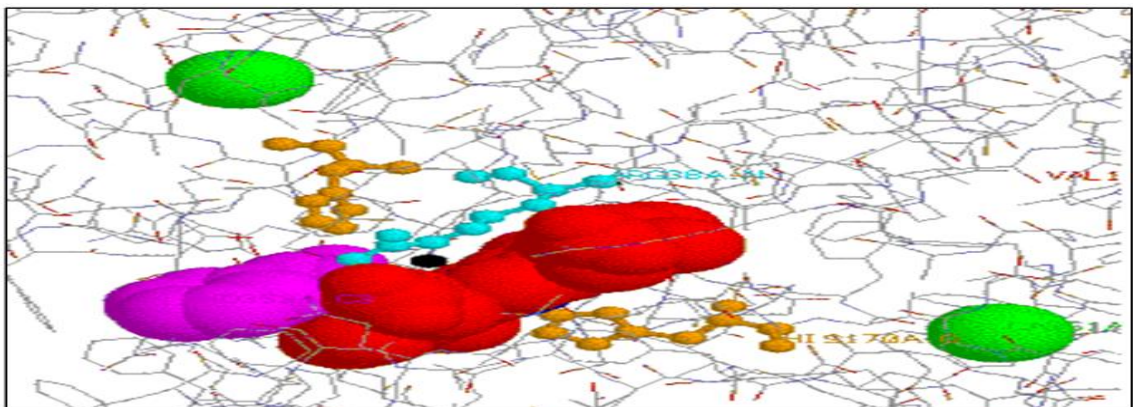


Figure 14 : Structure du complexe : acide benzhydroxamique, en violet, l'hème en rouge, le calcium en vert, His 42 et His 170 en orange, et Arginine 38 en bleue

clair[158].

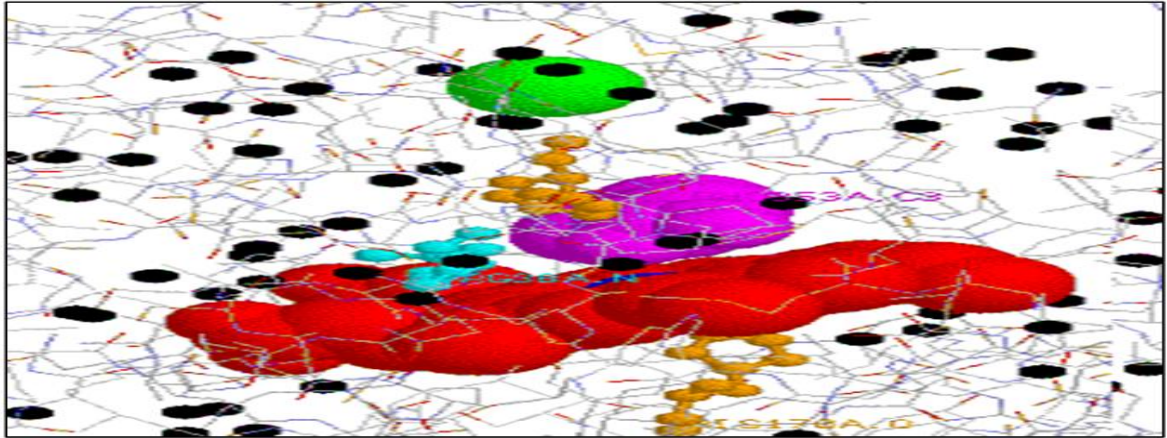
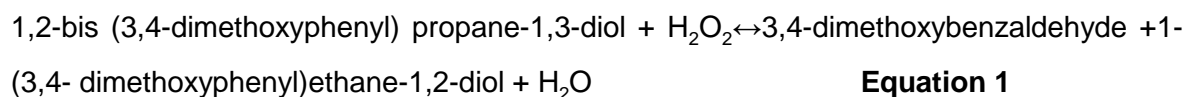


Figure 15 : Structure de la peroxydase du navet. L'hème est en rouge, l'atome Fe en bleu, le calcium, en vert, His 42 et His 170 en orange, l'acide benzhydroxamique, en violet, l'arginine 38 en bleue clair, et l'eau en noir [158].

3.7. Peroxydases de lignine (LiP)

Les peroxydases de lignine (aussi appelées diarylpropaneperoxydases, EC1.11.1.14) sont des glycoprotéines contenant un hème et jouent un rôle crucial dans la biodégradation de la lignine [153].

Ces enzymes catalysent la réaction générale :



Les peroxydases de lignine catalysent la dépolymérisation oxydante, dépendante de H_2O_2 , de composés de lignine non phénoliques (diarylpropane), de composés modèles de lignine non phénoliques $\beta\text{-O-4}$ et de nombreux composés phénoliques avec un potentiel redox allant jusqu'à 1,4V.

Les peroxydases de lignine oxydent les substrats en plusieurs transferts d'électrons et forment des radicaux intermédiaires, tels que les radicaux phénoxy et les cations radicalaires de l'alcool veratrylique (alcool 3,4-dimethoxybenzylique).

Ces radicaux intermédiaires connaissent des réactions non enzymatiques, telles que le couplage et la polymérisation radicalaires. Contrairement aux autres peroxydases, la peroxydase de lignine est capable d'oxyder des substrats aromatiques non phénoliques et ne requiert pas la participation de médiateurs vu son haut potentiel redox.

La peroxydase de lignine fut d'abord découverte dans le champignon *Phanerochaete chrysosporium* et différentes isoformes existent dans ce microorganisme et d'autres champignons de la pourriture blanche [153].

Les isozymes de peroxydase de lignine sont des glycoprotéines de 38 à 46 kDa. La peroxydase de lignine a une propriété distinctive d'un optimum de pH proche de 3. L'enzyme contient une molécule de protoporphyrine IX de fer par mole de protéine.

La structure cristalline de la peroxydase de lignine de *P. chrysosporium* a été décrite par [159]. Dans la figure 16 l'enzyme est globulaire avec une dimension de 50 x 40 x 40Å composée d'un domaine proximal (C-terminal) et d'un domaine distal (N-terminal).

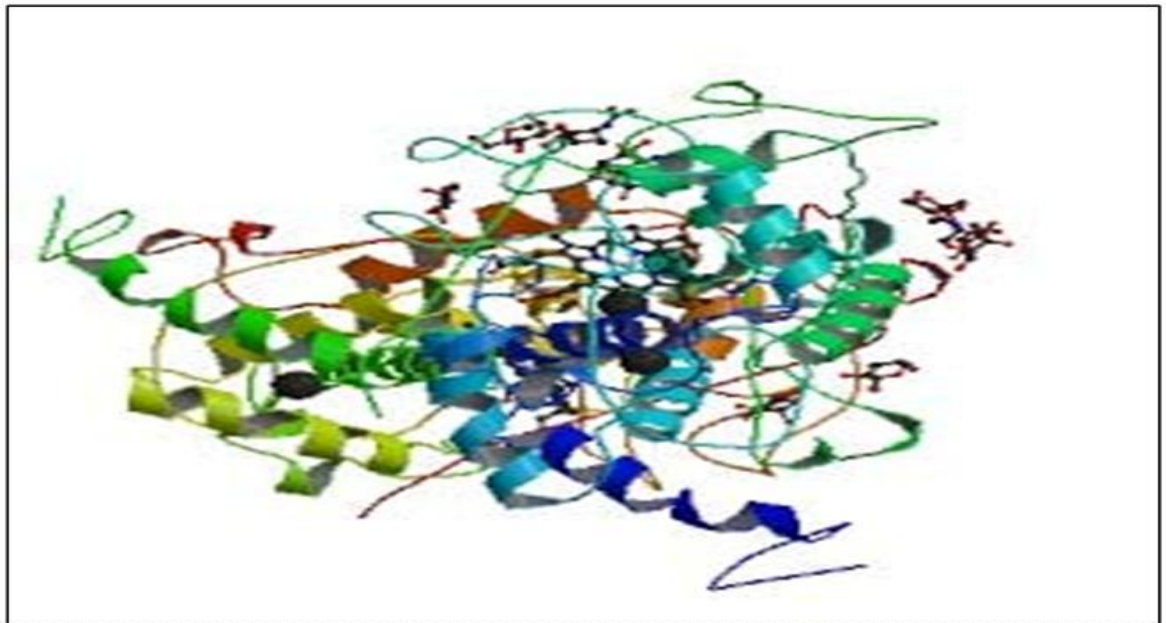


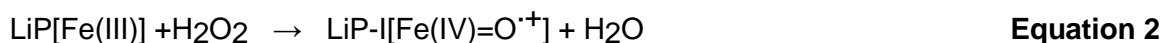
Figure 16 : Structure en ruban d'une peroxydase de lignine fongique [160] [161].

La structure cristalline de la peroxidase de lignine a montré que le groupe hème est enterré à l'intérieur de la protéine et a accès au milieu extérieur via un canal [162]. Quoique la taille du canal ne soit pas suffisante pour permettre aux grandes molécules de lignine d'avoir accès à l'hème, de petites molécules peuvent trouver un site de liaison convenable. L'enzyme contient huit hélices α majeures et huit hélices α mineures et une structure limitée β dans le domaine proximal [162].

Plusieurs sites de glycosylation N et O peuvent être identifiés dans la structure cristalline. La peroxydase de lignine possède huit résidus cystéine formant tous des ponts disulfure. Sont aussi présents deux sites de liaison du calcium, un dans chaque domaine. L'atome de fer de l'hème est principalement penta coordonné avec l'histidine du côté proximal comme cinquième ligand axial, et est stabilisé par liaison hydrogène avec l'histidine distale.

La peroxydase de lignine a un cycle catalytique typique des peroxydases. Le mécanisme de la réaction catalysée comprend deux étapes (Equations 2 à 4) [153].

- Une oxydation à $2e^-$ de l'enzyme ferrique native [Fe(III), LiP] pour produire le composé intermédiaire I qui existe sous la forme d'un cation radical de porphyrine de Fe(IV)[Fe(IV)=O $^{+}$, LiP-I], le peroxyde d'hydrogène étant scindé à la liaison O-O :

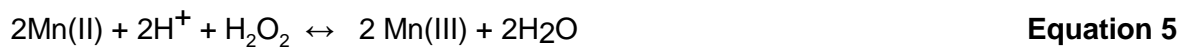


- Une double réduction consécutive à $1e^-$ de LiP-I par des substrats donneurs d'électrons pour conduire à l'enzyme native. La première réduction par un substrat réducteur, tel que l'alcool vératrylique, conduit au composé II ([Fe(IV)=O, LiP-II]) et un cation radical. Une seconde réduction ramène l'enzyme au stade d'oxydation ferrique.



3.8. Peroxydases à manganèses (MnP)

Les peroxydases à Mn(II): peroxyde d'hydrogène oxydoréductases, EC (1.11.1.13) sont des glycoprotéines extracellulaires et sont secrétées en de multiples isoformes qui contiennent une molécule d'hème sous forme de protoporphyrine IX de fer [163]. Les enzymes catalysent la réaction dépendante du manganèse suivante :



Le fer de l'hème dans la protéine native est dans l'état ferrique, penta coordonné, avec un résidu histidine coordonné comme cinquième ligand [153].

La structure générale des peroxydases à Mn est similaire à celle des peroxydases de lignine, comprenant deux domaines avec l'hème en sandwich entre eux (Figure 17).

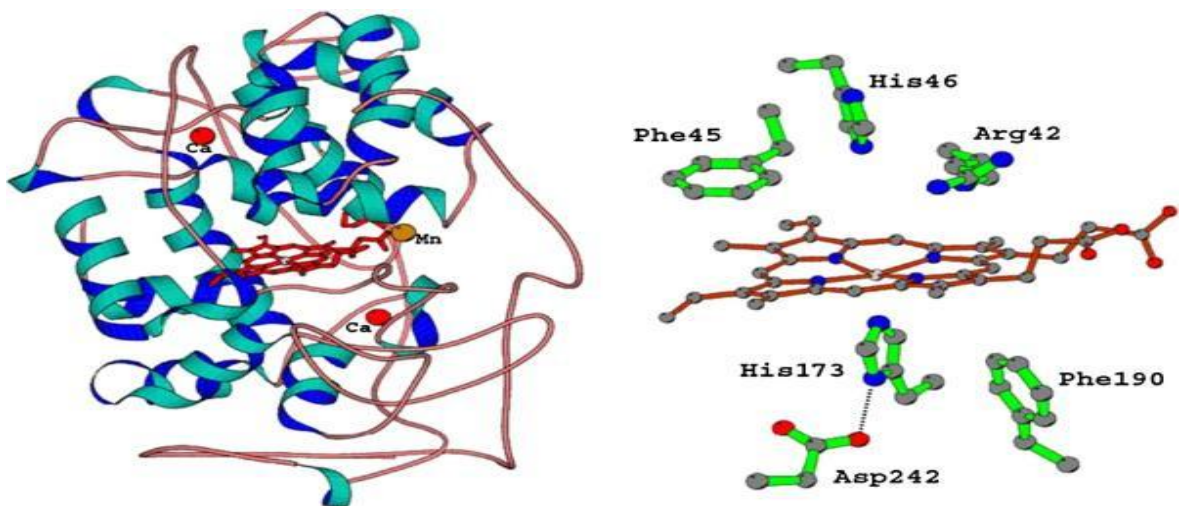
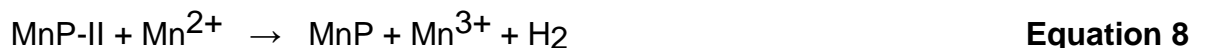
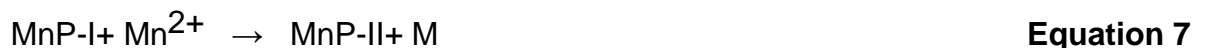


Figure 17 : Structure en ruban des peroxydases à Mn de *Phanerochaete chrysosporium* [161]. Les sphères rouges représentent les ions Ca^{2+} et l'emplacement de Mn(II) est indiqué près de l'hème.

La protéine contient dix hélices majeures et une hélice mineure comme dans la peroxydase de lignine. Le Mn(II) est situé dans un site de liaison cationique à la surface de la protéine.

Les peroxydases à Mn sont uniques dans la mesure où elles utilisent le Mn(II) comme substrat réducteur [153]. L'enzyme oxyde Mn(II) en Mn(III), qui est ensuite libéré de l'enzyme en complexe avec l'oxalate ou avec d'autres agents de chélation [163]. Le complexe de Mn(III) chélaté agit comme un médiateur redox réactif dans l'oxydation de substrats phénoliques tels que les simples phénols, les amines, les colorants, les sous-structures phénoliques de lignine et les dimères. Le potentiel d'oxydation du complexe Mn(III) est seulement limité aux structures phénoliques de lignine. Cependant, pour l'oxydation de substrats non phénoliques par Mn(III), des radicaux réactifs doivent être formés en présence d'un second médiateur.

Des acides organiques, tels que l'oxalate et le malonate, sont les composés primaires qui agissent comme médiateurs secondaires dans la production de radicaux réactifs. En absence de peroxyde d'hydrogène, ces radicaux peuvent être employés par les peroxydases de manganèse comme source de peroxydes et augmenter l'efficacité de dégradation de la lignine par les champignons. Le cycle catalytique comprend ainsi l'oxydation de Mn(II) par le composé manganèse peroxydase I (MnP-I) et le composé manganèse peroxydase II (MnP-II) pour générer Mn(III) (Equations 6 à 8) :



Mn(III), à son tour, assure la médiation de l'oxydation de substrats organiques (Equation 9) :



Les caractéristiques du cycle sont très similaires à celles des peroxydases de lignine. Les peroxydases à Mn sont sans doute capables de rivaliser avec les potentielles applications des laccases en biotechnologie [163].

Ainsi, la présence de la peroxydase manganèse peut augmenter le taux de décoloration des colorants. De plus, les peroxydases à Mn de la pourriture blanche sont considérées comme les principales enzymes responsables du bioblanchiment des pâtes kraft.

3.9. Peroxydases versatiles

Certaines peroxydases à Mn montrent des activités sur les substrats aromatiques similaires aux peroxydases de lignine [153]. Ce groupe d'enzymes, connu comme peroxydases versatiles (EC1.11.1.16), est non seulement capable d'oxyder Mn(II) en Mn(III) comme avec les peroxydases à Mn, mais aussi des substrats phénoliques et non phénoliques qui sont typiques des peroxydases de lignine.

La caractérisation moléculaire des peroxydases versatiles révèle des structures qui sont plus proches des peroxydases de lignine que des isozymes des peroxydases à Mn. Un site de liaison du Mn(II) existe à proximité du propionate interne de l'hème. De plus, des résidus impliqués dans l'interaction des peroxydases de lignine avec les substrats aromatiques existent aussi dans la structure de la protéine.

Le modèle moléculaire de la peroxydase versatile de *Pleurotus eryngii* révèle 12 hélices, 4 liaisons disulfures, une poche pour l'hème contenant les histidines caractéristiques proximale et distale, 2 sites Ca^{2+} et un site de liaison du Mn(II) (Figure 18).

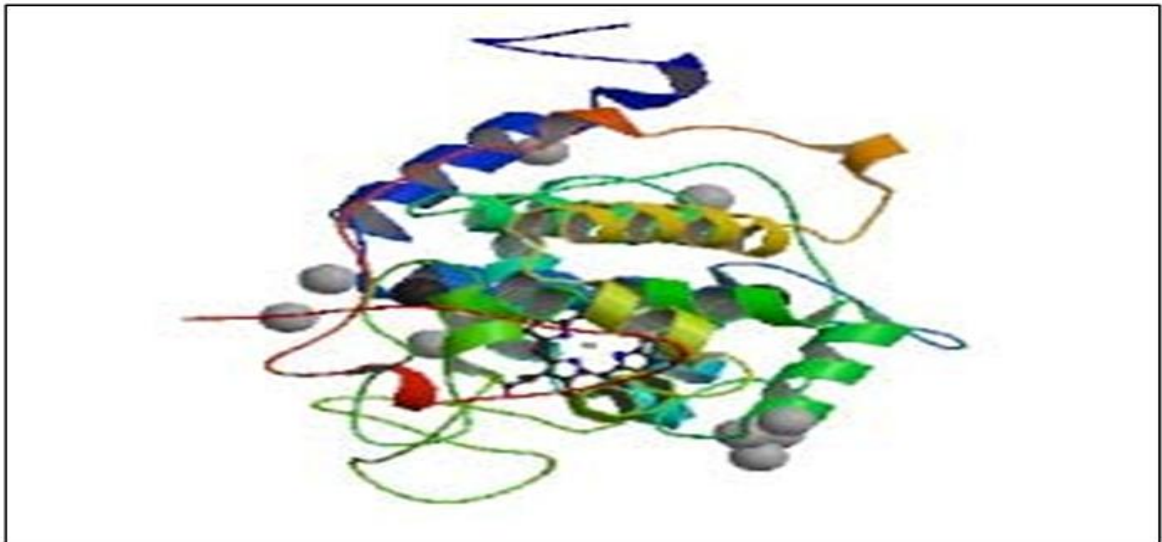


Figure 18 : Structure en ruban de la peroxydase versatile

[161] [164].

Les peroxydases versatiles forment un groupe d'enzymes ligninolytiques intéressant en raison de leur versatilité catalytique. Ceci rend les peroxydases versatiles plus efficaces à la fois que les peroxydases de lignine, qui ne peuvent oxyder efficacement les composés phénoliques en absence d'alcool veratrylique, et les peroxydases à Mn, qui ne peuvent oxyder les phénols en absence de Mn(II). De manière similaire au mécanisme avec les peroxydases à Mn, Mn(III) est libéré des peroxydases versatiles et agit comme un oxydant de la lignine phénolique et des substrats phénoliques libres.

Comme d'autres membres des peroxydases à hème, l'hème est enterré à l'intérieur de la protéine et a accès au milieu extérieur *via* deux canaux. La fonction du premier canal est similaire à celle décrite pour les peroxydases de lignine et est conservée pour toutes les peroxydases à hème. Au contraire, le second canal est spécifique aux peroxydases versatiles et aux peroxydases à Mn, et se situe là où l'oxydation de Mn(II) en Mn(III) a lieu.

3.10. Conclusion

Les peroxydases sont parmi les enzymes les plus universelles du monde vivant. Ce type d'enzyme existe chez presque tous les êtres vivants : les microorganismes, les plantes et les animaux.

La peroxydase de lignine joue un rôle crucial dans la biodégradation de la lignine, elle fut d'abord découverte dans le champignon *P. chrysosporium* et également a été isolée, purifiée et caractérisée chez *Streptomyces viridosporus* appartient aux actinomycètes qui dégradent la lignine.

La peroxydase de lignine a un cycle catalytique typique des peroxydases et la structure générale des peroxydases à Mn est similaire à celle des peroxydases de lignine, ainsi leurs présence peut augmenter le taux de décoloration des colorants.

Les peroxydases versatiles sont plus efficaces à la fois que les peroxydases de lignine, qui ne peuvent oxyder efficacement les composés phénoliques en absence d'alcool veratrylique, et les peroxydases à manganèses, qui ne peuvent oxyder les phénols en absence de Mn(II).

Aujourd'hui, certaines peroxydases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et utilisé en biotechnologie industrielle et d'autres sont de merveilleux outils dans la recherche biomédicale. On commence également à fabriquer des enzymes artificielles plus stables dans des environnements physico-chimiques extrêmes. Il s'agit donc d'un thème à la fois très intéressant et prometteur au point de vue économique et essentiel pour la compréhension du fonctionnement des êtres vivants.

Notre travail a pour but le criblage d'une nouvelle activité peroxydase qui serait la plus performante possible afin de répondre aux exigences des applications industrielles, notamment en détergence et en traitement des eaux. La caractérisation biochimique et moléculaire de cette activité ainsi que l'analyse structurale de cette nouvelle peroxydase est l'un des objectifs de ce travail.

CHAPITRE 4 : MATERIEL ET METHODES

4.1. SITES D'ETUDE ET ECHANTILLONNAGE

Le sol de surface de la plaine de la Mitidja (région de Meftah) est utilisé au cours de cette présente étude pour isoler les streptomycètes dégradants les acides humiques. Le site d'étude est représenté par un sol très fertile et riche en MO [165].

Les caractéristiques géoclimatiques de la station du sol de Meftah sont :

- Position : 30 km au sud-est d'Alger et à environ 40 km au nord-est de Blida.
- Altitude : 45 m, long 03 °. 12 '0.54" E. Lat 36°.38'.9"N.
- Climat : Méditerranéen.

Les critères pédologiques du sol de surface de Meftah sont présentés comme suit : [166] [167] :

- Profondeur de l'échantillonnage : 0 - 20 cm.
- Humidité au moment de l'échantillonnage : 22%.
- Matière organique : 6%.
- Taux du calcaire : 3%
- Texture : limoneux.
- Classification du sol : Vertisols.

L'isolement des streptomycètes est réalisé à partir d'un (01) échantillon de sol provenant de la région de Meftah. Le prélèvement a été effectué aseptiquement en surface après avoir enlevé les trois premiers centimètres de sol. Le sol est placé dans un sac stérile et bien fermé et est conservé à +4 °C jusqu'à l'analyse.

4.2. Extraction et caractérisation des acides humiques

4.2.1. Extraction des acides humiques

Le sol a été prélevé durant le mois de Mars 2007 à une profondeur de 0 - 20 cm à partir d'un sol cultivé. Le sol a été séché à l'air et tamisé pour éliminer les gros débris végétaux.

L'extraction et le fractionnement des SHs ont été effectués selon Fukushima [168] et Lopez [169] dont les étapes 1 à 4 ont été appliquées successivement comme suit :

- Un (01) gramme du sol frais a été traité avec 20 mL d'une solution de pyrophosphate de sodium ($0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaOH}$). Le pH est égal à 13, mesuré par un pH mètre (type Cyber Scan pH 510).
- Le mélange (sol + pyrophosphate de sodium) est mis dans un flacon scellé et agité (200 rpm / 30 min), puis l'échantillon a été conservé pendant 12 h à +4 °C.
- Le mélange obtenu de l'étape précédente est acidifié à pH 2 avec une solution de H_2SO_4 (6 N). La fraction insoluble qui précipite contenant les AHs est ensuite séparée par centrifugation (4000 rp / 30 min).
- La fraction de l'étape 3 est re-dissoute dans 0,1 N de NaOH (solution contenant les AHs) est incubée à 60 °C jusqu'au séchage.

4.2.2. Préparation et purification des acides humiques

Les acides humiques commercialisés (AHC) (Aldrich) et les acides humiques extraits du sol (AHS) ont été employés durant toutes les étapes de l'étude.

Un (01) g de AHS ou AHC est dissous dans 62,5 mL de NaOH 2 N, puis complété à un litre avec de l'eau distillée et ensuite agitée sous atmosphère d'azote pendant 20 min. Le pH de la solution est ajusté à $1,0 \pm 0,2$ par HCl (1 N). Les agrégats ainsi obtenus après acidification sont dissous à nouveau dans NaOH 0,1 et la solution obtenue est agitée pendant 48 h et conservée à +4 °C dans l'obscurité.

4.2.3. Caractérisation des acides humiques

4.2.3.1. Par spectroscopie UV-visible et détermination du rapport E_{465}/E_{665}

La spectroscopie UV-visible est utilisée par de nombreux auteurs pour caractériser les AHs [170] [171].

Le spectrophotomètre UV-visible à mono faisceau de marque Technicomp 8500 avec une cellule en quartz de 1 cm est utilisé dans notre cas pour la détermination des spectres caractéristiques des AHs étudiés. Les spectres sont tracés de 800 à 200 nm après réalisation d'une ligne de base sur toute la longueur d'onde du spectre à tracer avec la cuve remplie d'eau distillée.

Une préparation d'une solution de 0,3 mg d'AHs dissout dans 10 mL de NaHCO₃ (0,05M) à un pH 8,3 servira pour la mesure de l'absorbance à 465 et 665 nm [172].

La caractérisation comparative des AHs est basée sur le rapport E_{465}/E_{665} des absorbances spectrales spécifiques à 465 et à 665 nm avec le balayage sur la gamme UV-visible [173].

4.2.3.2. Par spectroscopie infrarouge

Le spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est largement utilisé pour l'étude des AHs du sol. Elle permet de caractériser les fonctions chimiques de produits organiques [172]. L'échantillon d'AH est préparé par micropastillage de 1 ou 2 mm dans du bromure de potassium (KBr) à une concentration d'environ 0,004% (1 mg AH/250 mg KBr) en masse et soumis à une pression de 20 bar/cm². La pastille ainsi formée est analysée à l'aide d'un appareil de type SHIMADZU de type FTIR 9800. Les spectres d'absorption IR sont mesurés entre 400 et 4000 cm⁻¹ et enregistrés par un logiciel Huper tous les 8 cm⁻¹. Le spectre obtenu représente $Abs = f(\tau)$ avec : Abs = Absorbance, nombre d'onde = $1/\lambda$ exprimé en cm⁻¹. Logiciel Bio-Red IR Search MasrchMaster est utilisé pour le traitement des spectres obtenus.

4.2.3.3. Par microscope électronique à balayage

L'examen microscopique a été réalisé à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) de marque ESEM XC30FEG, piloté par un ordinateur, ce qui donne une information sur le pourcentage atomique des éléments majeurs présents à la surface de l'échantillon d'AH [174].

4.3. Isolement des souches de streptomycètes

4.3.1. Milieu d'isolement

Les streptomycètes ont été isolés sur milieu HA-Agar [175] (Annexe 1). La croissance des champignons est empêchée par addition d'actidione à raison de 50 mg/L du milieu d'isolement.

4.3.2. Technique d'isolement et d'incubation

La méthode d'ensemencement utilisée est celle des suspensions-dilutions [176] et l'étalement est réalisé sur le milieu HA-Agar coulé en boîtes de Pétri stériles.

La suspension-mère est préparée par addition de 1g de sol (prélevé d'une façon homogène à partir de l'échantillon du sol) dans 9 mL d'eau distillée stérile (dilution 10^{-1}). Cinq autres dilutions (10^{-2} jusqu'à 10^{-6}) sont préparées par dilution 10 en 10 après homogénéisation de la dilution de départ par un mélange vigoureux à l'aide du vortex. Un volume de 0,1 mL est étalé sur le milieu d'isolement et trois répétitions sont effectuées pour chacune des dilutions.

Les boîtes ensemencées sont mises en incubation dans l'étuve à 30 °C pendant 2 à 6 semaines.

4.3.3. Choix des isolats de streptomycètes

Après incubation, les boîtes de Pétri ensemencées sont examinées chaque semaine à l'œil nu et au microscope optique (G x10 et x 40) pour observer les colonies de streptomycètes qui apparaissent à la surface du milieu d'isolement. Les colonies qui présentent les caractéristiques morphologiques des streptomycètes et entourées par un halo clair de dégradation des AHs sont prélevées délicatement à l'aide d'une pointe stérile, puis déposées sur milieu ISP2 pour être purifiées.

4.3.4. Purification et conservation des streptomycètes

Les colonies sélectionnées sont purifiées par stries sur milieu ISP2. Les isolats purs, codés, sont ensemencés sur le même milieu coulé en pente dans des tubes à vis. Ces derniers sont incubés pendant une à trois semaines puis conservés à +4 °C.

Les isolats sont aussi conservés à long terme dans du glycérol à 20% après une bonne sporulation dont les spores sont grattées et transférées dans des cryotubes contenant le glycérol puis conservées à -20 °C.

4.4. Sélection des souches de streptomycètes à fort potentiel dégradatif des AHs

Les isolats obtenus ont été examinés pour leur potentiel dégradatif des AHs en utilisant les AHC. La décoloration a été surveillée sur un milieu liquide pauvre (MLP) contenant des quantités à l'état de traces de sources de carbone et d'azote tel que rapporté par [Dari et al. \(1995\)](#).

Le milieu contenant : **(1)** les sels minéraux (en L⁻¹: KH₂PO₄: 2,38 g; K₂HPO₄·3H₂O: 5,65 g; MgSO₄·7H₂O: 1 g ; **(2)** 1 ml de solution contenant des éléments en état de traces en L⁻¹ (CuSO₄·5H₂O : 0,64 g; FeSO₄·7H₂O: 0,11 g; MnCl₂·4H₂O: 0,79 g; ZnSO₄·7H₂O: 0,15 g) ; **(3)** du glucose (0,1 g L⁻¹), **(4)** (NH₄)₂SO₄ (0,084 g L⁻¹) et **(5)** AHC (0,5 g L⁻¹).

Le milieu de croissance et la solution d'AHC ont été ajustés à un pH de 7,2 ± 0,01 et stérilisés séparément par filtration membranaire (0,22 µm), puis mélangés pour obtenir le milieu MLP.

Dix (10) mL du MLP ont été réparties dans des tubes à vis (16 cm de haut et de 2 cm de diamètre). La culture des spores incubées pendant 2 à 4 semaines en milieu solide ISP2 a été utilisée en tant que culture d'inoculation à raison d'un disque (0,5 cm de diamètre).

Les tubes contenant les cultures ont été incubés à 30 °C pendant 21 jours dans l'obscurité sous agitation (150 rpm).

4.5. Quantification des AHs dans le milieu de culture

La dégradation (ou la décoloration des AHs) a été mesurée en tenant compte la diminution de l'absorbance par rapport aux cultures non-inoculées. Après la période d'incubation, les cultures ont été centrifugées (5000 rpm pendant 15 min) et les surnageants ont été filtrés à l'aide d'un système du seringue micro filtre (Thomapor®-Mem- branfilter, 5FP 025/1).

Deux mL du surnageant ont été dilués 5 fois avec NaOH 0,5M et puis l'absorbance est mesurée à 350 nm à un pH de 4,5 ± 0,01. Les courbes standards ont été établies en mesurant l'absorbance des concentrations connues d'AH. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois et le taux de la décoloration a été calculé tel que rapporté par Wong et al. [153] en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de décoloration} = \frac{[(OD_1 - OD_t) / OD_1] \times 100}{}$$

OD₁ : absorbance initiale ; **OD_t** : absorbance après incubation à l'instant t (jours).

4.6. Identification phénotypique de la souche sélectionnée

4.6.1. Etude morphologique

Les caractères morphologiques et culturels de la souche sélectionnée sont effectués comme décrit par Shirling et Gottlieb [176] et Nonomura [177].

Ils ont été déterminés par l'examen macromorphologique des cultures anciennes de 7 jours cultivées sur différents milieux ISP : ISP2, ISP3, ISP4, et ISP5 recommandés par Shirling et Gottlieb [176] (Annexe 1).

Cette étude consiste à noter et à estimer chaque semaine (pendant trois semaines) la croissance sur les milieux précités. La couleur des mycéliums aériens et du substrat, ainsi que celle des pigments diffusibles dans les milieux de culture est déterminée à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color, ISCC-NBS).

L'étude micromorphologique est essentielle pour la reconnaissance des genres. Elle est réalisée à l'aide d'un microscope optique (G x 10 et G x 40). Ces observations sont réalisées directement sur la boîte de Pétri (*in situ*) pour ne pas altérer les structures en place (mycéliums et fructifications). Elle consiste à observer la sporulation du mycélium aérien et la fragmentation ou non du mycélium du substrat.

4.6.2. Etude chimique des constituants cellulaires

Elle consiste à déterminer la composition des cellules en acides aminés et en sucres. Les différentes étapes de cette étude sont :

- Obtention de la biomasse

Une bonne croissance a été obtenue après incubation à 30° C pendant 72 h dans le milieu liquide ISP2. Le mycélium est récolté après avoir été lavé (cinq fois avec de l'eau distillée plus une fois avec l'éthanol 96°) et puis séché à 40 °C. La biomasse sèche ainsi obtenue est conservée à -20 °C pour les analyses ultérieures. Elle sera utilisée pour les analyses des acides aminés et sucres.

- Analyses des acides aminés

Cette analyse consiste à déterminer la forme isomérique de l'acide diaminopimélique (DAP) qui peut être sous forme LL ou DL et mise en évidence de la glycine de la paroi.

La méthode utilisée est celle de Becker *et al.* [178]. Dix mg (10) de mycélium sec sont hydrolysés pendant 18 h à 100 °C, dans un four Pasteur, par 1 mL de HCl 6N dans des tubes à vis hermétiquement fermés. Les débris mycéliens sont éliminés par filtration des hydrolysats sur papier en verre préalablement saturés par du HCl 6N (pour éviter des pertes). Les filtrats sont évaporés à sec dans un bain de sable chaud. Des lavages à l'eau distillée sont effectués jusqu'à l'obtention d'un pH compris entre 5,5 et 7.

Le résidu sec obtenu est repris dans 0,3 mL d'eau distillée. Quinze (15) µL d'hydrolysats sont chromatographiés sur papier Whatman n°1, ainsi que 10 µL des standards (solutions aqueuses à 0,01 M de DAP contenant les deux isomères LL et DL, et la glycine à 0,2%).

Les chromatogrammes sont développés pendant 18 h en chromatographie descendante à front perdu dans un solvant composé de méthanol, eau distillée, HCl et de pyridine (8/17,5/2,5/10 en volumes) puis séchés sous hotte à température ambiante.

Les chromatogrammes sont révélés par une solution à 0,2% (p/v) de ninhydrine dissoute dans l'acétone, puis chauffés pendant 5 min à l'étuve à 100 °C.

Les taches de DAP sont de couleur olive-brunâtre virant par la suite au jaune vif. La forme LL migre plus rapidement que la forme DL. La glycine apparaît de couleur violette et migre plus rapidement que les deux isomères de DAP.

- Analyse des sucres

Cette analyse consiste à déterminer la composition cytoplasmique en sucres taxonomiquement importants.

La méthode utilisée est l'hydrolyse acide préconisée par Lechevalier et Lechevalier [179]. Cinquante (50) mg de biomasse sèche sont hydrolysés par 2 mL de H₂SO₄ 1N dans des tubes scellés, pendant 2 h à 100 °C dans un four Pasteur. Après refroidissement, l'acide est neutralisé avec une solution saturée d'hydroxyde de baryum jusqu'à l'obtention d'un pH compris entre 6 et 7. Le précipité blanc obtenu est éliminé par centrifugation (4000 rpm durant 20 min). Le surnageant est recueilli et évaporé à sec à 40 °C au Rotavapeur. Le résidu sec obtenu est dissout dans 0,3 mL d'eau distillée. Vingt (20) µL d'hydrolysats sont déposés sur papier Whatman n° 1, de même que 15 µL des solutions standards aqueuses à 0,1% des sucres suivants : arabinose, galactose, glucose, mannose, ribose, rhamnose et xylose sont aussi déposées.

Les chromatogrammes sont développés durant 36 h par chromatographie descendante à front perdu. Le système de solvant utilisé est la partie supérieure d'un mélange de *n*-butanol, eau distillée, pyridine et toluène (5/3/3/4 en volumes).

La révélation des chromatogrammes (séchés sous hotte à température ambiante) est réalisée par une solution acide de phtalate par la solubilisation de 3,25 g d'acide phtalique dans 100 mL de *n*-butanol saturé avec de l'eau distillée, plus 2 mL d'aniline. Après chauffage à 100 °C pendant 5 min, les taches apparaissent de couleur rose pour les pentoses et brune pour les hexoses selon l'ordre de migration suivant (de haut en bas) : rhamnose, ribose, xylose, arabinose, mannose, glucose et galactose.

4.6.3. Etude physiologique et biochimique

Cette étude repose sur les tests de différenciation (Gram, catalase et oxydase) et les tests biochimiques.

Les tests de différenciation sont faits selon les protocoles standards couramment employés en microbiologie alors que les tests biochimiques destinés pour l'identification des streptomycètes ont été effectués par le système galerie API en utilisant les galeries API 50CH (Performance of carbohydrate metabolism tests : Ref. 50300) et API ZYM (Semiquantitation of enzymatic activities : Ref. 25200) (bio Merieux, Marcy l'étoile, France). (Annexe 2).

4.7. Identification génotypique par la technique ARN 16S

La plupart de ces techniques sont décrites dans le livre de « Molecular Cloning » [180].

L'étude moléculaire a été achevée suite à l'amplification par PCR du gène d'ARNr 16S en utilisant l'ADNg de la souche sélectionnée et des amorces nucléotidiques ; Oligo D-73 et Oligo R-74 dont les séquences appartiennent aux régions conservées flanquant ce gène, respectivement de 8 à 27 et de 1541 à 1525 de l'opéron d'ARNr chez *E. coli* (Annexe 5). Les fragments PCR de tailles attendues sont purifiés puis clonés et leurs séquences nucléotidiques sont déterminées (tableau 4).

Tableau 4 : Les séquences des différents oligonucléotides utilisés dans cette étude pour les amplifications du gène de l'ARNr 16S de la souche sélectionnée.

| <u>OLIGO-NUCLEOTIDES</u> | <u>SEQUENCES DES OLIGONUCLEOTIDES</u> | <u>TAILLE (PB)</u> | <u>TEM (°C)</u> |
|--------------------------|---------------------------------------|--------------------|-----------------|
| Oligo D-S73 | 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ^{3'} | 20 | 48 |
| Oligo R-S74 | 5'AAGGAGGTGATCCAAGCC ^{3'} | 18 | 51 |
| Oligo D-S156 | 5'ATTCCACGTGTAGCGGTG ^{3'} | 18 | 52 |
| Oligo R-S157 | 5'ATCTCACGACACGAGCTG ^{3'} | 18 | 52 |

4.7.1. Extraction de l'ADN génomique (ADNg) à partir de la souche sélectionnée

Un clone isolé sur boîte de Pétri est mis en culture pendant une nuit dans 400 mL de milieu approprié. Après 24 h d'incubation, nous centrifugeons dans un tube NALGENE pendant 10 min à 8000 rpm. Le culot cellulaire est lavé avec 10 mL de tampon I (50 mM glucose anhydre ; 25 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0). Les cellules sont alors lysées dans 20 mL de tampon I contenant 5 mg/mL de lysozyme et sont incubées une heure à 37 °C.

La solution est alors centrifugée à 8000 rpm pendant 15 min à 4 °C et le culot cellulaire est resuspendu dans 30 mL de tampon II (10 mM Tris-base ; 100 mM NaCl ; 5 mM EDTA et 1% du dodécyl sulfate de sodium (SDS) à pH 8,0).

Au surnageant on ajoute 30 mL de phénol/chloroforme (v/v) et après centrifugation pendant 20 min à 8000 rpm on ajoute 2,5 volume d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2.

On récupère à l'aide d'une pipette Pasteur effilée les filaments d'ADN apparus puis on remet en solution les filaments dans 2 mL de TE 1× [100 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0]. On centrifuge ensuite la solution restante pendant 15 min à 10000 rpm, le précipité est resuspendu dans 6 mL de TE 1× contenant 10 mg/mL de RNase A et incubé à 37 °C pendant 1 à 2 h. Puis on ajoute de la protéinase K à une concentration finale de 5 mg/mL et on incube la solution à 50 °C pendant 2 à 3 h. Après une extraction avec 1 volume de phénol suivie d'une autre extraction par 1 volume égal de phénol/chloroforme puis une dernière extraction avec 1 volume de chloroforme, la solution est précipitée avec 2 volumes d'éthanol 100% et 10% de chlorure de sodium 5 M ou d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et laissée au moins 2 h à -20 °C ou gardée 15 min à -80 °C. La solution est alors centrifugée à 12000 rpm pendant 15 min et le précipité est lavé avec une solution d'éthanol 70% et séché à température ambiante pendant environ 15 min. Enfin, le précipité est resuspendu dans 50 µL d'eau MilliQ ou de TE 1× et conservé à -20 °C.

4.7.2. Électrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet de séparer les fragments d'ADN selon leurs tailles. L'électrophorèse d'ADN est réalisée sur gels d'agarose à des concentrations variables. Nous avons le plus souvent utilisé des gels à 1% d'agarose. L'agarose est fondu dans un tampon à pH 8,0 [TAE 1× (40 mM Tris-acétate et 5 mM EDTA) ou TBE 1× (90 mM Tris-borate et 20 mM EDTA)], auquel on ajoute du bromure d'éthidium (BET) à une concentration finale de 0,5 µg/mL.

La migration se fait dans un champ électrique à voltage constant. Le BET est un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce quand il est excité par des rayons U-V à 254 ou à 365 nm. Il permet donc de détecter au moyen d'un transilluminateur la présence d'ADN. Afin de déterminer la taille de l'ADN, il est nécessaire de faire migrer en même temps que les échantillons un marqueur de taille (exemples : *λ*HindIII et *λ*HincII).

4.7.3. Dosage de l'ADN

Selon la pureté de l'échantillon, la quantité d'ADN peut être déterminée soit par spectrophotométrie, soit par estimation de la concentration après électrophorèse sur gel d'agarose.

4.7.3.1. Méthode spectrophotométrique

La lecture des densités optiques est effectuée à 280 nm et à 260 nm. Une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 µg/mL d'ADN double brin. La pureté de l'ADN est estimée par le rapport DO_{260}/DO_{280} . Ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2. Quand la valeur est $< 1,8$, les solutions sont considérées comme étant contaminées par des protéines.

4.7.3.2. Méthode utilisant la fluorescence émise par le BET (méthode empirique)

L'intensité de la fluorescence émise par les molécules de BET intercalées au sein de l'ADN est proportionnelle à la masse totale de ce dernier. Ainsi, la quantité d'ADN présente dans l'échantillon est estimée par comparaison de la fluorescence de l'échantillon et celle d'une gamme de concentration connue après électrophorèse sur gel d'agarose.

4.7.4. Purification de fragments d'ADN par la méthode d'élution

Pour purifier des fragments d'ADN, nous avons aussi utilisé une autre technique dite d'élution à partir de gel d'agarose. Cette technique utilise un agarose spécial ayant un point de fusion bas vers 65 °C (NuSieve® GTG® Agarose). Après séparation des fragments par électrophorèse sur gel d'agarose, on visualise la bande à purifier et on découpe la partie du gel qui le contient. On ajoute un volume suffisant de TE 1× de façon à recouvrir l'agarose et on incube à 65 °C pendant 10 min jusqu'à liquéfaction complète de l'agarose. Après extraction au phénol/chloroforme, on précipite l'ADN en présence du glycogène (200 µg/mL). En fin on centrifuge et le culot d'ADN est resuspendu dans du TE 1×.

4.7.5. Amplification génique de l'ADN ou technique PCR

La PCR (« Polymerase Chain Reaction ») est une technique qui permet l'amplification spécifique d'une séquence d'ADN grâce à deux amorces nucléotidiques synthétiques en s'hybridant avec des séquences complémentaires bordant la séquence à amplifier.

Le volume du milieu réactionnel de la PCR est généralement de 50 µL contenant 0,5 à 2 unités de l'ADN polymérase, 100 à 500 ng de l'ADN matrice, 10 picomol de chacun des deux amorces, 5 à 10 mM de chacune des bases dNTP sans mettre les sels adéquats à l'enzyme selon les instructions du fabricant.

Au cours de ce travail nous avons adopté les conditions ci-dessous en utilisant l'appareil PCR (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler)

| | |
|--------------|--|
| 1 µL | ADNg (~ 300 ng) |
| 5 µL | Tampon d'ADN polymérase <i>Taq</i> ou <i>Pfu</i> |
| 2 µL | dNTP (10 mM) |
| 5 µL | Amorce directe (10 pmol) |
| 5 µL | Amorce reverse (10 pmol) |
| 1 µL | ADN polymérase <i>Taq</i> ou <i>Pfu</i> (2 U) |
| 1 µL | MgCl ₂ 25 mM (facultatif) |
| 5 µL | DMSO 50% (facultatif) |
| q.s.p. 50 µL | H ₂ O ultrapure |

Dans nos conditions, une étape de dénaturation de la matrice pendant 45 secondes à 94 °C est suivie de 35 cycles de polymérisation dont chacun comprend :

- Une étape d'hybridation des nucléotides amorces à la matrice (1 minute à la température d'hybridation convenable comprise entre 45 et 65 °C).
- Une étape de polymérisation par une ADN polymérase (1 à 2 minutes à 72 °C).

Une étape de polymérisation supplémentaire de 10 min à 72 °C est généralement réalisée afin que la *Taq* polymérase puisse additionner un dATP à l'extrémité 3' du fragment amplifié ce qui permet le clonage dans des vecteurs adéquats (pCR2.1 et pGEM-T Easy). Lorsque l'amplification est réalisée par la *Pfu* polymérase, incapable d'ajouter des dATP à l'extrémité 3', cette étape supplémentaire est réalisée après purification de l'ADN moyennant la *Taq* polymérase en présence de d'ATP.

4.7.6. Séquençage de l'ADNr 16S et analyse phylogénétique

Pour déterminer la séquence du gène de l'ADN ribosomal 16S, nous avons utilisé le séquenceur automatique « Automated 3100 Genetic Analyser » (Applied Biosystems) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS, Tunisie).

Les résultats de la séquence ont été importés dans BioEdit v5.0.9 (Hall, 1999) et la séquence complète ou partielle du fragment a été reconstituée. Une recherche sur BLAST (blastn, non redondant) [181] avec la séquence complète, par l'intermédiaire de GenBank [182], a permis d'identifier la souche étudiée en comparant avec les souches les plus proches.

4.8. Cinétique d'élimination et de biodégradation des AHS durant l'incubation

La cinétique d'élimination des AHS a été réalisée en utilisant la souche performante d'où l'objectif principal de cette expérience était de tester l'utilisation de ces macromolécules en tant que sources de carbone et d'azote pour la croissance de cette souche. Les conditions de culture ont été préparées comme déjà décrit précédemment au niveau de la *section 1.4*.

La cinétique d'élimination des AHS a été effectuée à des intervalles de 7 jours à partir de zéro heure au 28^{ème} jour. L'erreur moyenne a été calculée à l'aide de l'Excel (Microsoft Office Excel 2003, Etats-Unis).

Le changement dans la structure (dégradation) des molécules d'AHS pendant l'incubation a été suivi par FTIR en comparant avec un milieu témoin sans souche. Après décoloration complète (28 jours d'incubation à 30 °C) le bouillon de culture a été centrifugé (5000 rpm pendant 15 min). Les spectres FTIR ont été enregistrés à partir de pastilles de KBr avec un spectrophotomètre SHIMADZU FTIR 9800 dont la mesure est entre 4000 à 400 cm⁻¹ à une vitesse de 16 nm s⁻¹.

Les produits générés après dégradation ont été détectés par HPLC. Les cultures contenant les AHS ont été préparés comme auparavant dans des conditions d'agitation (28 jours d'incubation à 30 °C). L'appareil HPLC est équipée d'un détecteur UV-Visible à 254 nm (type Shimadzu UV-VIS DETECTEUR). Les analyses chromatographiques ont été effectuées en utilisant une colonne C18 125 x 4,6 mm RP avec une phase mobile isocratique d'acétonitrile: eau déminéralisée 0.3:0.7 (v / v) à un débit de 0,6 ml min⁻¹. Le spectre obtenu représente Abs = f (τ) avec : Abs = Absorbance, nombre d'onde = 1/λ exprimé en cm⁻¹. Le logiciel Bio-Red IR Search MasrchMaster a été utilisé pour le traitement des spectres obtenus.

4.9. Procédure de purification des peroxydases produites par la souche sélectionnée

4.9.1. Extraction de peroxydase

Les biomasse issue du milieu de culture LB (en L⁻¹: peptone :10g ; extrait de levure : 5g ; NaCl : 5g ; pH=7,4) de la souche sélectionnée après 5 jours d'incubation est éliminée par centrifugation (11000 rpm pendant 30 min et à 4 °C). Le surnageant récupéré, contenant l'activité peroxydase est clarifié par filtration à travers une membrane de 0,45 µm et gardé en vue de la purification selon la procédure convenable.

4.9.1.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium

La précipitation fractionnée des protéines de l'extrait brut a été réalisée de la manière suivante : On ajoute au surnageant contenant l'activité peroxydase en faible quantité sous une agitation douce et à froid, du sulfate d'ammonium solide jusqu'à 40% de saturation (242 g/L). On laisse sous agitation pendant 2 h puis on centrifuge (14000 rpm pendant 25 min), le surnageant recueilli est additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'à 60% de saturation (136 g/L). Après 2 h d'agitation, on centrifuge (14000 rpm pendant 25 min), le culot est repris immédiatement dans 15 mL du tampon Triton X-100 (tampon A) contenant 50 Mm de NaCl (tampon B) puis on centrifuge (14000 rpm pendant 25 min). Le surnageant obtenu est dialysé à + 4 °C contre les mêmes tampons pendant une nuit.

4.9.1.3. Filtration sur gel Sephacryl S-200

Nous avons utilisé une colonne «Sephacryl S-200» (Showa Denko K.K., Tokyo, Japon), ayant un diamètre de 2,5 cm et une longueur de 150 cm, préparée selon les indications du fabricant (colonne analytique, commercialisée par Bio-Rad, France), montées sur un système de chromatographie HPLC (Knauer, Allemagne, piloté par le logiciel propriétaire : Eurochrom[®] for Windows Basic Edition V3.05).

Le gel utilisé dans notre cas est le Sephacryl S-200 superfine prégonflé dans l'eau distillée. La colonne est équilibrée par le tampon B (NaCl 50 Mm). L'échantillon concentré au sulfate d'ammonium (40–60% v/v) est déposé sur cette colonne par la suite les protéines sont éluées avec le même tampon à un débit de 30 mL/h par fractions de 5 mL. L'absorbance à 280 nm est mesurée et l'activité peroxydase est estimée dans les fractions collectées.

4.9.1.4. Chromatographie échangeuse d'anions Q-Sepharose

La purification sur Sephacryl S-200 a donné deux pics d'activité peroxydase désignés par pic 1 pour HaP1 et pic 2 pour HaP2.

Les deux échantillons de la colonne Sephacryl S-200 sont appliqués séparément à la colonne Q-Sepharose équilibrée par le tampon A (Triton X-100) pour les fractions actives du pic 1, et par 50 mM du phosphate de potassium à pH 6 (tampon C) pour les fractions actives du pic 2. La colonne est lavée intensivement avec les mêmes tampons jusqu'à ce que la densité optique de l'effluent (à 280 nm) devienne nulle. Les protéines fixées sont éluées avec un gradient NaCl (0-0,5 M) dans le tampon d'équilibre. Les protéines sont éluées avec un débit de 72 mL/h par fractions de 5 mL. L'absorbance à 280 nm et l'activité peroxydase sont mesurées dans les fractions récupérées.

Les activités peroxydase du pic 1 sont détectées dans les fractions adsorbées par la colonne Q-Sépharose. Les fractions contenant l'activité peroxydase du pic 1 sont combinées et ensuite appliquées à une agitation par le modèle cellulaire Amicon ultrafiltration 8400 en utilisant une membrane de 10 KD (AmiconM10). Cependant, l'activité peroxydase du pic 2 est représentée par un seul pic correspondant à des fractions non adsorbées.

L'éluat non adsorbé contenant l'activité peroxydase est concentré par ultrafiltration où le concentré est ensuite appliqué à une seconde Sephacryl S-200. Les fractions contenant les activités peroxydase du pic 2 sont regroupées et analysées pour la détermination de l'activité peroxydase ainsi que la concentration des protéines.

4.9.2. Dosage de l'activité peroxydase

L'activité peroxydase est mesurée au spectrophotomètre en milieu tamponné. Le dosage de l'activité peroxydase d'une quantité appropriée de solution enzymatique contenue dans l'extrait enzymatique (surnageant de culture) ou dans l'enzyme pure, se fait dans des cuves de 1 mL, par la mesure de l'augmentation de la densité optique (DO) du milieu réactionnel (volume final 1 mL), à une longueur d'onde de 510 nm à température appropriée à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu). L'activité peroxydase est déterminée par le suivi de l'oxydation d'une solution de 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) selon le protocole suivant [183] :

- ✓ Mélanger 200 µL d'une solution de 2,4-DCP (25 mM) dans un tampon désiré (exemple le tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,2) en présence de 200 µL d'une solution 4-aminoantipyrine (20 mM) et de 200 µL d'une solution d'eau oxygéné (H₂O₂) fraîchement préparé (0,5 mM) avec 200 µL de la solution enzymatique préalablement diluée ;
- ✓ Compléter le milieu réactionnel par ajout de 200 µL de H₂O ;
- ✓ Le temps de mesure de la réaction enzymatique est généralement égal à une minute, et le déroulement de la réaction est enregistré en continu, à température appropriée (exemple : température ambiante 25 °C).

L'activité enzymatique est exprimée en unité internationale (UI). Une unité (1 U) d'activité peroxydase est définie comme étant la quantité d'enzyme qui fait varier la densité optique d'une unité par minute et l'activité spécifique est définie comme étant l'unité d'activité enzymatique par mg de protéine (U / mg).

Pendant la procédure de purification des protéines, l'activité peroxydase est confirmée avec le substrat ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline-(6)-sulphonic acid] en utilisant la procédure de dosage décrite par Putter et Becker [184].

- L'activité LiP : (Lignine peroxydase) est déterminée en mesurant l'oxydation de 3,4-diméthoxy alcool (vératryl alcool 96%) en veratryl aldehyde selon la méthode de Tien et Kirk [185]. 500 µL de la solution enzymatique diluée est mélangé avec 400 µL de la solution tampon d'acide citrique de tartrate de sodium (100 mM) à pH 2,5 et 50 µL d'alcool vératryl (40 mM). La réaction enzymatique est initiée par l'addition de 50 µL de H₂O₂ et quantifiée à 310 nm dans un spectrophotomètre UV-vis pendant 1 min à 25 °C en utilisant une cuvette en quartz.

- L'activité MnP : La peroxydase à Mn possède la capacité d'oxyder la vanillylacétone en présence de H₂O₂ selon la méthode de Paszczyński *et al.* [186] [186]. Cette réaction sert de base à la définition de l'activité enzymatique de la MnP puisque, par définition, 1 unité d'activité (U) peut oxyder 1 µmol de vanillylacétone par minute à une température de 30 °C. Lors d'un dosage enzymatique de la MnP, le substrat (vanillylacétone) est mis en présence de l'échantillon à analyser et de MnSO₄. La réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout de H₂O₂. Le taux initial de disparition du substrat est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 334 nm.

4.9.3. Méthodes analytiques des peroxydases

4.9.3.1. Dosage des protéines peroxydasiques par la méthode de Bradford

Les protéines peroxydasiques ont été dosées par la méthode de Bradford [187]. Nous avons utilisé le kit « Bio-Rad Protein Assay » (Bio-Rad, France), en mélangeant à chaque fois 200 µL de bleu de Coomassie G250 à 800 µL d'une solution diluée de la protéine. La densité optique est mesurée à 595 nm contre un blanc sans extrait enzymatique.

Afin d'obtenir des résultats fiables, la densité optique des échantillons étudiés doit être comprise entre 0,2 et 0,7. Cette méthode nécessite aussi une courbe de référence (étalon) établie en utilisant le Sérum Albumine Bovine comme protéine standard, ce qui nous permet d'estimer la quantité des protéines en µg/mL.

4.9.3.2. Séparation des peroxydases sur gel d'acrylamide

La pureté de l'enzyme est estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE (10 à 15%). Cette analyse des préparations enzymatiques par électrophorèse dans des conditions dénaturantes est réalisée selon la technique de Laemmli [188] .

- Coloration au bleu de Coomassie : Cette méthode colore les protéines de façon à peu près indépendante de la séquence. Après migration électrophorétique, le gel est plongé dans une solution de coloration (3 g de bleu de Coomassie dans 100 mL d'acide acétique, 400 mL d'éthanol et H₂O q.s.p. 1 litre), le gel est ensuite transféré dans une solution de décoloration (acide acétique 100 mL, éthanol 350 mL et H₂O q.s.p. 1 litre). Le gel est stocké dans de l'eau avec 20% d'éthanol, ce qui achève la décoloration et évite la contamination microbienne, puis séché ou photographié (scanné).

- Détection de l'activité peroxydase sur zymogramme : Après migration sur gel de polyacrylamide, incorporant un substrat de peroxydase, dans des conditions dénaturantes. Le gel lavé dans l'eau distillée pendant 1 h en présence de 2,5% Triton X-100 afin de remplacer le SDS puis incubé pendant 3 h à 40 °C en présence du tampon A.

Une zone claire est visualisée, sur le gel traité, après fixation pendant 1 h du TCA 20% (p/v), coloration au bleu de Coomassie G-250 et décoloration par l'eau distillée/méthanol/ acide acétique.

4.9.3.3. Détermination des acides aminés des extrémités N-terminales par la méthode automatisée d'Edman

Les séquences N-terminales des différentes protéines purifiées ont été déterminées par la méthode automatisée d'Edman sur microséquenseur de protéines [189] [190]. Elle comporte les trois étapes classiques de séquençage, à savoir : le couplage, le clivage et la conversion (Annexe 6). Pour la comparaison, les séquences des acides aminés ont été obtenues par l'utilisation de la base de données du programme BLASTP (NCBI, NIH, USA).

4.9.3.4. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique et de caractériser leur structure chimique, en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Elle comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z et les comptent.

La spectrométrie de masse permet non seulement de déterminer la masse des produits étudiés, en mélange ou purifiés, mais également de contrôler les modifications post-traductionnelles des molécules et de donner leur élément de structure extrêmement sensible. Dans le cas particulier des peptides, cette méthodologie permet dans certaines conditions d'obtenir des éléments de la séquence en acide aminés.

Il existe deux méthodologies complémentaires en spectrométrie de masse pour l'étude des molécules biologiques : l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) couplée à un analyseur de masse de type temps de vol (TOF), très efficace pour l'étude directe d'un mélange de produits, et l'ionisation par électronebulisation (ESI) couplée à des analyseurs de masse de type quadripolaire et temps de vol (Qq-TOF). Cette technique permet l'interfaçage entre la séparation chromatographique en phase liquide et le spectromètre de masse.

La faible taille des protéines considérées dans cette étude nous permet de fournir nos échantillons sous 2 formes :

1. en solution, ce qui permet de mesurer la masse totale de nos protéines,
2. sur gel d'acrylamide, après migration, ce qui permet de fournir une protéine pure avec moins de molécules parasitant le signal de spectrométrie (Tris notamment). Cette forme nécessite une digestion préalable à la trypsine, permettant de traiter des fragments de plus petite taille.

Cette technique nécessite d'avoir un tampon pauvre en ion Cl et des concentrations de l'ordre de 5 pmol/ μ L. En solution ou emprisonnée dans un gel d'électrophorèse, la protéine est diluée dans un tampon acétate d'ammonium et clivée enzymatiquement (par la trypsine) puis l'hydrolysate final est déposé sur la plaque du MALDI-TOF et mélangé à une solution d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique. Les différentes étapes peuvent être énumérées comme suit :

1. Après coloration au bleu de comassie G-250, les bandes protéiques d'intérêt sont découpées du gel.
2. Laver les bandes avec un mélange d'acétonitrile/hydrogencarbonate d'ammonium (50 mM) (v/v).
3. Digérer avec la trypsine pendant 16 h à 37 °C.
4. Arrêter la digestion par addition de 2 μ L acide trifluoro-acétique (TFA).
5. Le produit de la digestion est par la suite analysé grâce à une matrice d'acide cyano-4-hydroxycinnamique (5 mg/mL) préparée dans 50% acétonitrile contenant 0,1% TFA.

La taille des fragments protéiques sera ainsi déterminée par rapport à un étalon interne en utilisant le spectromètre de masse (Voyager DE STR MALDI-TOF/Mass spectrometer, Applied Biosystems). Les valeurs expérimentales seront par la suite comparées avec celles contenues dans les banques de données pour identifier la protéine.

4.10. Caractérisation physicochimique des peroxydases

4.10.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité des peroxydases

L'effet du pH est déterminé en utilisant le 2,4-DCP comme substrat. Les activités peroxydase sont testées sur une gamme de pH de 3 à 13 à 40 °C. Les enzymes sont pré-incubées dans des tampons à différentes valeurs de pH variant de 2 à 11 pendant 24 h à 40 °C. Les aliquotes sont retirées et ensuite les activités enzymatiques résiduelles sont déterminées dans des conditions d'essai standards. Tous les tampons sont utilisés à des concentrations de 50 mM et en présence de 5 mM MnSO_4 [191].

- Le tampon: glycine-HCl pour les pH 2 à 3 ; le tampon citrate pour les pH 3 à 5 ; le tampon MES ou Tris-HCl pour les pH 5 à 6 ; le tampon phosphate de potassium pour les pH 6 à 8 ; le tampon glycine-NaOH pour les pH 9 à 10, et le tampon bicarbonate de NaOH pour les pH 10 à 11.

4.10.2. Température optimale et stabilité thermique des peroxydases

Les effets de la température sur les activités des peroxydases ont été étudiés dans un domaine de température allant de 20 à 70 °C en utilisant le 2,4-DCP comme substrat durant 15min dans le tampon A (Triton X-100).

La thermostabilité des peroxydases purifiées est examinée en incubant les enzymes pendant 10 h à différentes températures, en l'absence ou en présence de 5 mM MnSO₄. Des aliquotes sont prélevés à des intervalles de temps désirés pour tester l'activité restante dans les conditions standards. Les enzymes non chauffées sont considérées comme témoin (100%) [191].

4.10.3. Effet des inhibiteurs et des ions de métaux lourds

L'effet des inhibiteurs des protéines à hème est étudié en utilisant le cyanure de potassium et l'azide de sodium. Les activités peroxydases résiduelles sont mesurées après une préincubation des enzymes purifiées avec chaque inhibiteur à 25 °C durant 30 min en présence de différents ions métalliques (5 mM) pendant 1 h à 40 °C. Les effets des différents ions métalliques à des concentrations allant de 5 à 50 mM sur les activités enzymatiques ont été également étudiées en ajoutant au mélange réactionnel les divalents (Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺ et Hg²⁺) et les monovalents (Li⁺ et K⁺) des ions métalliques [191].

L'activité est exprimée comme étant le pourcentage du niveau d'activité en absence des inhibiteurs ou d'ions métalliques. Les activités peroxydases mesurées en absence d'un inhibiteur ou des ions métalliques (en présence de 1 mM d'EGTA) sont prises comme témoin (100%). Les activités résiduelles sont mesurées en utilisant le substrat 2,4 - DCP.

4.10.4. Spécificité du substrat

Les différents substrats utilisés sont : AHC, guiacol, 2,4-DCP, L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA), 4-chlorophénol, 2,6-dichlorophénol, 2,4,5-trichlorophénol, 2,4,6-trichlorophénol et le pentachlorophénol.

Concernant le L-DOPA, le mélange réactionnel (1 mL) se compose de 0,25 mL de chacun des éléments suivants : 20 mM de L-DOPA, 100 mM du tampon phosphate de potassium (pH 7,2), 0,5 mM de H₂O₂ et le surnageant de culture. La réaction est initiée par l'ajout de H₂O₂ et la formation du pigment dopachrome à partir de la L-DOPA est surveillée pendant une minute à 470 nm à 53 °C.

L'activité des peroxydases purifiées est déterminée en utilisant de différents substrats qui sont testés dans les mêmes conditions décrites pour le dosage du 2,4-DCP, et à différentes concentrations comme suit : 25 mM pour 2,4-DCP et 2,6-dichlorophénol, 15 mM pour 4-chlorophénol, 2,4,5-trichlorophénol et 2,4,6-trichlorophénol et 10 mM pour le pentachlorophénol.

4.10.5. Effets de [H₂O₂] et des paramètres cinétiques sur la stabilité des peroxydases

L'effet de [H₂O₂] sur l'activité catalytique de l'enzyme purifiée est étudié en faisant varier la [H₂O₂] dans le mélange d'essais de l'activité. Le taux de génération de couleur est contrôlé sur une longueur d'onde de 510 nm et converti en une activité apparente. Ce fut ensuite exprimé comme une activité relative, par rapport à celle mesurée dans les conditions de dosage standard décrite ci-dessus. Tous les tests ont été effectués au moins deux fois. L'estimation de plusieurs paramètres cinétiques est réalisée en utilisant un modèle développé par Nicell et Wright [192] à différentes concentrations de H₂O₂ (10 µM à 2 mM) et de chaque enzyme (de 0,015 à 0,15 U/mL).

L'outil solveur de Microsoft Excel et les fonctions de régression de Sigma Plot 2000 (SPSS Inc, Chicago, IL) sont utilisés pour ajuster les données et la méthode des moindres carrés qui est utilisée pour estimer les coefficients d'une régression non linéaire. La signification des résultats de la régression et les coefficients estimés sont déterminés en utilisant l'analyse de variance et des statistiques (P <0,05).

4.10.6. Analyse par les méthodes spectrales

Les spectres d'absorption des enzymes purifiées sont enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer 3100 spectrophotomètre à température ambiante. Dans les expériences de réduction, les solutions sont faites par voie anaérobie par rinçage de la cuvette avec de l'argon.

La réduction de l'enzyme est réalisée par le dithionite de sodium ou par le H₂O₂. Le contenu proto-hème est déterminé par le procédé pyridine ferro-hemochrome tel qu'il est décrit par Yumoto *et al.*, [193], et le contenu hème est calculé sur la base du coefficient d'extinction (34,5 mM⁻¹ × cm⁻¹) de pyridine hemochrome b [194].

4.10.7. Sulfoxydation catalytique de peroxydases

L'énantiosélectivité de peroxydases dans la sulfoxydation est déterminée comme suit : Les réactions ont été effectuées dans des tubes en pyrex, à un volume total de 1 mL. Le mélange réactionnel généralement contient 50 mM de tampon citrate à pH 3, 0,5 mM de H₂O₂, 2,5 mM du substrat et 15 μM de chaque enzyme. Les réactions sont incubées pendant 30 h à 30 °C sous agitation à 200 rpm.

Afin de déterminer si nos enzymes sont également capables de catalyser ce type de réactions énantiosélectives, la sulfoxydation de sulfures aromatiques a été testée suivant l'analyse des produits sur une colonne chirale GC. Tous les sulfures ont été testés énantiosélectivement convertis en R-sulfoxydes correspondants [191] [195] [196].

CHAPITRE : 5 : RESULTATS ET DISCUSSION

5.1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES A FORT POTENTIEL DEGRADATIF DES ACIDES HUMIQUES

La première étape de cette partie de l'étude est réservée à l'extraction et à la caractérisation des AHs utilisés comme source unique de carbone et d'azote pour la croissance microbienne. La caractérisation des AHs nous permet d'assurer l'exactitude de la technique employée lors de l'extraction de ces macromolécules à partir d'un échantillon d'un sol de surface de la plaine de la Mitidja. La deuxième étape est totalement consacrée à l'isolement et l'identification de La souche sélectionnée.

5.1.1. Caractérisations des acides humiques

5.1.1.1 Par spectroscopie UV-visible et Rapport E_{465}/E_{665}

Les deux spectres UV-visibles obtenus correspondent à l'échantillon d'AH extrait du sol de Meftah (AHS) et l'AH commercial (AHC). Ils sont respectivement représentés dans les figures 19 et 20. Les rapports E_{465}/E_{665} sont aussi calculés et donnés dans le tableau 5.

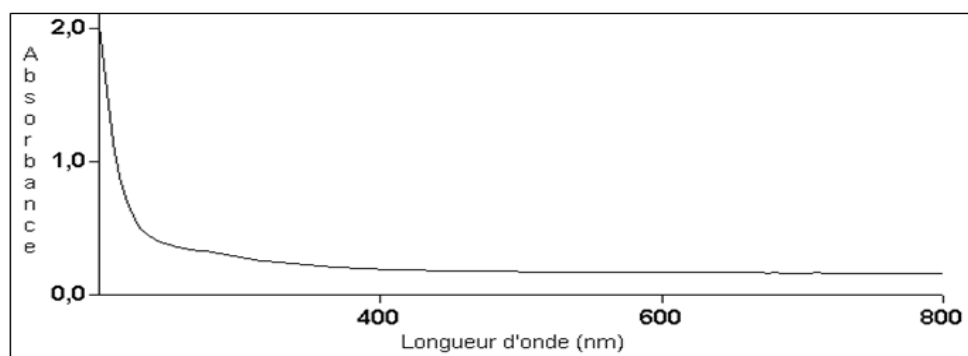


Figure 19 : Spectre UV-Visible de l'AHs

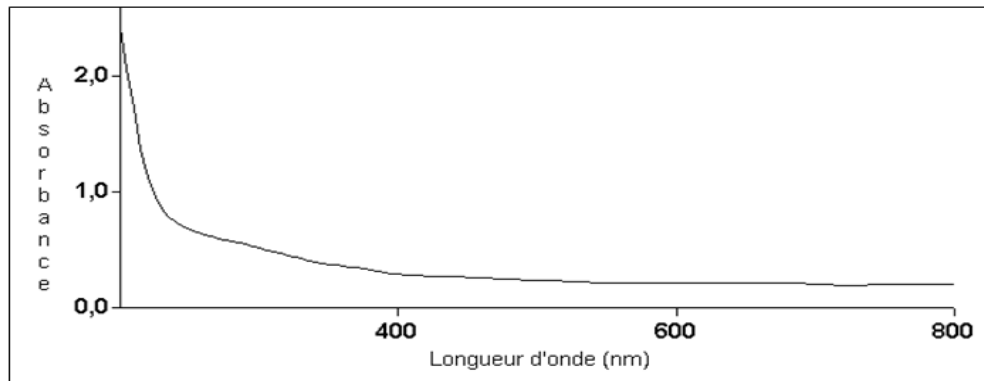


Figure 20 : Spectre UV-visible de l'AHC.

Tableau 5 : Rapports E_{465}/E_{665} calculés pour les deux AHs analysés : AHS et AHC.

| α | $E_{465\alpha}$ | $E_{665\alpha}$ | $E_{465}/E_{665\alpha}$ |
|--------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| AHS α | 0,266 | 0,092 | 2,89 |
| AHC α | 1,1 | 0,285 | 3,86 |

Les spectres représentés sur les figures 22 et 23 sont en accord avec la description de Swift [194]. L'allure de ces spectres est expliquée par le fait que ceux-ci correspondent à la somme de nombreux chromophores. D'autres auteurs ont basé sur le rapport E_{465}/E_{665} , comme étant un indice d'humification inférieur à 5, qu'il était assigné aux AHs [18] [23] [197].

La gamme d'absorbance des spectres représentée ci-dessus est entre 200 et 800 nm. Cette analyse montre une diminution monotone d'absorption avec des longueurs d'onde croissantes, ce qui a été prouvé par [199] [200]. En effet, des constatations ont été faites :

- Entre 200 et 400 nm, la formation d'un palier, ce qui explique la présence des chromophores aromatiques, et de doubles liaisons conjuguées de C=C [194] [200].
- Entre 400 et 800 nm correspond à la région du visible due à la couleur des AHs [201].

Les valeurs (E_{465}/E_{665}) calculées, inférieur à 5 signifient un PM élevé correspond aux AHS extraits à partir du sol de Meftah. Ce rapport est largement employé pour caractériser les SHs [41] [202].

Cependant, de nombreux paramètres agissent sur la valeur de ce rapport et rendent son interprétation difficile :

Le rapport E_{465}/E_{665} varie selon le type d'extrait humique mais il est indépendant de la concentration en matières humiques [194]. Notons cependant que la mesure de l'absorbance à 465 et 665 nm est impossible pour des concentrations trop élevées d'AHs.

Le rapport E_{465}/E_{665} varie inversement au PM des particules. Or les particules de PM élevé (AHs) présentent un rapport faible (<5), celles de PM faible (AF) présentent un rapport élevé ($5 < E_{465}/E_{665} < 10$) [41].

- Les teneurs en carbone et en oxygène sont aussi corrélées avec le rapport E_{465}/E_{665} . Ainsi, un faible rapport est associé à une forte teneur en carbone et une faible teneur en oxygène ce qui caractérise notre échantillon d'AH. Nos résultats sont en accord avec ceux signalés dans plusieurs travaux [41] [43] [194].

5.1.1.2. Par spectroscopie infrarouge

Les spectres IR enregistrés pour les AHS et AHC sont respectivement représentés dans les figures 21 et 22. Ainsi que les bandes d'absorption (en cm^{-1}) et vibrateurs associés de l'acide humique étudié sont regroupés dans le Tableau 6.

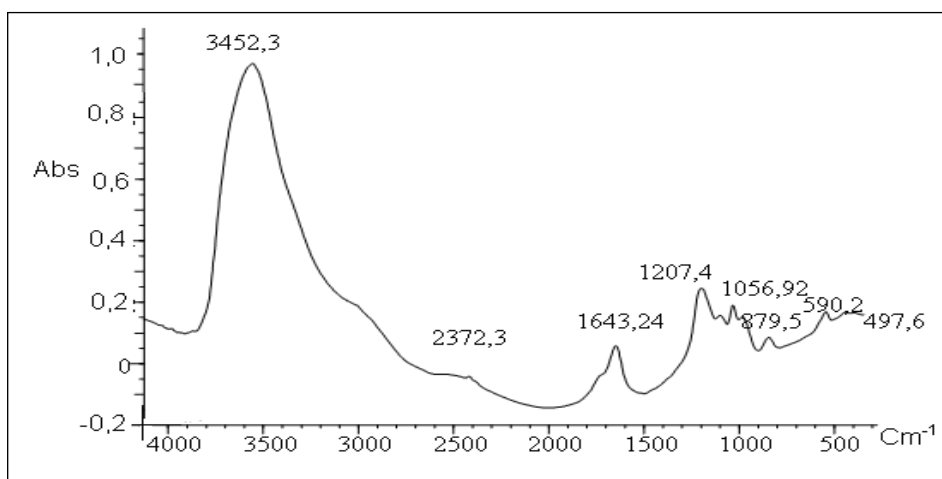


Figure 21 : Spectre infrarouge de l'AHS extrait du sol de Meftah.

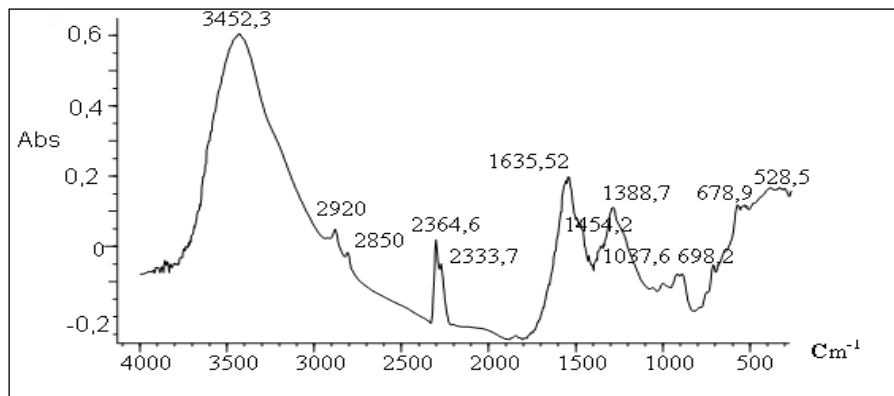


Figure 22 : Spectre infrarouge de l'AHC.

Ces spectres montrent les différentes bandes d'absorption et vibrateurs associés de notre échantillon. L'attribution des bandes a été effectuée en fonction du caractère aromatique, carboxylique, phénolique, etc. Ces groupements fonctionnels caractérisent les AHs selon plusieurs travaux [41] [43] [45] [203].

Entre 3460 et 3300 cm^{-1} , on peut observer une bande large de OH phénolique, groupes alcools et acide organique avec des NH, NH_2 et OH en se basant sur les comparaisons faites par rapport à la bibliographie [203] [204].

Entre 2950 et 2850 cm^{-1} , le spectre des AHs montrent des bandes de vibration caractéristiques des CH, CH_2 et CH_3 [41] [194] [203] [205].

La bande d'intensité observée entre 2360 et 2300 cm^{-1} sur le spectre d'AHS est probablement due aux dérivés azotés dans cette région.

Entre 2273 cm^{-1} et 2000 cm^{-1} , les spectres montrent la présence des bandes de vibration caractéristique de $\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}=\text{N}$, $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ et $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ [206] [207].

Entre 1650 à 1600 cm^{-1} , on peut observer la présence d'une bande aromatique de $\text{C}=\text{C}$ avec une vibration de valence $\text{C}=\text{O}$ quinonique et cétone dans les deux spectres d'AHS et AHC [41] [203] [205].

A 1519,8 cm^{-1} , cette vibration montre la présence d'une $\text{C}=\text{C}$ du noyau aromatique [208] et la déformation des CH des groupements méthoxyles, et celui des COO^- et $\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R}$ [206] [207]. La gamme de 1456 à 1380 cm^{-1} est caractérisée par la présence des groupements importants de CH, CH_2 , CH_3 dans l'AH commercial [207].

Dans le domaine de 1300 à 1000 cm^{-1} , on peut observer des C-O et/ou déformation OH de COOH, des bandes de déformation dans le plan de H aromatique. Sur nos spectres, ces bandes sont fortes pour l'AHC que l'AHS.

La bande de vibration 879,5 cm^{-1} incluse dans la gamme 900 à 860 cm^{-1} correspond à la vibration de déformation C-H aromatique hors du plan pour l'AHS [207] [209].

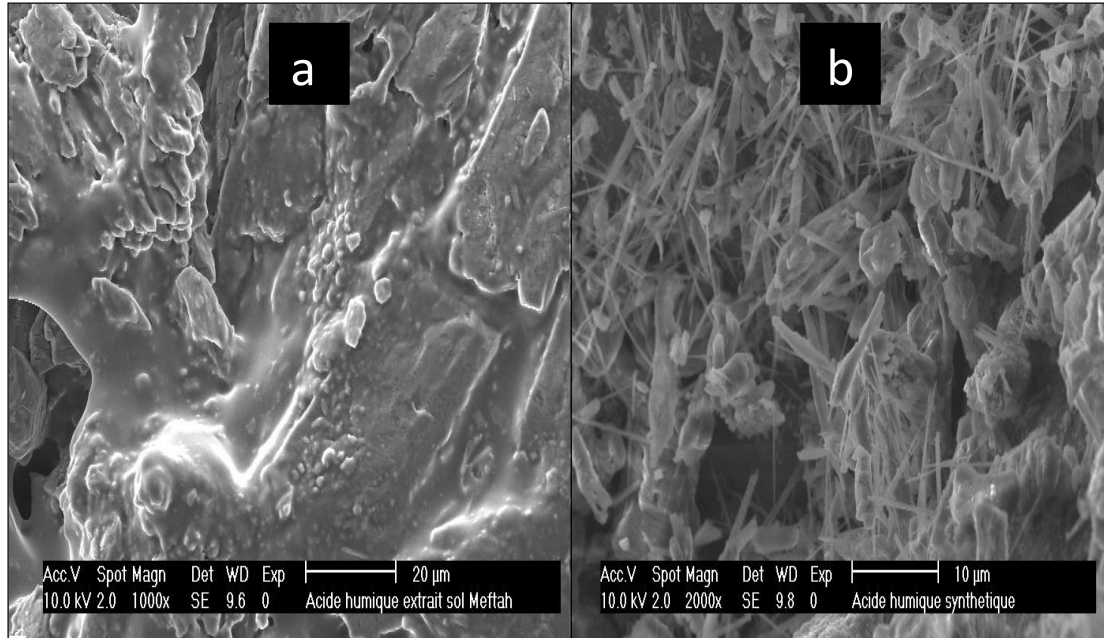
Les bandes de déformation de OH phénolique en dehors du plans (de la molécule), sont observées dans la région $685 \pm 115 \text{ cm}^{-1}$, mais les phénols renfermant également des groupements carbonyle, qui laissent apparaître des bandes d'absorption vers $750 \pm 50 \text{ cm}^{-1}$; [41] [194] [207].

Tableau 6: Bandes d'absorption (en cm^{-1}) et vibrateurs associés des acides humiques étudiés. (AV : Absence de Vibrateur).

| AHC | AHS | Groupements fonctionnels |
|-------------------------|----------------------|--|
| 3452,3 | 3452,3 | OH phénol et NH des amines et amides. |
| 2923,9 - 2854,5 | AV | CH aliphatiques. |
| 2364,5 - 2349,1 | 2372,3 | $\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}=\text{N}$, $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ et $\text{N}=\text{C}=\text{S}$. |
| AV | AV | CH alcène avec noyau aromatique et $\text{C}=\text{O}$ de carboxyle, cétone et aldéhyde. |
| 1635,5 | 1643,5 | $\text{C}=\text{O}$ de cétone et $\text{C}=\text{C}$ aromatique. |
| 1454,2 1388,7 | AV AV | Étirements $\text{C}=\text{C}$ et $\text{C}=\text{O}$ du noyau aromatique. Déformation OH des groupements méthoxyles, COO^- et $\text{C}-\text{O}-\text{R}$. |
| 1037,6 | 1207,4 1056,9 | Étirements C-O et/ou déformation OH de COOH avec H aromatique. |
| AV | 879,5 | C-H aromatique. |
| 698,2 678,9 528,5 | 590,2 497,6 AV | OH phénolique. |

5.1.1.3. Par microscope Electronique à Balayage

L'observation des AHS et des AHC par MEB a permis d'avoir une idée sur leur structure tridimensionnelle (3D) (figure 23).



**Figure 23 : Morphologie des AHS extraits du sol de Meftah
(a) (G X 1000) et des AHC (b) (G X 2000).**

La figure 23(a) présente une structure très condensée de nature globulaire. En effet, l'existence de liens spécifiques inter et intra moléculaires dans l'AHS peut expliquer la formation d'agrégats telles que les liaisons S-S entre deux résidus cystéine. Inversement, l'absence de ces constituants dans l'AHC conduit à une structure plus fragmentée de nature fibreuse (figure 23 b).

Cependant la microscopie est une technique d'observation qui ne conclut pas exactement sur la structure de ces agrégations. Ces morphologies indiquent que les macromolécules extraites du sol sont caractérisées par la prédominance de la structure globulaire (aromatique) plutôt que la structure fibreuse (aliphatique) tel que expliqué par [210].

Une analyse globale, couplée à l'observation de l'échantillon par MEB, a permis d'obtenir le spectre des éléments majeurs présents à la surface de l'échantillon d'AH extrait du sol de Meftah et celui des AHC (figures 24 et 25). La technique employée a permis de calculer le % atomique approximatif de ces éléments majeurs (Tableau 7).

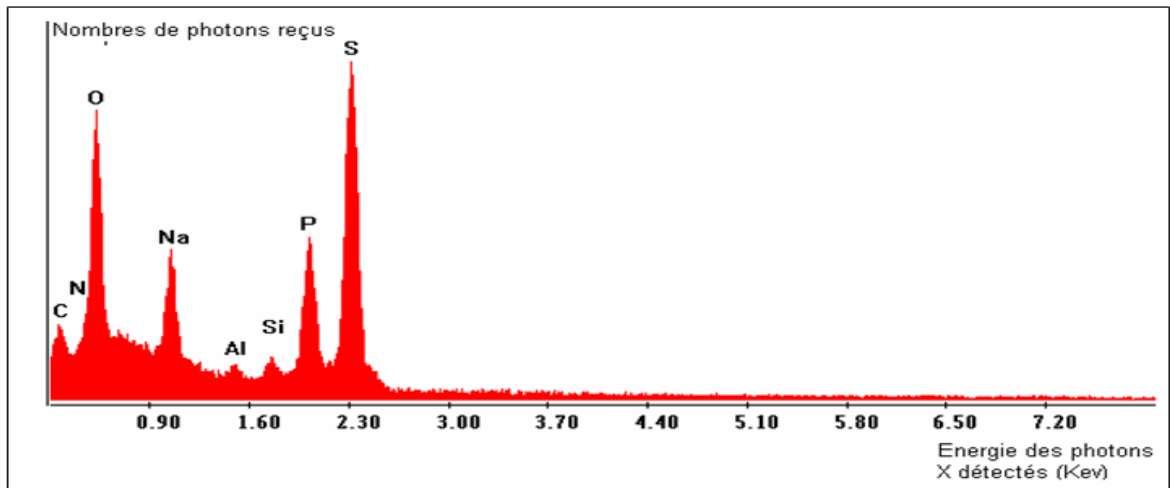


Figure 24 : Spectres d'éléments majeurs présents dans l'échantillon d'AHS.

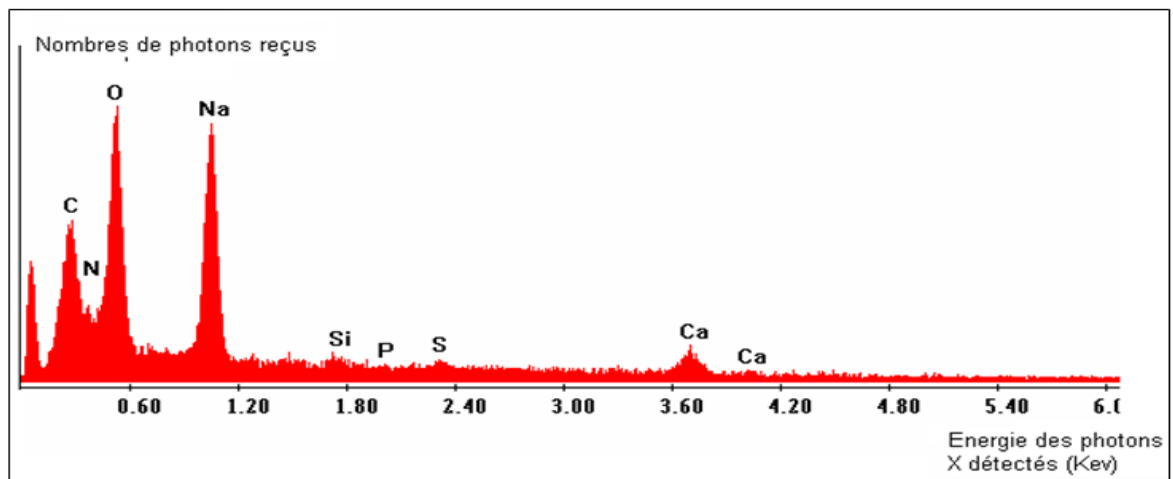


Figure 25 : Spectres d'éléments majeurs présents dans l'échantillon d'AHC.

Tableau 7 : Pourcentage atomique approximatif des éléments majeurs détectés à la surface des AHs analysés.

| Elément | AHS | AHC |
|----------------|-------|-------|
| Carbone(C) | 30,40 | 65,64 |
| Azote (N) | 5,73 | 24,18 |
| Oxygéné (O) | 43,99 | 2,13 |
| Sodium (Na) | 5,81 | 1,2 |
| Aluminium (Al) | 0,56 | 0,63 |
| Silicium (Si) | 0,73 | 5,7 |

Une nette différence en pourcentage atomique est enregistrée chez les deux types d'échantillons analysés (AHS et AHC) qui concerne les éléments majeurs détectés à la surface (C, N, O, Al, Si et Na). Cependant, nous remarquons la présence du phosphore et du soufre chez l'AHS, ceci est probablement dû au mode d'extraction appliqué en utilisant le pyrophosphate de sodium et l'acide sulfurique.

5.1.2. Isolement des souches de streptomycètes à fort potentiel dégradatif des AHs

Cinq souches, isolées sur le milieu sélectif solide (HA-Agar), ont été examinées sur milieu liquide contenant les AHs comme seules sources de carbone et d'azote afin de suivre la décoloration du milieu (à partir d'une couleur noire foncée jusqu'à un blanchissement total).

Les % de décoloration (mesurés à 350 nm) obtenus pour les cinq souches de streptomycètes incubées durant 21 jours en présence des AHS sont : la souche AM1 (31.50 ± 0.89), **AM2 ($41,20 \pm 1,45$)**, AM3 ($8,37 \pm 0,73$), AM4 ($2,34 \pm 0,22$) et la souche AM5 ($4,69 \pm 0,43$). En effet, la souche AM2 a été sélectionnée pour son potentiel de dégradation meilleure par rapport aux autres souches.

5.1.3. Identification phénotypique de la souche sélectionnée

5.1.3.1. Etude morphologique

La souche AM2 a été cultivée sur divers milieux ISP à 30 °C pendant une semaine jusqu'à la formation des colonies de 10 mm de diamètre. Une bonne croissance a été observée sur ISP2 et modérée sur les milieux ISP3 et ISP4. Elle développe un mycélium aérien (AM) de couleur grise et un mycélium du substrat (SM) brun et non fragmenté (figures 26 et 27).



Figure 26 : Mycélium aérien sur ISP2



Figure 27 : Mycélium du substrat sur ISP2

L'observation microscopique du mycélium aérien a permis de distinguer les chaînes de spores exogènes (flexibles ou en crochets) chez cette souche (figure 28).

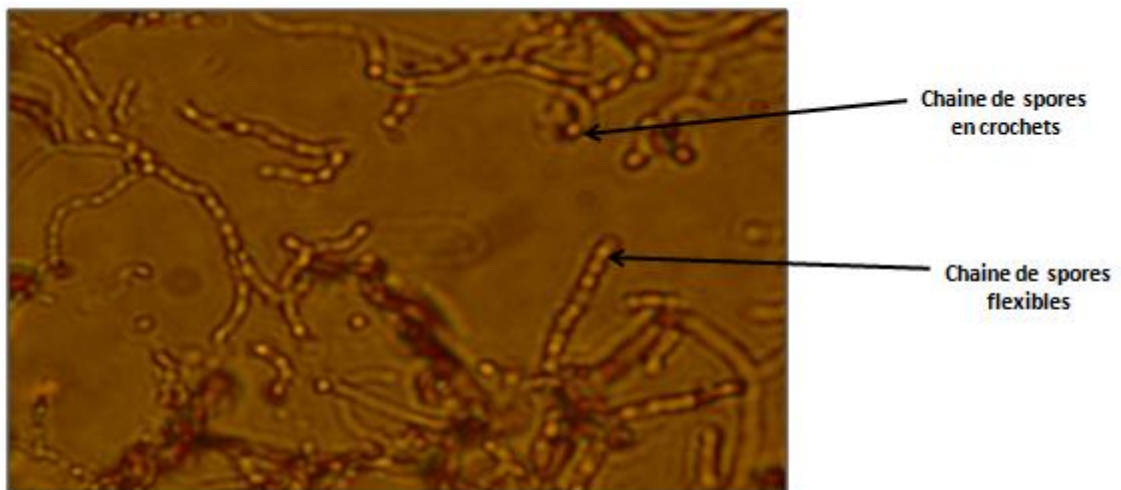


Figure 28 : Observation par microscope optique des spores exogènes sur le MA de la souche AM2 (G X 40).

5.1.3.2. Etude chimiotaxonomique

Les chromatogrammes CCM ont mis en évidence l'existence de l'isomère LL DAP et l'absence des sucres caractéristiques chez la souche AM2.

5.1.3.3. Etude physiologique et biochimique de la souche AM2

Les tests physiologiques et biochimiques en se basant sur les galeries API 50 CH et API ZYM ont permis de regrouper les caractéristiques suivantes :

Résultats de la galerie API 50 CH : Oxydase positive, aérobie, utilise le galactose, le saccharose, le maltose, le cellobiose, le fucose, le raffinose, le D-xylose, le L-arabinose, D-ribose et n'utilise pas le lactose, l'amidon, le L-rhamnose, l'érythritol, adonitol et l'inositol.

Résultats de la galerie API ZYM : activité positive pour la phosphatase alcaline, l'estérase lipase (C8), la leucine arylamidase et la valine arylamidase. Activité négative pour la lipase (C14), la trypsine, chymotrypsine, *N*-acetyl-glucosamidase, α -mannosidase et fucosidase.

L'ensemble des résultats morphologiques, chimiques, biochimiques et physiologiques ont permis de rattacher cette souche au genre *Streptomyces*.

5.1.4. Identification génotypique par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S

La taille du fragment d'ADN amplifié a été estimée à environ 1,5 kb (figure 29).

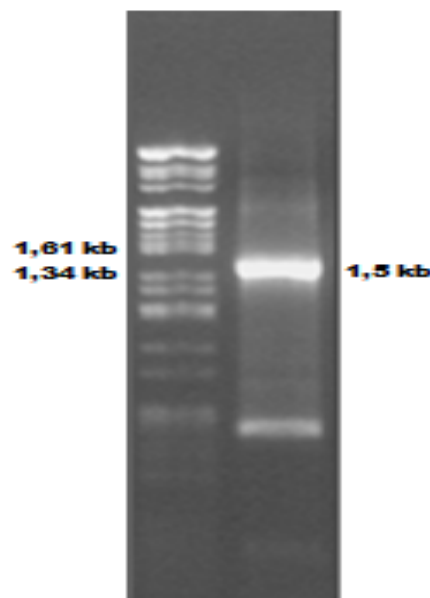


Figure 29 : Analyse du produit PCR (taille attendue) de l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S de la souche AM2

Ce fragment PCR a été purifié puis cloné dans un vecteur approprié, en l'occurrence le pGEM-T, pour générer le plasmide PAM2-16S de taille 4527 pb (Figure 30).

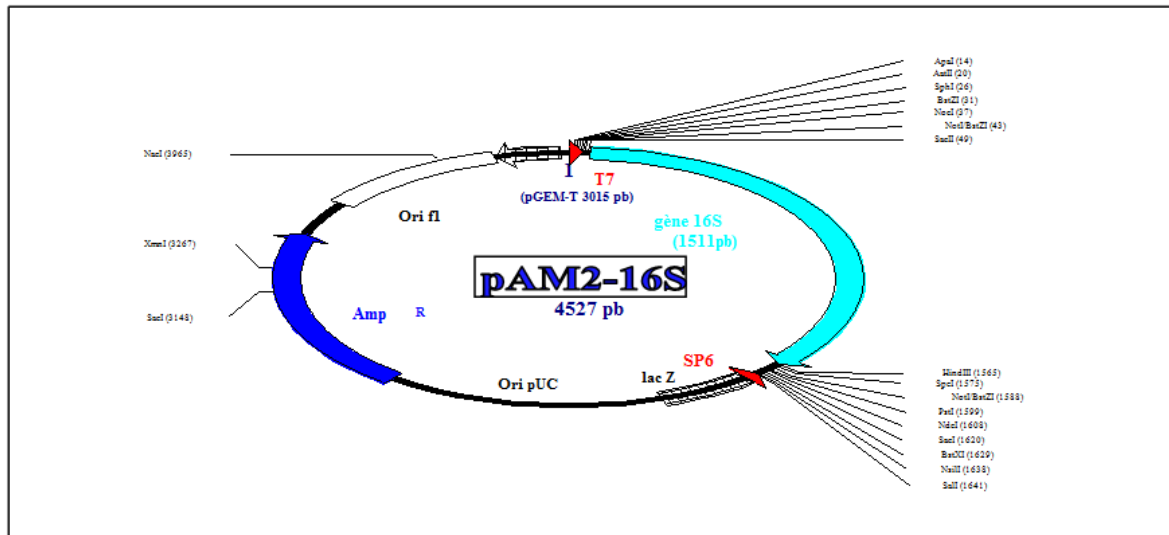


Figure 30 : Carte de restriction du plasmide pAM2-16S.

Par la suite, la séquence nucléotidique totale de ce fragment a été déterminée moyennant les techniques de séquençage automatique. La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche AM2 a été déposée dans la banque de données (« GenBank BLAST ») sous le numéro d'accèsion **GU434673**.

L'alignement de cette séquence est réalisé avec la banque de données GenBank BLAST. Cette analyse montre que la souche AM2 présente une identité très importante (98%) avec les gènes d'ARNr 16S des souches *Streptomyces* à savoir : La souche *NBRC 13193* (numéro d'accèsion : AB184326), la souche *MARS-17* (numéro d'accèsion CG451836) et la souche *SU22* (numéro d'accèsion : AB218615). Ces séquences ont été importées et alignées dans une version du logiciel MEGA 4.1. L'arbre phylogénétique a été ensuite construit (figure 31) et les résultats en outre ont confirmé que la souche AM2 (**GU434673**) est étroitement liée aux autres souches de *Streptomyces parvulus*.

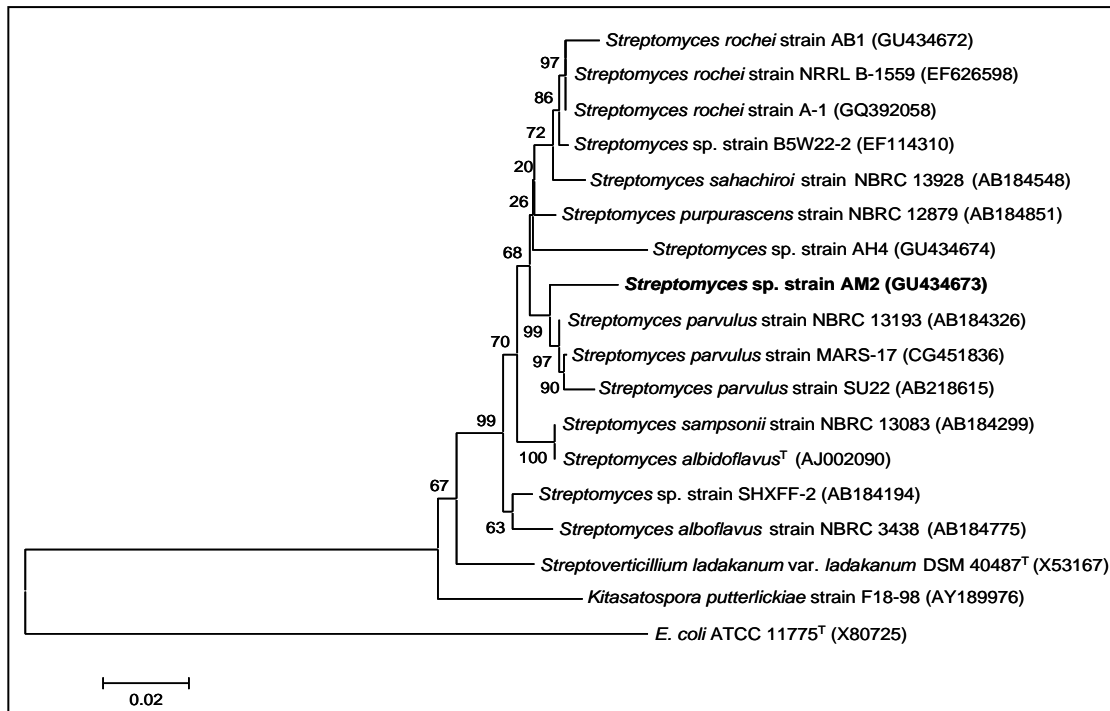


Figure 31 : Arbre phylogénétique obtenu après alignement du gène de l'ARNr 16S de la souche AM2 avec la banque de données GenBank BLAST.

5.1.5. Conclusion

Les techniques analytiques utilisées dans ce présent travail ont confirmé l'obtention des substances humiques de nature "AHs" en se basant sur l'observation par MEB, le rapport de WELT et la présence de différents groupements fonctionnels de AHS locaux.

L'identification phénotypique de la souche AM2 a permis son rattachement initial au genre *Streptomyces* et l'identification génotypique par la technique ARNr 16S a confirmé son affiliation à l'espèce *Streptomyces parvulus* (98%).

Cette souche apte à décolorer un milieu contenant les AHs comme seules sources de carbone et d'azote sera bien étudiée dans les deux parties qui suivent à savoir, la biodégradation des AHs, la purification et la caractérisation des enzymes responsables à cette dégradation.

5.2. BIODEGRADATION DES AHs PAR LA SOUCHE AM2

5.2.1. Cinétique de biodégradation des acides humiques extraits du sol

La décoloration du milieu de couleur sombre (concentration élevée des AHs) (figure 32) est considérée comme un indicateur de dégradation comme rapporté par [Grinhut et al. \(2007\)](#).

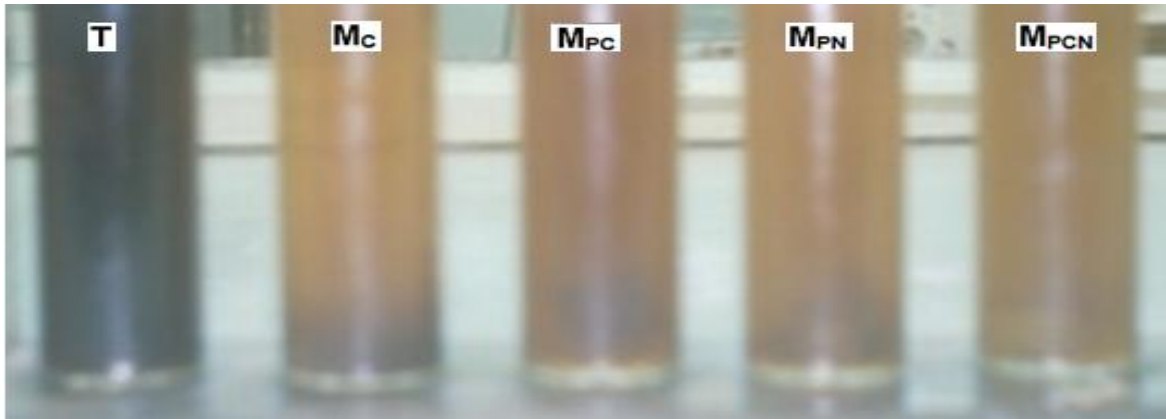


Figure 32 : Décoloration du milieu contenant les AHS par la souche AM2. T : témoin, M_C : milieu complet contenant suffisamment de C et N, M_{PC} : milieu pauvre en C, M_{PN} : milieu pauvre en N et M_{PCN} : milieu pauvre en C et N.

La décoloration maximale a été observée après 28 jours d'incubation et atteint un pourcentage de 66% (figure 33).

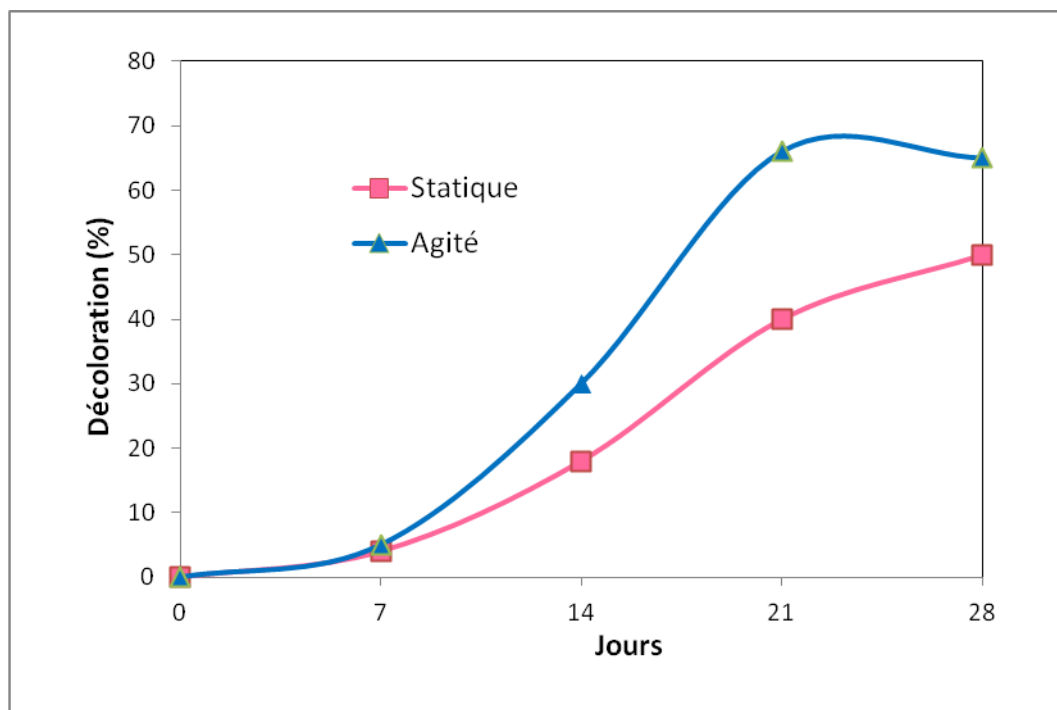


Figure 33 : Cinétique de décoloration des AHS par la souche AM2

En effet, la décoloration a commencé après une période de latence qui a duré approximativement 4 jours. L'élimination des AHS a commencé juste après l'ajout de traces de carbone et d'azote. Dans la culture agitée, la décoloration des AHS par AM2 était plus efficace que celle dans la culture statique. Enfin, dans des conditions d'agitation l'activité de décoloration a été particulièrement importante entre 7 et 28 jours d'incubation.

Le décalage observé en décoloration (aux quatre premiers jours) est lié au ralentissement de la croissance microbienne qui n'a débuté que après l'ajout des quantités de carbone et d'azote à l'état de trace ce qui est en accord avec les résultats rapportés par Panikov *et al* [211].

L'agitation du milieu de culture est favorable pour la croissance de cette souche aérobic stricte. Des résultats similaires ont été signalés par Dari *et al.* [212] qui ont travaillé sur la dégradation des AHs par une souche de streptomycètes.

Toutefois, en l'absence de glucose, la souche AM2 était incapable de croître dans un milieu supplémenté en AHs comme source unique de carbone. Par contre, certains auteurs ont rapporté l'utilisation possible des AHs comme source unique de carbone par les streptomycètes tels que rapportés par Dari *et al.* [212] et Hayakawa et Nonomura [213] car le carbone utilisé par ces bactéries auraient pu être des fractions organiques non entièrement humifiées et ne sont pas totalement résistantes à la biodégradation. Cependant, la présence d'une source de carbone assimilable supplémentaire était essentielle pour l'expression de l'activité décoloratrice sur les mélanoïdines des isolats de *Streptomyces* [214].

Deux phénomènes accompagnant l'élimination des AHs ont été observés dans notre cas :

- adsorption des AHS sur le mycélium de la souche AM2 comme aussi signalé par Vukovic *et al.* [215].
- le pourcentage de décoloration mesuré en valeur négative se réfère à une augmentation de l'absorbance par rapport au témoin, ceci pourrait être le résultat d'une sécrétion de pigments mélanoïdines connus pour ces microorganismes [216]. Ces pigments sécrétés dans le milieu de culture, portant une couleur marron similaire à celle des AHs, peuvent couvrir le pourcentage d'élimination d'AH comme signalé par Blondeau [175].

Nos résultats ont prouvé l'élimination des AHs par cette souche de Streptomycètes et ont également appuyé la conclusion antérieure selon laquelle la décoloration par ces bactéries est due beaucoup plus à la biodégradation qu'à l'adsorption [217] [218] [219] [220].

5.2.2. Changements de structure d'acides humiques incubés avec la souche AM2

En comparaison avec les structures initiales et finales des AHS après incubation de 28 jours à 30 °C en présence de la souche AM2, le spectre FTIR (figure 34) montre les deux modifications substantielles comme suit :

- (1) De nouveaux pics d'absorption apparus dans les régions de 600-700 cm^{-1} , de 1300 - 1450 cm^{-1} et de 1600 à 2100 cm^{-1} .
- (2) Des pics d'absorption ont été totalement disparus dans les régions de 700 - 800 cm^{-1} , de 900 - 1000 cm^{-1} et de 1500 - 1600 cm^{-1} .

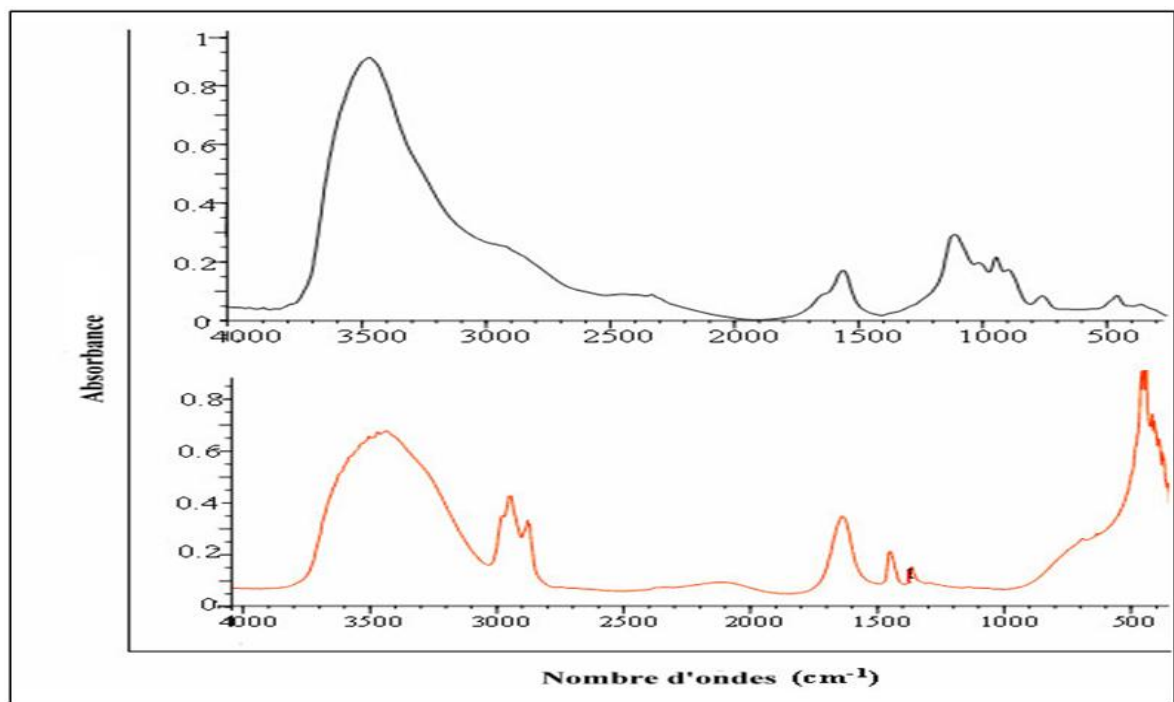


Figure 34 : Spectres IR des AHS incubés avec la souche AM2 pendant 28 jours à 30 °C. Noir: structure initiale et rouge: structure après incubation.

La diminution de l'absorbance dans les deux régions 1500 - 3000 cm^{-1} et de 3200 à 3800 cm^{-1} indique souvent le niveau de dégradation. Toutefois, dans les AHS résiduels, la teneur en carbone a diminué, indiquant que les unités aliphatiques ont été préférentiellement utilisées, tandis que les structures aromatiques condensés ont été plus résistantes à la biodégradation, cette suggestion a été confirmée par l'apparition de fortes bandes IR à 1599 cm^{-1} , attribuées à des quinones; des résultats similaires ont été rapportés par Filip et Tesarova [221].

En effet, les changements de structures pendant l'incubation ont prouvé clairement la dégradation des AHS testés dans notre étude, ceci a été également démontré par Liang *et al.* [222] sur la décomposition et la minéralisation des SHs aquatiques par un traitement biologique en utilisant FTIR comme moyen d'analyse.

5.2.3. Génération des sous-produits de dégradation

L'analyse par HPLC (Figure 35) montre les différents métabolites produits à la fin de l'incubation par rapport au pic initial des AHS ($t_R = 1,141$ min). En comparant les spectres d'un échantillon d'AHS issu d'une culture témoin (non ensemencé) avec celle d'un AHS soumis à une activité microbienne. Nous avons pu obtenir une diminution importante de la concentration d'AHS et formation de sous-produits ($t_{R1} = 1,441$; $t_{R2} = 2,148$; $t_{R3} = 3,563$; $t_{R4} = 4,354$).

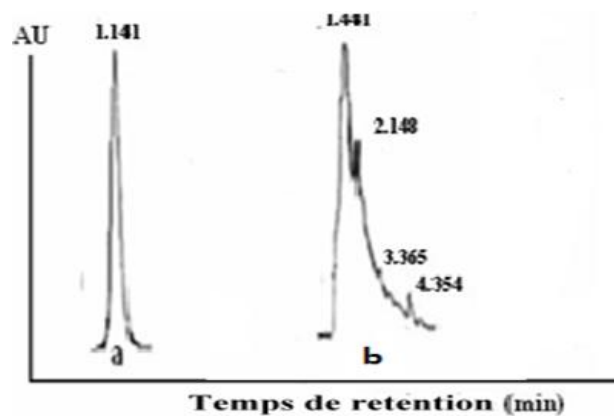


Figure 35 : Les sous-produits de dégradation des AHS détectés par HPLC. Le temps de rétention correspond aux métabolites comme suit : a. Concentration initiale des AHC comme témoin, b. Les métabolites obtenus après incubation des AHS avec la souche AM2.

5.2.4. Conclusion

Selon leurs morphologies, les acides humiques extraits du sol de Meftah ont une structure globulaire dominante indiquant ainsi le taux aromatique élevé, ce qui rend leur biodégradation difficile par des souches de *Streptomyces* isolées à partir des sols locaux. De même, Yanagi *et al* [223] ont signalé que les AHs ayant une structure abondante des noyaux aromatiques ont montré une résistance à la dégradation par le champignon *Coriolus consors*. Cependant, il y a peu d'informations en ce qui concerne les changements de la structure au cours de la biodégradation.

Dans cette présente étude, la souche de streptomycètes décoloratrice a été étudiée. Cette souche pourrait utiliser des AHs en tant que sources de carbone et d'azote. Nos résultats indiquent que des souches de *Streptomyces* ayant la capacité de dégrader les AHS peuvent jouer un rôle dans la dégradation de la lignine et dans le turnover de l'humus dans les sols locaux. En outre, le taux de décoloration élevé et les conditions faciles de culture de cette souche la propose en tant que meilleure candidate pour les différentes applications dans les processus biologiques de la production de l'énergie fossile à partir des AHs et surtout pour éliminer ces macromolécules présentes dans l'eau potable.

5.3.Caractérisation biochimique et moléculaire des peroxydases produites par la souche AM2

D'après l'étude de deux parties précédentes, la souche AM2 s'avère être la plus intéressante en tant que dégradatrice des AHs. Elle secrète deux nouvelles seraient intéressantes sur le plan recherche fondamentale et sur le plan application industrielle. Ceci nous a incité dans cette troisième à purifier et à mieux approfondir la caractérisation moléculaire de ces deuxenzymes.

5.3.1. Purification des peroxydases HaP1 et HaP2

Le profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur Sephacryl S-200 du précipité et du concentré (1005 mg) révèle deux pics d'élution désignés par pic 1 pour HaP1 et pic 2 pour HaP2 (figure 36).

La précipitation de l'extrait enzymatique brut au sulfate d'ammonium saturé à 40-60 % a permis d'obtenir une activité de 77% par rapport à l'activité initiale et un facteur de purification de 1,80 (Tableau 8).

Par ailleurs, une augmentation de l'activité spécifique et du facteur de purification a été constatée avec un rendement de 22% pour HaP1 et 29% pour HaP2.

Au cours de l'étape de la chromatographie d'échange d'anions sur Q-Sepharose, nous avons enregistré une augmentation du facteur de purification de l'ordre de 64,34 pour HaP1 et 88,02 pour HaP2 cependant, leurs rendement en activité chute à 20% et à 23% respectivement.

L'ultrafiltration a permis d'obtenir des facteurs de purification élevés : 107,68 pour HaP1 et 97,97 pour HaP2 cependant, leurs rendements ont chuté à 11% et à 18% respectivement.

Une deuxième purification de HaP2 par une seconde Sephacryl S-200 a permis d'obtenir un rendement de 15% et un facteur de purification de 188,20.

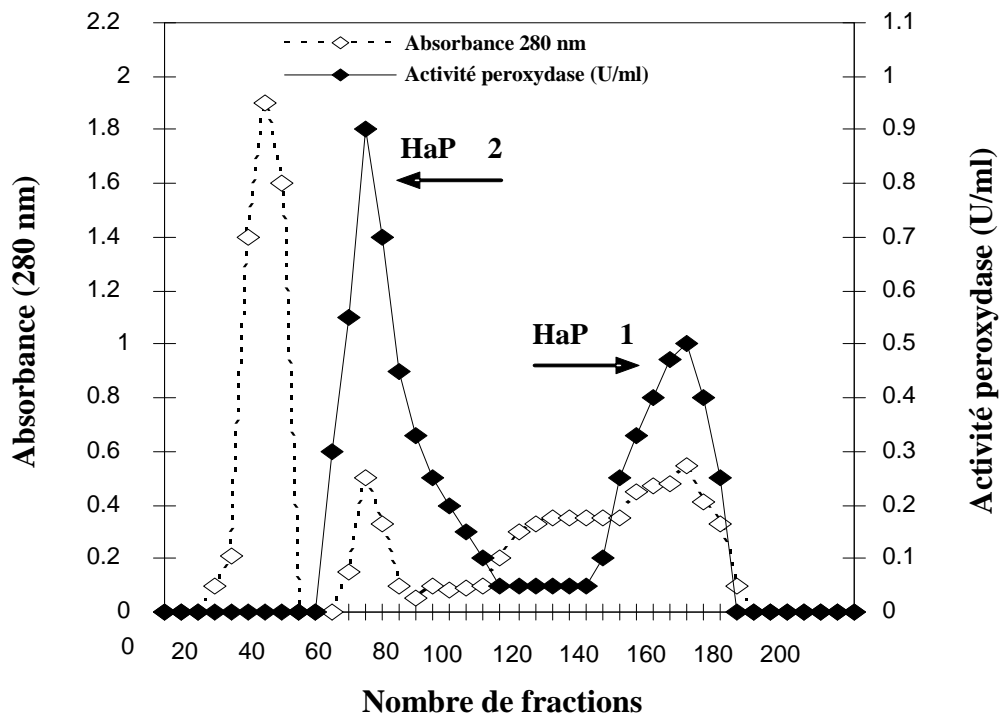


Figure 36 : Profils de purification des peroxydases HaP1 HaP2 de La souche AM2

Tableau 8 : Etapes de purification des peroxydases HaP1 et HAP2 de la souche AM2.

| Purification ^a | Activité totale (units) ^{b, *} | Protéine totale (mg) ^{b, c} | Activité spécifique (U/mg) ^b | Activité récupérée (%) | Facteur de purification | RZ |
|--|---|--------------------------------------|---|------------------------|-------------------------|------|
| Extrait brut | 103.74 | 2364 | 0.044 | 100 | 1 | NP |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (40-60%) | 79.85 | 1005 | 0.079 | 77 | 1.80 | NP |
| Première Sephacryl S-200 | | | | | | |
| HaP1 | 23.16 | 10.02 | 2.311 | 22 | 52.52 | 0.97 |
| HaP2 | 30.13 | 11.21 | 2.687 | 29 | 61.06 | 0.65 |
| Q-Sepharose | | | | | | |
| HaP1 | 13.45 | 4.75 | 2.831 | 20 | 64.34 | 1.53 |
| HaP2 | 23.86 | 6.16 | 3.873 | 23 | 88.02 | 1.06 |
| Ultrafiltration | | | | | | |
| HaP1 | 11.61 | 2.45 | 4.738 | 11 | 107.68 | 2.90 |
| HaP2 | 18.67 | 4.33 | 4.311 | 18 | 97.97 | 1.30 |
| Seconde Sephacryl S-200 | | | | | | |
| HaP2 | 15.57 | 1.88 | 8.281 | 15 | 188.20 | 1.84 |

a: Toutes les opérations réalisées à 4 ° C, **b** : Les expériences sont menées à trois reprises et ± d'erreurs standard, **c**: Les quantités de protéine sont estimées en utilisant la méthode de Bradford, * 1U de l'activité peroxydase est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour une augmentation de l'absorbance d'une unité par minute en utilisant le 2,4-DCP comme substrat, NP = pas de pic au environ de 400 nm.

5.3.2. SDS/PAGE et zymogramme

Afin d'évaluer le degré de pureté de HaP1 et HaP2 et de déterminer leurs tailles, nous avons analysé des aliquotes qui sont conservés après chaque étape de purification et ont servi pour l'analyse par électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide (15%) dans les conditions natives (PAGE) et dénaturantes (SDS-PAGE).

Une seule bande protéique est obtenue pour chaque enzyme purifiée. L'enzyme purifiée HaP1 avait un PM d'environ 25 kDa (figure 37), qui est similaire à ceux des peroxydases de *Streptomyces* [224]. Le PM de HaP2 est estimé à 40 kDa par SDS-PAGE (figure 37), ce qui correspond au poids déterminé par filtration sur gel et qui est aussi semblable à celui d'une peroxydase purifiée à partir d'une souche de *Streptomyces* [225].

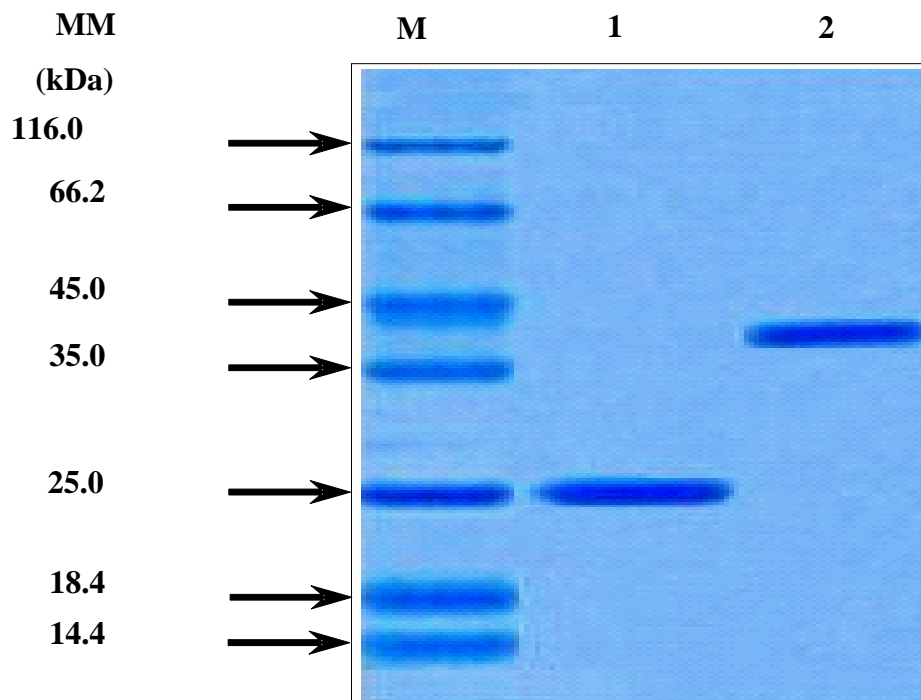


Figure 37 : Analyse par SDS/PAGE de HaP1 et HaP2. Piste 1 : HaP1 ; Piste2 : HaP2

5.3.3. Détermination de la taille des peroxydases par MALDI-TOF

L'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) montre que la masse moléculaire exacte de HaP1 et HaP2 sont respectivement, 25,17519 et 40,35111 kDa. Ces résultats confirment fortement que les peroxydases HaP1 et HaP2 sont des protéines monomériques comparables à celles précédemment rapportées pour d'autres peroxydases [224] [225] [226].

5.3.4. Séquençage de l'extrémité NH₂-terminale de HaP1 et HaP2

Les premiers acides aminés de l'extrémité NH₂-terminale de HaP1 et HaP2 sont identifiés respectivement, AQCANATTVSDEACCVLLP et ATCADGTTVANDACCVLFPILDNQ. Les deux séquences ont montré une uniformité, ce qui indique qu'ils ont été isolés à partir d'une forme pure. Ces séquences N-terminales montrent que HaP1 et HaP2 ont sept différences en termes de résidus d'acides aminés, à savoir respectivement : Q2T, N5D, A6G, S10A, D11N, E12D, et L18F.

Comme l'illustre le tableau 9, les séquences N-terminales de HaP1 et HaP2 sont comparées à d'autres séquences d'enzymes étroitement liés ce qui confirme qu'elles partagent une grande homologie avec les MnP, en particulier celles de *Agaricus bisporus* (84% d'identité avec HaP1) et *Pleurotus ostreatus* (82 % d'identité avec HaP1).

Tableau 9 : Les séquences N-terminales des 19 et 24 acides aminés respectifs de HaP1 et HaP2 et leur comparaison avec d'autres séquences des différents MnP.

| Peroxisases | N-terminal des acides aminés |
|---|------------------------------|
| HaP1 (<i>Streptomyces</i> sp. AM2, GU434673) | AQCANATTVSDEACCVLLP |
| HaP2 (<i>Streptomyces</i> sp. AM2, GU434673) | ATCADGTTVANDACCVLFPILDNQ |
| MnP1 (<i>Agaricus bisporus</i> , CAG27835) | AQCADGTTVSNEACCVLLPIIADIQ |
| MnP3 (<i>Pleurotus ostreatus</i> , BAA33009) | ATCADGR-TTANAACCVLF-PILDDIQ |
| MnPL1 (<i>Pleurotus eryngii</i> , AAD01401) | ATCADGR-TTANAACCVLF-PILDDIQ |
| MnPL2 (<i>Pleurotus ostreatus</i> , AAD01402) | ATCDDGR-TTANAACCILF-PILDDIQ |
| MnP2 (<i>Pleurotus ostreatus</i> , CAB51617) | VTCATGQ-TTANEACCALF-PILEDIQ |
| MnP3 (<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , AAB39652) | ATCPDGT-KVNNAACCAFI-PLAQDLQ |
| MnP (<i>Tylospora fibrillosa</i> , AAF13031) | ATCPDGT-KVNNAACCAFI-P |
| MnP2 (<i>Trametes versicolor</i> , CAA83148) | VACPDGVNTATNAACCQLF-AVRDDIQ |

5.3.5. Effet des inhibiteurs et des ions métalliques sur l'activité de HaP1 et HaP2

Afin de mieux identifier la nature des deux enzymes, nous avons suggéré d'examiner un certain nombre d'inhibiteurs en fonction de leur effet sur l'activité enzymatique de HaP1 et HaP2.

Les résultats ont révélé que les activités sont inhibées par deux inhibiteurs connus des peroxydases (tableau 10) à savoir le cyanure de potassium (54% pour HaP1 et 47% pour HaP2) et l'azide de sodium (62% pour HaP1 et 55% pour HaP2). Cela suggère qu'une composante à hème est impliquée dans l'activité catalytique de ces deux enzymes.

Divers métaux, comprenant Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Al^{2+} , Li^+ , et K^+ , ont été également testés pour déterminer leur effet sur l'activité des deux peroxydases purifiées (tableau 9). Les résultats obtenus révèlent que les activités de HaP1 et HaP2 sont inhibées respectivement par : Hg^{2+} (15 et 11%) et Zn^{2+} (65 et 60%) à des concentrations respectives de 5 à 50 mM. Les activités de ces deux peroxydases sont, toutefois, observées pour être induites à la fois par les deux concentrations de Mn^{2+} (150 et 144%), et Ca^{2+} (138 et 106%). Lorsqu'on les compare à celles des contrôles, les activités peroxydase ont été notées pour être induite par de faibles concentrations (5 mM) concernant Mg^{2+} (128%), Cu^{2+} (120%), Co^{2+} (115%), Al^{2+} (110%), et Li^+ (108%), mais elles sont inhibées par des concentrations plus élevées (100 mM) de ces mêmes ions métalliques à des pourcentages respectifs de 84, 74, 62, 58 et 47%.

Cependant à de plus fortes concentrations de K^+ , l'activité peroxydase est induite jusqu'à 133%, mais à faibles concentrations aucun effet n'est observé sur l'activité enzymatique. Il est à noter dans ce contexte qu'en termes d'applications industrielles, l'activité peroxydase en présence des ions métalliques est considérée comme une propriété importante.

En fait, la peroxydase préalablement purifiée à partir de *Lentinula edodes* est signalée à être fortement inhibée en présence de faibles concentrations d'ions métalliques tandis que celle purifiée à partir de *Bacillus* sp. est décrite comme étant active à des concentrations plus élevées de ces ions métalliques [227].

Tableau 10 : Effet des inhibiteurs et des ions métalliques sur l'activité des peroxydases HaP1 et HaP2.

| Inhibiteur/ ions métalliques | Activité résiduelle (%) [*] | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------|
| | HaP1 | HaP2 |
| Aucun | 100 ± 2.5 | 100 ± 2.5 |
| Potassium cyanide | 54 ± 1.1 | 47 ± 1.0 |
| Sodium azide | 62 ± 1.6 | 55 ± 1.3 |
| Mn ²⁺ (MnSO ₄) | 150 ± 4.7 | 144 ± 7.0 |
| Ca ²⁺ (CaCl ₂) | 138 ± 3.1 | 106 ± 3.1 |
| Co ²⁺ (CoSO ₄) | 115 ± 1.6 | 120 ± 1.6 |
| Mg ²⁺ (MgSO ₄) | 128 ± 4.5 | 141 ± 4.5 |
| Cu ²⁺ (CuSO ₄) | 120 ± 2.5 | 133 ± 2.5 |
| Zn ²⁺ (ZnSO ₄) | 65 ± 2.5 | 47 ± 2.5 |
| Hg ²⁺ (HgCl ₂) | 15 ± 0.5 | 25 ± 0.5 |
| Al ²⁺ (AlSO ₄) | 110 ± 1.6 | 119 ± 1.6 |
| Fe ²⁺ (FeSO ₄) | 117 ± 1.6 | 124 ± 1.6 |
| Li ⁺ (LiSO ₄) | 108 ± 1.6 | 114 ± 1.6 |
| K ⁺ (KCl) | 100 ± 1.6 | 110 ± 1.6 |
| Aucun | 100 ± 2.5 | 100 ± 2.5 |
| Potassium cyanide | 54 ± 1.1 | 47 ± 1.0 |

* Les valeurs représentant la moyenne de quatre répétitions et les erreurs standards sont signalées.

5.3.6. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de HaP1 et HaP2

L'effet du pH sur l'activité enzymatique de HaP1 et HaP2 incubées avec 2,4-DCP est suivi sur une gamme de pH de 3 à 11 à 40 ° C.

Comme le montre la (Figure 38 a), HaP1 présente une activité sur une large gamme de pH (3-8), avec un pH optimum égale à 6. L'activité maximale de HaP2 est observée à pH 7,5. La forte activité manifestée par les deux enzymes à des solutions de pH élevé est en fait, un attribut très important qui donne un soutien supplémentaire pour leur candidature pour une future application environnementale (par exemple décoloration des colorants) [227].

En ce qui concerne la stabilité du pH, les enzymes purifiées ont été incubées dans des tampons à des pH différents. Les profils de stabilité du pH montrent que HaP1 est très stable sur une large gamme de pH, le maintien de son activité initiale à 100% était à des pH compris entre 4 et 6 après 24 h à 40 ° C (figure 38 b). HaP2 a également maintenu son activité initiale de 100% à un pH compris entre 4 - 8.

A titre comparatif, le pH optimal de la peroxydase HRP est dans l'ordre de 6 à 6,5, son activité maximale à pH 7,5 est de 84%. Cette enzyme est plus stable dans la gamme de pH de 5 à 9 [229].

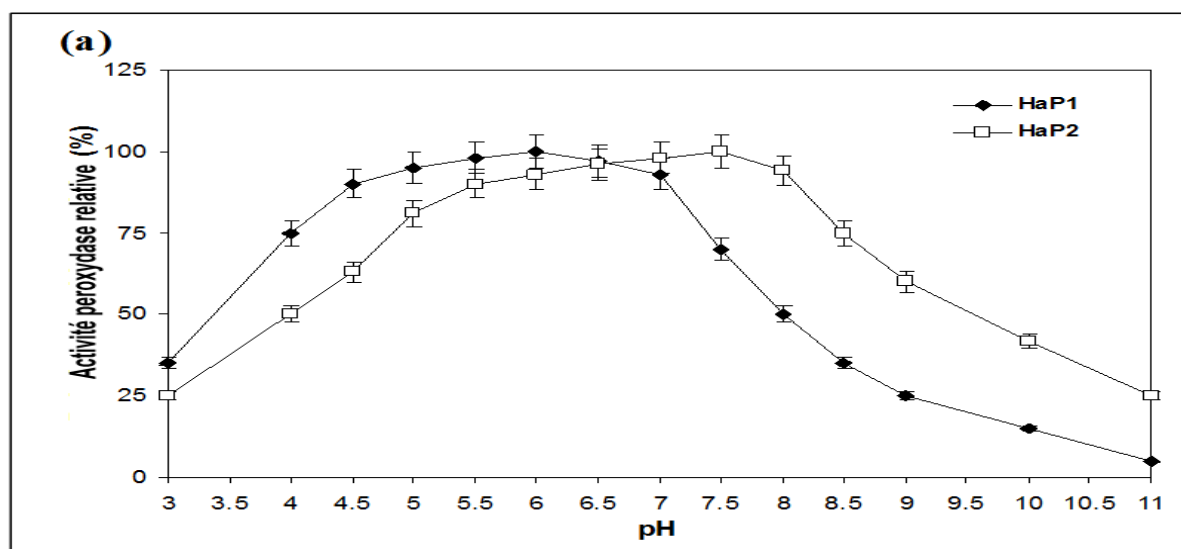


Figure 38 a : Effet du pH sur l'activité des peroxydases HAP1 et HAP2 à 40 °C

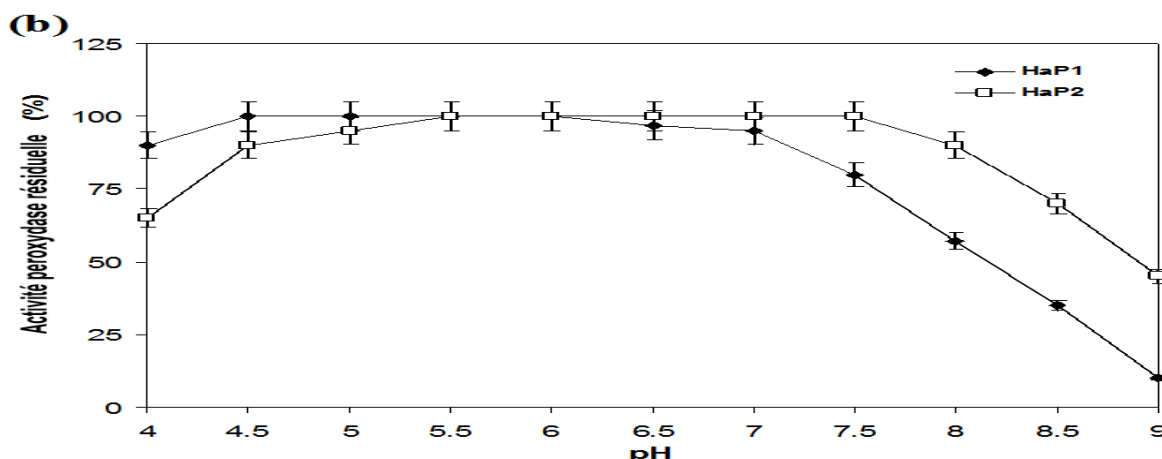


Figure 38 b : Effet du pH sur la stabilité des peroxydases HaP1 et HaP2.

5.3.7. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de HaP1 et HaP2

La température optimale pour les deux enzymes est de 55 °C (figure 39a). Les profils de stabilité thermique ont révélé que si les deux enzymes sont très stables à des températures inférieures à 40 °C, elles deviennent inactives à des valeurs de température plus élevées (figure 39b et 39c). HaP1 et HaP2 ont également conservé plus de 55% de leur activité initiale après 10 h d'incubation à 40 °C, et elles ont maintenu respectivement 11,76 et 19% de leur activité maximale après 2 h d'incubation à 45 °C.

Comme le montre les figures (39b et 39c) la thermo stabilité maximale est atteinte avec seulement 5 mm Mn²⁺, donc l'ajout de MnSO₄ a amélioré la thermostabilité des enzymes. Les deux enzymes ont pu conserver plus de 60% de leurs activités initiales après 4 h d'incubation à 50 °C en présence de 5 mM MnSO₄ et plus de 85% de leurs activités initiales après 1 h d'incubation à 55 °C.

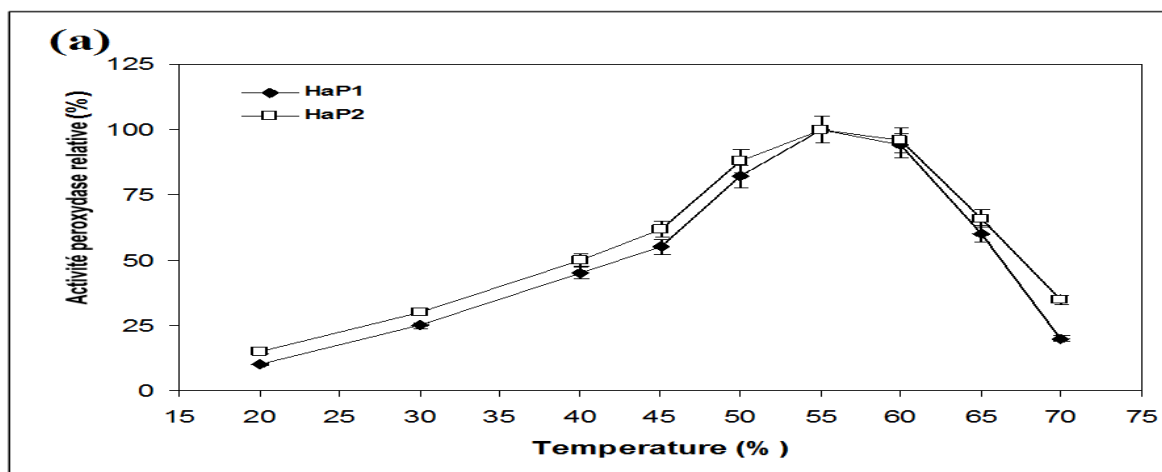


Figure 39a : Effet de la température sur l'activité des peroxydases HaP1 et HaP2.

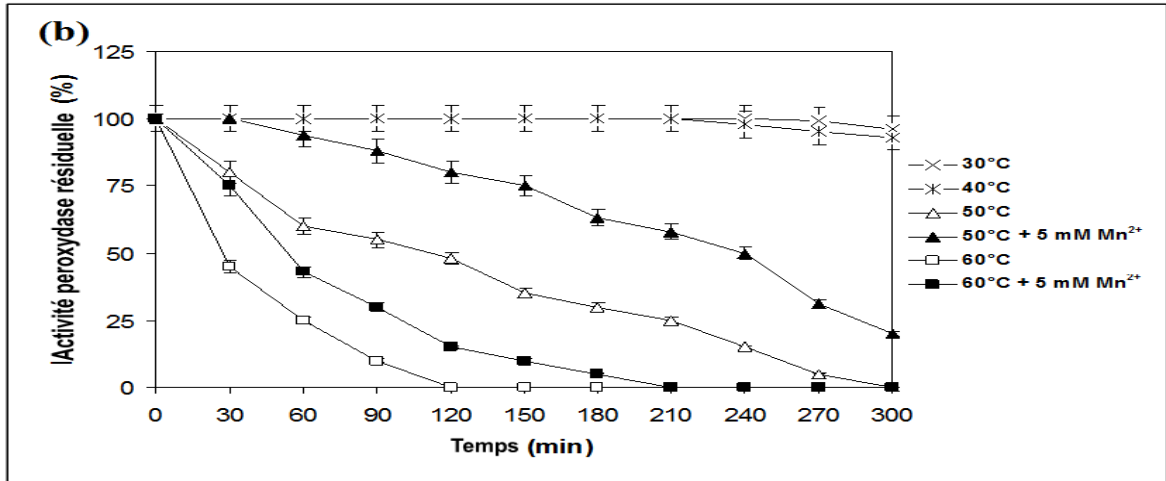


Figure 39b : Effet de la température sur la stabilité de HaP1.

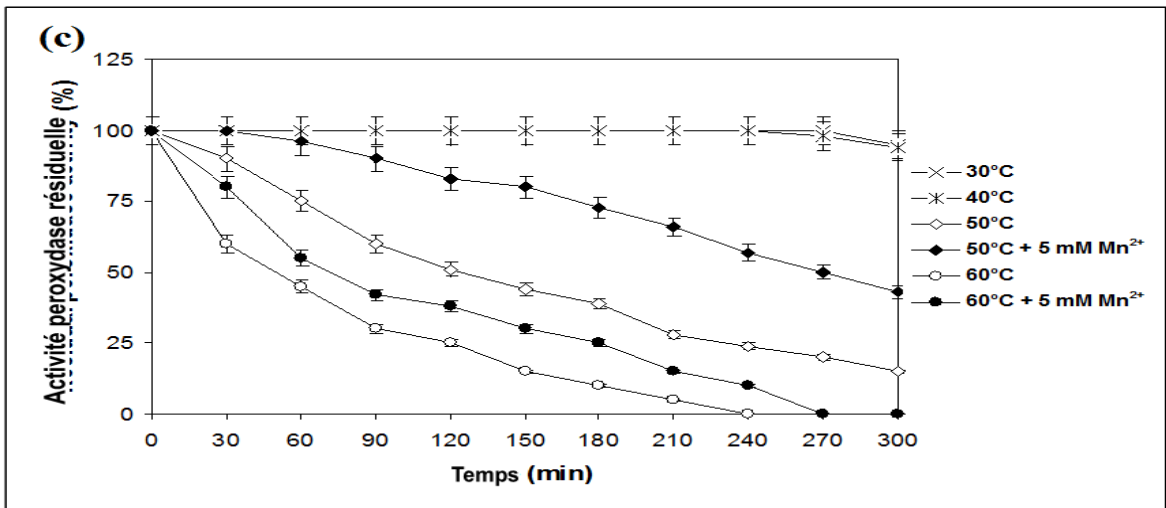


Figure 39c : Effet de la température sur la stabilité de HaP2.

En fait, la plupart des peroxydases sont signalées à être significativement stabilisées par l'ajout de Mn^{2+} à des températures élevées. L'ajout de Mn^{2+} a augmenté le temps de demi-vie de certaines peroxydases [230] [231]. L'amélioration de la thermostabilité des peroxydases contre l'inactivation thermique en présence de $MnSO_4$ pourrait être attribuée au renforcement des interactions à l'intérieur des molécules protéiques et à la liaison de Mn^{2+} sur le site actif. Ces propriétés fournissent également un appui supplémentaire pour la candidature de ces enzymes pour des futures applications industrielles [232].

5.3.8. Spécificité du substrat pour HaP1 et HaP2

Le suivi de l'activité de HaP1 et HaP2 selon plusieurs substrats a révélé que ces deux enzymes sont réactives avec les substrats suivants : 2,4-DCP, guiacol, L-DOPA, 4-chlorophénol, 2,6-dichlorophénol, 2,4,5-trichlorophénol et 2,4,6-trichlorophénol et aucune activité n'a été détectée avec le pentachlorophénol.

Les plus hauts niveaux de l'activité enzymatique ont été obtenus en présence de L-DOPA, le 2,4-dichlorophénol et le 2,4,5-trichlorophénol, tandis que les niveaux les plus bas ont été obtenus en utilisant le 4-chlorophénol.

L'évaluation de l'activité de l'enzyme en présence des substrats chlorophénols a montré que l'enzyme est capable d'oxyder tous les chlorophénols sauf le pentachlorophénol et le 2,4-dichlorophénol et le 2,4,5-trichlorophénol représentent les substrats les plus réactifs.

La catalyse pour toutes les réactions chlorophénols est précédée avec formation d'une couleur rose-rouge qui est due au couplage avec le réactif 4-aminoantipyrine. Cette observation est en conformité avec les remarques rapportées par [Spiker et al](#) [233] que l'oxydation des phénols contenant le carbone dans la position para, en combinaison avec la 4-aminoantipyrine, donne la formation d'une couleur rose-rouge. Ce résultat est également confirmé avec le substrat L-DOPA par [Spiker et al](#) [233].

5.3.9. Activité de HaP1 et HaP2 en fonction de la concentration de H₂O₂

L'effet de la concentration initiale de H₂O₂ sur l'activité des peroxydases purifiées HaP1 et HaP2 est étudiée à pH 7,4 et à une température de 25 °C à différentes concentrations de l'enzyme.

La figure 40 montre les activités relatives des peroxydases en fonction de la concentration initiales de H₂O₂ dans le dosage du mélange. En outre, l'allure des courbes de HaP1 et HaP2 est presque identique en comparaison avec les autres peroxydases [234]. Les activités peroxydases de HaP1 et HaP2 sont révélées maximales à une concentration initiale de H₂O₂ d'environ 0,5 mM.

En observant l'allure des courbes de la figure 40, on constate clairement que les propriétés catalytiques des deux peroxydases sont presque identiques, et que la purification n'a aucun effet sur leurs propriétés. Les paramètres cinétiques des

activités peroxydases sont estimés à HaP1 et HaP2 en utilisant le modèle développé par Nicell et Wright [192].

En comparaison avec d'autres peroxydases [192] [234], H_2O_2 présente un effet inhibiteur sur l'activité des deux peroxydases HaP1 et HaP2 (figure 40).

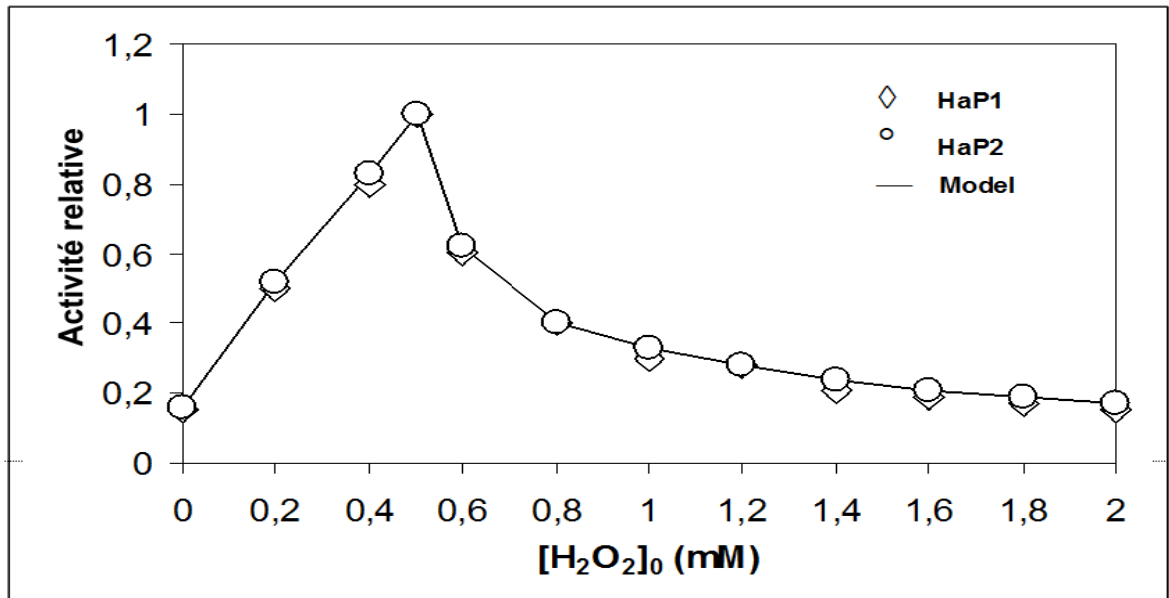


Figure 40 : Effet de la concentration de H_2O_2 sur l'activité des peroxydases HaP1 et HaP2.

A une concentration de H_2O_2 inférieure à 0,5 mM le cycle catalytique de la peroxydase est supposé être limité à la formation du composé I (figure 41).

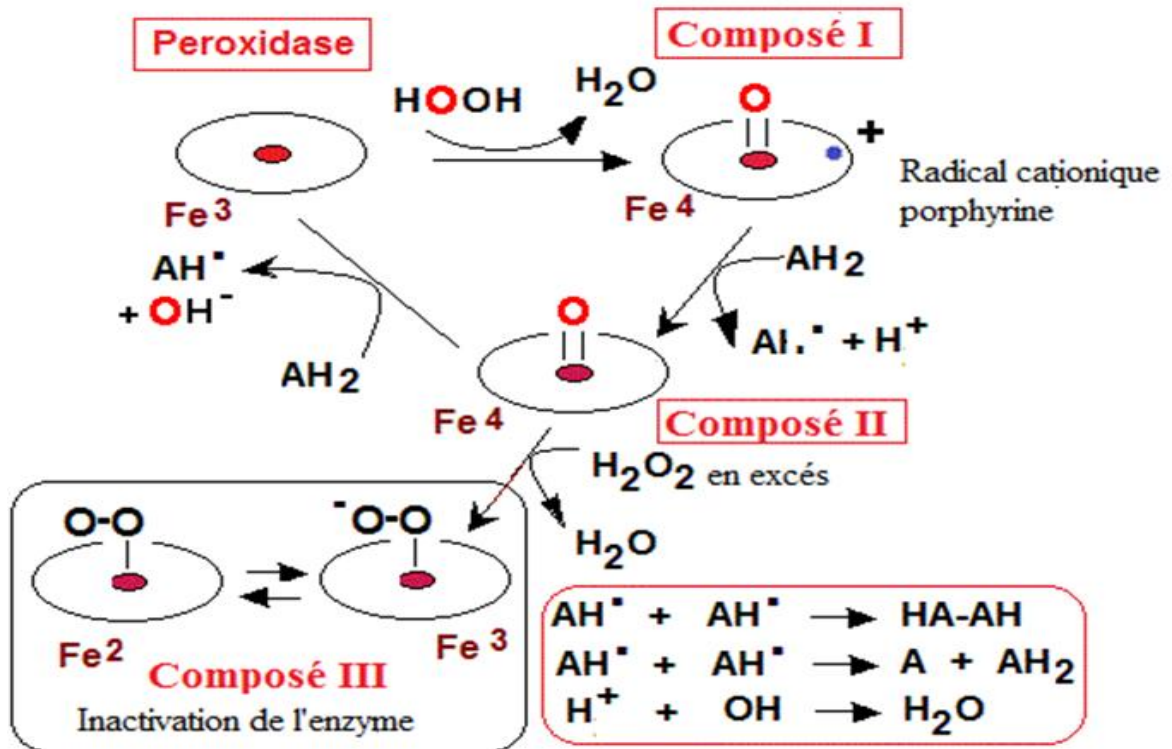


Figure 41 : cycle catalytique de la peroxydase

Tout d'abord, l'oxydant H₂O₂ se lie à l'enzyme et oxyde l'ion fer de l'hème en fer V. Puis un premier substrat se lie au site catalytique. Il est oxydé en AH tandis qu'un proton et un électron sont transférés à l'hème, qui est réduit à l'état IV. Enfin, un deuxième substrat AH₂ se lie au site catalytique et est oxydé de la même manière, ce qui ramène le fer à l'état initial ferrique.

Cependant, l'excès de H₂O₂ semble réagir avec le composé II pour former le composé III relativement inactif, ce qui revient au cycle catalytique central.

5.3.10. Caractérisation spectrale du cofacteur à hème

Les propriétés spectrales de HaP1 et HaP2 ont été analysées à l'aide du spectre UV-VIS de 200 à 700 nm afin de déterminer si ces enzymes contiennent un cofacteur à hème.

Notamment, lors de la purification des deux peroxydases, une couleur marron-rouge des fractions solubles a été observée, ce qui a été plus prononcée dans les solutions diluées, indiquant qu'un cofacteur chromogène est associé à chaque enzyme.

La Figure 42 a révélé les caractéristiques spectrales des peroxydases purifiées HaP1 et HaP2 en montrant un pic d'acide aminé à 280 nm et un autre pic à 406 nm.

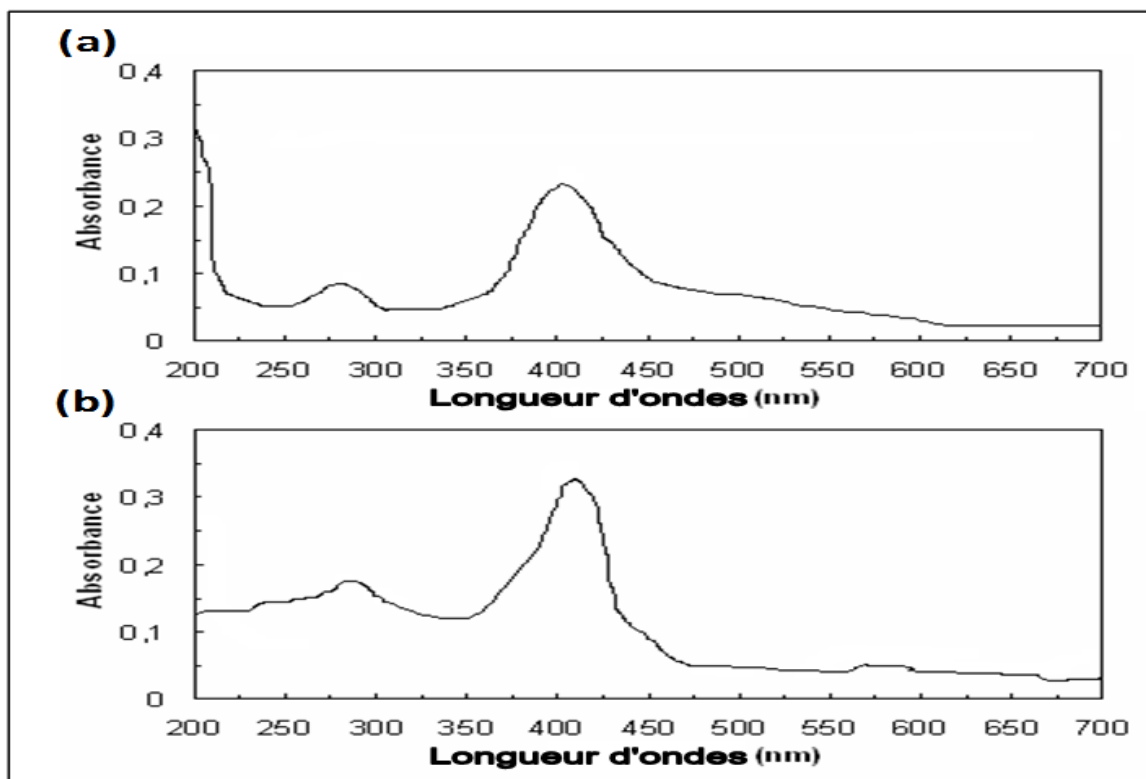


Figure 42 : Spectres UV/Vis des peroxydases HaP1(a) et HaP2 (b).

Les valeurs déduites de RZ sont respectivement 2,90 et 1,84 (Tableau 8) calculées pour HaP1 et HaP2, qui sont déjà similaires à celles signalées pour d'autres peroxydases [235] [236] [237]. Ces données ont fortement suggéré que HaP1 et HaP2 contiennent un cofacteur à hème. Une analyse plus détaillée est réalisée par la détermination des propriétés spectrales de chaque enzyme après traitement par le mélange pyridine-NaOH. Ceci a révélé un spectre hémochrome pyridine, ce qui est identique à celui du protohème IX (de façon non covalente à hème b) [195]. Le contenu proto-hème a été déterminé par la méthode pyridine ferro-hémochrome [193], et le contenu hème a été calculé sur la base du coefficient d'extinction ($34,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) de pyridine hémochrome b. A partir de ces spectres, on constate que HaP1 et HaP2 contiennent respectivement 0,7 et 0,5 hème par mole indiquant que les deux enzymes contiennent un unique cofacteur à hème. Ainsi, comme les autres peroxydases, HaP1 et HaP2

possèdent une hème non covalente (protohème IX) comme cofacteur qui a disparu partiellement lors de la purification [235] [237].

5.3.11. Énantiosélectivité de HaP1 et HaP2

La sulfoxydation énantiosélective des sulfures par DYP-type (TfuDyP) et par les peroxydases végétales (HRP et PIL) est bien établie [237] [238] [239].

Pour étudier si HaP1 et HaP2 sont capables de catalyser ce type de réaction énantiosélective, la sulfoxydation de plusieurs sulfures aromatiques est testée et suivie par l'analyse des produits sur une colonne GC chirale. Tous les sulfures testés ont été énantiosélectivement converti par HaP1 et HaP2 en sulfoxydes correspondants (tableau 11).

La meilleure énantiosélectivité par HaP1 et HaP2 est obtenue avec le sulfure phenyl ethyl et le sulfure methyl benzyl, qui a donné respectivement le (R)-sulfoxyde avec 72 et 63%. Néanmoins, l'énantiosélectivité de HaP1 ou HaP2 confirme également que les oxydations observées sont vraiment des catalyses enzymatiques par la liaison énantiosélective du substrat le plus proche du cofacteur à hème oxydant de chaque enzyme.

Tableau 11 : Pourcentage de l'énantiosélectivité obtenue par oxydation énantiosélective des sulfures aromatiques par HaP1 et HaP2.

| Sulfures | HaP1 | HaP2 |
|--------------------------------|------|------|
| Sulfure Phenyl Ethyl | 72 | 60 |
| Sulfure Phenyl Methyl | 34 | 50 |
| Sulfure Methyl Benzyl | 55 | 63 |
| Sulfure <i>p</i> -tolyl Methyl | 47 | 44 |
| Sulfure Methyl Allyl | 50 | 58 |

5.3.12. Conclusion

Cette troisième partie a visé la purification et la caractérisation des deux peroxydases. Par ailleurs, les techniques de purification utilisées dans ce travail, ont permis d'aboutir à une solution enzymatique homogène. Par rapport au surnageant de culture, les enzymes HaP1 et HaP2 ont été purifiées à des facteurs

de purification de 107,68 pour HaP1 et 188,20 pour HaP2 avec des rendements de 11 et 15%, respectivement. L'étude des deux enzymes pures a montré que leurs activités spécifiques sont de 4,738 et 8,281 U/mg, respectivement. La purification de HaP1 et HaP2 a conduit à l'obtention de deux bandes sur SDS-PAGE qui correspondent à deux masses moléculaires de l'ordre respectif de 25 kDa et 40 kDa, ce qui confirme bien les résultats d'estimation obtenus avec le gel de filtration. Il s'agit donc de deux enzymes monomériques.

Les premiers acides aminés de l'extrémité NH₂-terminale de HaP1 et HaP2 de la souche AM2 ont été identifiés respectivement, AQCANATTVSDEACCVLLP et ATCADGTTVANDACCVLFPILDNQ. Les deux séquences ont montré une uniformité, ce qui indique qu'ils ont été isolés à partir d'une forme pure. Ces séquences montrent que HaP1 et HaP2 ont sept différences en termes de résidus d'acides aminés, à savoir respectivement : Q2T, N5D, A6Q, S10A, D11N, E12D, et L18F.

La caractérisation des peroxydases purifiées a montré que :

- Les pH optimums sont 6 pour HaP1 et 7,5 pour HaP2.
- HaP1 et HaP2 ont également conservé plus de 55% de leur activité initiale après 10 h d'incubation à 40 °C, et elles ont maintenu respectivement 11,76 et 19% de leur activité maximale après 2 h d'incubation à 45 °C.
- Les deux enzymes ont pu conserver plus de 85% de leurs activités initiales, après 4 h d'incubation à 50 °C en présence de 5 mM MnSO₄ et plus de 60% de leurs activités initiales après 1 h d'incubation à 55 °C.
- Les activités peroxydase de HaP1 et HaP2 ont été révélées maximales à une concentration initiale de H₂O₂ d'environ 0,5 mM.
- Les spectres UV-vis des peroxydases indiquent que HaP1 et HaP2 possèdent un pic d'acide aminé à 280 nm et un autre à 406 nm.
- Les valeurs déduites de RZ sont respectivement 2,90 et 1,84 pour HaP1 et HaP2, qui sont déjà similaires à celles signalées pour d'autres peroxydases.
- HaP1 et HaP2 contiennent respectivement 0,7 et 0,5 d'hème par mole indiquant que ces deux enzymes contiennent un unique cofacteur à hème.

- Les activités peroxydase ont été notées pour être induites par de faibles concentrations (5 mM) concernant Mg^{2+} (128%), Cu^{2+} (120%), Co^{2+} (115%), Al^{2+} (110%), et Li^+ (108%), mais elles sont inhibées par des concentrations plus élevées (100 mM) de ces mêmes ions métalliques à des pourcentages respectifs suivants : 84, 74, 62, 58 et 47%.

DISCUSSION GENERALE

Les substances humiques ont fait l'objet de nombreuses études qui sont développées autour de la nature chimique et de la structure de ces macromolécules afin de comprendre leurs propriétés physico-chimiques et leurs rôles.

L'étude des SHs est complexe en raison de la variabilité de leur structure qui est liée à leur origine, à la nature du matériel humique, aux conditions environnementales de formation et aux méthodes d'extraction.

C'est dans le même contexte s'inscrit notre première phase de l'étude sur l'extraction et la caractérisation des AHS en se basant sur les différentes techniques analytiques (microscopiques et spectroscopiques). Elles s'avèrent que ces AHS sont caractérisés par :

- Un rapport (E_{465}/E_{665}) faible associé à une forte teneur en carbone et une faible teneur en oxygène qui est en accord avec celles signalées dans plusieurs travaux [199] [194] [41] [43]. Une forte présence des chaînes alkyles latérales polyalcools ou polyacides.
- Une prédominance de la structure aromatique plutôt qu'une structure aliphatique tel que interprété par [174].

Ceci confirme l'obtention des substances humiques de nature "**Acides Humiques**" en employant le protocole d'extraction préconisé par IHSS.

Quant à la biodégradation des AHS par les streptomycètes, nous signalons que ces microorganismes sont considérés comme étant la force motrice derrière le "turnover" (formation, transformation, dégradation et minéralisation) des SHs. La décoloration ou le blanchissement du milieu d'une couleur foncée, représentant une plus forte concentration d'AH, est considéré comme un indicateur de dégradation [239]. D'où nos résultats ont confirmé l'isolement d'une souche de streptomycètes, à partir d'un biotope Algérien, capable de décolorer un milieu de

culture contenant 0,5% d'AHs avec un taux de décoloration de 66%, atteint après 28 jours d'incubation sous agitation.

Cette souche, codée AM2, a été identifiée en se basant sur des méthodes morphologiques, chimiques, physiologiques et biochimiques d'une part et sur les méthodes moléculaires par la détermination de la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARN 16S, d'autre part. Elle est identifiée en tant que *Streptomyces parvulus*. Parmi les microorganismes les plus impliqués dans la dégradation des AHs sous l'influence de différentes conditions sont souvent des champignons de la classe ascomycètes : *Epicoromnigrum*, *Eurotium echinulatum*, *Hendersonula torulidea* et *Aspergillus sydowi*. Néanmoins, peu de travaux ont été publiés sur la dégradation des AHs par les actinomycètes.

Les travaux antérieurs ont suggéré l'association de deux phénomènes au cours de l'élimination des AHs, l'adsorption sur les surfaces des cellules microbiennes et la dégradation par des enzymes extracellulaires [75] [239] [242].

Les modifications de la structure des AHs extraits des sols locaux ont été mises en évidence par FTIR. En effet, les changements de structures pendant l'incubation ont prouvé clairement la dégradation des AHs testés dans notre cas d'étude, ceci a été aussi signalé par d'autres auteurs [205] [222] En outre, l'analyse par HPLC a montré les différents métabolites produits à la fin de l'incubation.

En effet, la complexité de la structure des AHs rend la détection analytique de leurs changements extrêmement difficile. Ainsi, la sécrétion d'enzymes et d'autres composés en plus de l'adsorption des AHs sont à l'origine des difficultés de l'interprétation. D'autre part, différentes méthodes chromatographiques sont couramment utilisées pour montrer que la décoloration ou le blanchissement des milieux contenant les AHs est associée à la dégradation [175] [243] [244]. Néanmoins, la précision du PM des AHs et la détermination de leurs taille ont été critiquées en raison des changements qui se produisent à différentes conditions et méthodes selon [245]. Alors que la minéralisation des AHs a été démontrée en utilisant les AHs marqués par ^{14}C [246]. Malheureusement, cela est loin d'être valable pour tous les AHs.

La troisième phase de l'étude a été totalement consacrée à la purification et la caractérisation des enzymes impliquées dans la dégradation des AHs. Pour ce faire, nous avons utilisé diverses techniques pour séparer les enzymes recherchées de type peroxydase parmi toutes les fractions protéiques présentes.

Les outils analytiques les plus poussés, utilisés dans notre étude, ont permis d'obtenir des informations originales concernant les deux peroxydases purifiées à partir d'une même souche de streptomycètes isolée localement.

La comparaison des séquences N-terminales d'acides aminés des deux peroxydases avec celles de la littérature disponibles sur la banque de données internationale a confirmé que ces deux enzymes sont nouvelles d'où nous avons proposé la nouvelle appellation « HaP1 et HaP2 » (Humic acide Peroxidase).

Récemment, une nouvelle famille des peroxydases à hème a été identifiée : c'est la DyP-type qui est très répandues chez les bactéries et les champignons [247]. Les peroxydases DyP-type comprennent aussi une nouvelle famille des peroxydases à hème à savoir : d'*Escherichia coli* [235], BtDyP de *Bacteroides thetaiotaomicron*, TyrA de *Shewanella oneidensis* [236] [248] et TfuDyP d'une souche d'actinomycètes *Thermobifida fusca* [237]. Jusqu'à nos jours on ne connaît pas encore entièrement la fonction physiologique de toutes les peroxydases DyP-type déjà publiées.

Malgré ce grand flux de données sur les peroxydases mais, on a peu d'informations sur les peroxydases isolées à partir de streptomycètes [237] [249]. En fait, les peroxydases des streptomycètes ont été détectées comme intracellulaires [250] ou extracellulaires [251] [252] et elles ont été décrites autant que peroxydases à hème ou sans hème [253]. Par exemple une peroxydase extracellulaire a été isolée, purifiée et caractérisée à partir de *Streptomyces viridosporus* qui dégradent la lignine [224]. Cette enzyme purifiée a catalysé le clivage de la liaison CO-C13 de l'éther arylglycerol β -aryl phénolique et non-phénolique de la lignine modèle [254] [255].

Les peroxydases purifiées dans notre cas sont douées des caractéristiques fortement recherchées dans les applications liées à plusieurs domaines, notamment, ceux de la biotechnologie environnementale. A titre complémentaire, l'utilisation d'un procédé d'élimination des AHs (restants après les étapes de traitement des eaux de surface destinées à la production de l'eau potable) pourrait s'implanter en se basant sur l'activité dégradatrice de ces peroxydases qui seront employées en mode immobilisé en bioréacteurs.

Conclusion générale

La première étape de ce travail a porté sur la caractérisation des acides humiques (AHs) extraits à partir du sol de surface de la plaine de la Mitija. L'extraction, la caractérisation et la biodégradation des AHs ont été étudiées en utilisant, à titre comparatif, des AHs commerciaux. L'ensemble des recherches entreprises nous a permis de conclure sur les deux points suivants :

- 1- Les AHs isolés à partir des sols locaux, en appuyant sur la procédure d'extraction recommandée par l'IHSS, sont similaires à ceux de produits commerciaux (synthétiques). Néanmoins, une étape de purification est avérée primordiale.
- 2- D'une manière générale, les structures macromoléculaires et les formes observées par MEB, les spectres UV-visible et les spectres FTIR des AHs sont typiquement proches de ceux des sols publiés dans plusieurs travaux.

La deuxième étape de l'étude a été consacrée à la mise en évidence de la biodégradabilité, à la sélection des souches performantes et à la détermination des conditions de biodégradation des AHs. Les résultats obtenus indiquent que :

- Les actinomycètes ont fortement manifesté en tant que bons dégradeurs d'AHs.
- L'identification de la souche sélectionnée AM2 a été accomplie par des études morphologiques et physiologiques basées sur des observations microscopiques et des tests biochimiques (galeries API) et par l'analyse moléculaire du gène de l'ARNr 16S. La lecture des galeries API 50 CH et API ZYM confirment qu'il s'agit d'une souche du genre *Streptomyces* et

qu'elle métabolise plusieurs sucres carbohydratés et possède des activités enzymatiques caractéristiques des autres souches de *Streptomyces* et que la détermination de l'espèce nécessite d'autres tests supplémentaires. Ainsi la séquence du gène de l'ARN 16S de la souche AM2 a été déposée dans la banque de données (« GenBank BLAST ») sous le numéro d'accèsion GU434673 et cette souche a été identifiée comme *Streptomyces parvulus*.

La troisième étape de ce travail a été focalisée sur l'étude biochimique et moléculaire détaillée des peroxydases produites par la souche AM2. En effet, les deux peroxydases HaP1 et HaP2 s'avèrent être très intéressantes pour une éventuelle application industrielle. Les principaux résultats obtenus sont :

- HaP1 et HaP2 sont purifiées avec un facteur de purification de 38 fois et un rendement d'environ 11% et 15% respectivement et montrent des activités spécifiques respectives de 4,738 U/mg et 8,281 U/mg.
- L'analyse de chaque enzyme pure, montre qu'elles sont sous forme d'un seul monomère ayant deux tailles estimée à 25 kDa pour HaP1 et 40 kDa pour HaP2 par filtration sur gel, et SDS-PAGE, puis précisée respectivement à 25175,19 et 40351,11 Da par MALDI-TOF.
- Les premiers acides aminés de l'extrémité NH₂-terminales de HaP1 et HaP2 sont respectivement, AQCANATTVSDEACCVLLP et ATCADGTTVANDACCVLFPILDNQ.
- Les deux séquences ont montré une uniformité, ce qui indique qu'ils ont été isolés dans une forme pure. Ces séquences N-terminales montrent que HaP1 HaP2 ont sept différences en termes de résidus d'acides aminés, à savoir respectivement: Q2T, N5D, A6Q, S10A, D11N, E12D, et L18F.

La caractérisation physico-chimique des deux peroxydases purifiées a montré que

- Les pH optimums sont 6 pour HaP1 et 7,5 pour HaP2.
- HaP1 et HaP2 ont également conservé plus de 55% de leur activité initiale après 10 h d'incubation à 40 °C, et elles ont maintenu respectivement 11,76 et 19% de leur activité maximale après 2 h d'incubation à 45 °C.
- Les deux enzymes ont pu conserver plus de 85% de leurs activités initiales,

après 4 h d'incubation à 50 ° C en présence de 5 mM MnSO₄ et plus de 60% de leurs activités initiales après 1 h d'incubation à 55 ° C.

- Les activités peroxydase de HaP1 et HaP2 ont été révélées maximales à une concentration initiale de H₂O₂ d'environ 0,5 mM.
- Les spectres UV-vis des peroxydases indiquent que HaP1 et HaP2 possèdent un pic d'acide aminé à 280 nm et un autre à 406 nm.
- Les valeurs déduites de RZ sont respectivement 2,90 et 1,84 pour HaP1 et HaP2, qui sont déjà similaires à celles signalées pour d'autres peroxydases.
- HaP1 et HaP2 contiennent respectivement 0,7 et 0,5 d'hème par mole indiquant que ces deux enzymes contiennent un unique cofacteur à hème.
- Les activités peroxydase ont été notées pour être induites par de faibles concentrations (5 mM) concernant Mg²⁺ (128%), Cu²⁺ (120%), Co²⁺ (115%), Al²⁺ (110%), et Li⁺ (108%), mais elles sont inhibée par des concentrations plus élevées (100 mM) de ces même ions métalliques à des pourcentages respectifs suivants : 84, 74, 62, 58 et 47%.

En perspective nous proposons la poursuite de la recherche sur les aspects suivants :

- Le criblage et l'étude de nouvelles peroxydases d'origine microbienne avec des améliorations dans la stabilité et l'activité et qui seraient les plus performantes possibles afin de répondre aux exigences des applications industrielles et environnementales.
- L'utilisation des peroxydases dans le traitement des eaux usées afin d'éliminer les phénols (polluants toxiques) en catalysant leur polymérisation (composés moins toxiques) et aussi l'exploitation des peroxydases dans le domaine de traitement des eaux potables pour éliminer les AHs.
- Utilisation des peroxydases dans le blanchissement des effluents industriels du papier, du textile et de détergence.
- Dégradation des pesticides et des hydrocarbures aromatiques polycycliques.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Basfar AA**, Mohamed KA, Al-Abduly AJ, Al-Shahrani AA. Radiolytic degradation of atrazine aqueous solution containing humic substances. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009;72:948-53.
2. **Oguz E**, Tortum A, Keskinler B. Determination of the apparent rate constants of the degradation of humic substances by ozonation and modeling of the removal of humic substances from the aqueous solutions with neural network. *J Hazard Mater* 2008;157:455-63.
3. **Victorndira, D.** (2006), Substances humiques du sol et du composte analyse élémentaire et groupements atomiques fictifs vers une approche thermodynamique, Thèse, Toulouse, France.
4. **Stevensen, F.J.** (1982), Extraction, fraction and general chemical composition of soil organic matter Ed. *Humus Chemistry, Genesis, Compositin, Reaction*, John Wiley and Sons, New York.
5. **Soleimani M**, Hajabbasi MA, Afyuni M, Akbar S, Jensen JK, Holm PE, Borggaard OK. Comparison of natural humic substances and synthetic ethylenediaminetetraacetic acid and nitrilotriacetic acid as washing agents of a heavy metal-polluted soil. *J Environ Qual* 2010;39:855-62.
6. **Del Carmen Vargas-García M**, Francisca Suárez-Estrella F, José López M, Moreno J. Influence of microbial inoculation and co-composting material on the evolution of humic-like substances during composting of horticultural wastes. *Process Biochem* 2006;41:1438-43.
7. **Sposito, G.**, *The Cemistry of soils*, Ed. Oxford University Press, Oxford, (1989).
8. **Tzafrir, G.**, Yitzhak, H., Yona, C., Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms” *fungal biology reviews*, V.2 1 (2007), pp. 179-189
9. **kactner, M.**, Hofricheter, M., “Biodegradation of humic substances”, In M. Hofrichter and A. Steinbchel, *Biopolymers, Lignin, Humic Substances and Coal*, Germany, V.1,(2001), pp. 349-378.

10. **Blondeau, R.**(1988), « Évolution des acides humiques soumis à l'activité d'une microflore bactérienne hétérotrophe », Ed. Sci-Sol, V.26, (1988), pp.41-50.
11. **Moriguchi, T.**, Yano, K., Tahara, M., Yaguchi, K. (2005) Metal-modified silica adsorbents for removal of humic substances in water, *J. Colloid Interface Sci.* 283, 300–310.
12. **Badis, A.** (1992). Les actinomycètes de quelques sols de la Mitidja : Systématique, écologie et dégradation des acides humiques. Thèse de magister. Ecole Normale Supérieure, Kouba, Alger.
13. **Djibaoui R.** (1992) Etude des bactéries et champignons de quelques sols de la Mitidja : Systématique, écologie et dégradation des acides humiques. Thèse de magister. Ecole Normale Supérieure, Kouba, Alger.
14. **Ferradji, F.Z.**, (2008) Caractérisation et optimisation de la biodégradation des acides humiques par des souches microbiennes isolées à partir de différentes niches écologiques de l'Algérie. Mémoire de Magister
15. **Badis, A.**, Ferradji, F.Z., Boucherit, A., Fodil, D., Boutoumi, H., 2009. Characterization and biodegradation of soil humic acids and preliminary identification of decolorizing actinomycetes at Mitidja plain soils (Algeria). *Afr. J. Microbiol. Res.* 3, 997–1007.
16. **Badis, A.**, Ferradji, F.Z., Boucherit, A., Fodil, D., Boutoumi, H., 2010. Removal of natural humic acids by decolorizing actinomycetes isolated from different soils (Algeria) for application in water purification. *Desalination* 259, 216–222.
17. **Gassart, P.**(2001), «Contribution a l'étude des interactions de la matière organique des sols avec les métaux lourds. Etude structural et analytique des molécules modèle », Lille.
18. **Kononova, M.M.**(1966), « Soil Organic Matter », Ed. Pergamon, Press, Elmsford, NY.
19. **Amir, S.** (2005), « Contribution a la valorisation de boues de station d'épuration par compostage: Devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost », Thèse, Toulouse, N° d'ordre : 2207.
20. **Tissaux, J.C.** (1996), « Une revue bibliographique des principaux mécanismes pédogénétiques pour caractériser le rôle du bois raméal fragmenté (BRF) dans le processus d'humification », N° 60 Laval Québec G1K 7P4 QUÉBEC Canada.
21. **Labanowsk, J.**(2004), «Matière organique naturelle et anthropique: vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation».

- 22. Annabi, M.**(2005), « Stabilisation de la structure d'un sol limoneux par des apports de composts d'origine urbaine: relation avec les caractéristiques de leur matière organique », Thèse, Paris, Grignon.
- 23. Stevensen, F.J.**(1982), Extraction, fraction and general chemical composition of soil organic matter Ed. Humus Chemistry, Genesis, Compositin, Reaction, John Wiley and Sons, New York.
- 24. Pal, S.,** Bollag, J.M., Huang, P.M.(1994), « Role of abiotic and biotic catalysts in the transformation of phenolic compounds through oxidative coupling reactions », Ed. Soil Biol. Biochem, V.26, pp.813–820.
- 25. Saiw-Jimenez, C.,** Senesi, N., Leeum, J.W.(1989), « Evidence of lignin residues in Humic acids isolated from vermicomposts », Ed. J. Anal. Appl. Pyrol, V.15, pp .121-128.
- 26. Tuomela, M.,** Vikman, M., Hatakka, A., Itaara, M., « Biodegradation of lignin in a compost environment: a review », Ed. Bioresource Technol, V.72, (2000), pp.169-183.
- 27. Waksman, S.A.,** «Humus, Origin, Chemical Compositions and Importance in nature», Ed.Baltimore, Williams &WilkinsCo, (1932).
- 28. Nimz, H.**(1974), «Beech lignins: proposal of a constitutional scheme», Ed. Angew. Chem. Int, V.13, (1974), pp. 313-321.
- 29. Chefetz, B.,** Chen, Y., Hadra, Y.(1994), « Purification and Characterization of Laccase from Chaetomium thermophilium and Its Role in Humification », Ed. Appl. Environ. Microb, V.64, (1998), pp.3175-3179. Cloning and sequence analysis of a *Streptomyces* cholesterol esterase gene [M. Nishimura](#) and [M. Sugiyama](#).
- 30. Almendros, G.,** Sanz, J.(1992), «A structural study of alkyl polymers in soil after perborate degradation of humin», Ed.Geoderma, V. 53, pp.79-95.
- 31. Flaig, W.**(1964), « Effects of microorganisms in the transformations of lignin to humic substances », Ed. Geochim, Cosmochem, Acta, V.28, pp.1523-1535.
- 32. Anderson, H.A.,** Bick, W., Hepburn, A., Stewart, M.(1989), « Nitrogen in Humic Substances », Ed. Hayes,M.H.B, MacCarthy,P, Malcolm,R.L, Swift, R.S, Humic Substances, In Search of Structure, Wiley.Interscience, Chichester, pp.223–253.
- 33. Victorndira, D.,**Substances humiques du sol et du composte analyse élémentaire et groupements atomiques fictifs vers une approche thermodynamique, Thèse, Toulouse, France, (2006).
- 34. Berthelin, J.,** Leyval, C., Toutain, F.(1994), « Rôle des organismes dans l'altération et l'humification. In Pédologie », Tome 2, Ed.Paris , pp.143–237.

- 35. Duchaufour.P**, Ehblum, W.(2001), « Introduction à la science du sol, végétation, environnement », 6^{ème} édition.
- 36. Bruckert, S.**, Dommerglje, S.Y.(1966), « Etude expérimentale de la biodégradation de deux complexes organo-ferriques dans un sol à mor et dans un sol à mull », Ed. Sci du sol, V. 2, (1966), pp.65-76.
- 37. Andreux, F.(1995)**, «Propriétés des molécules humiques », Pédologie 2 : Constituants et propriétés du sol, Ed. Masson, pp.109-134.
- 38. Nguyen, K.**, Duchaufour, P.(1969), « Etude comparative de l'évolution de la matière organique du sol en conditions tempérées et tropicales », Ed. Pédologie, Gand, V.19, (1969), pp.49-64.
- 39. Duchaufour, P.**(1970), « Humification et Ecologie », Ed.Cah O.R.S.T.O.M, sér. Pédol, V. 8, pp.382-385.
- 40. Karit, S.**(2003), « Degradation of recalcitrant biopolymers and polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi », Ed. Division of Microbiology Department of Applied Chemistry and Microbiology Viikki Biocenter, University of Helsinki Finland Academic Dissertation in Microbiology, Helsinki.
- 41. Twagiramungu, F.**(2003), « Etude potentiométrique des propriétés acidobasiques de complexation d'acides humiques d'origine différente avec les ions Pb²⁺ et Cu²⁺ », Thèse, Gent.
- 42. Biomed, J. A.**(2005), « Review Humic substances compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine », pp.13-24.
- 43. Moursalou K.**, (2010) Extraction, Caractérisation, Réactivité chimique des Substances Humiques Naturelles avec les Phosphates de Hahotoe-Kpogame et leurs propriétés Photodegradantes.Thèse de Doctorat.
- 44. Sposito, G.**, (1989) The Chemistry of soils, Ed. Oxford University Press, Oxford.
- 45. Andreux, F.**, Jacquin, F., Metche, M.(1970), « Etude de la minéralisation et de l'humification biologique d'autolysats foliaires de Juglans regia », Ed. C.R. Ac. Sci, Paris, V. 270, pp.3017-3020.
- 46. Paul, E.A.**, Campbell, C.A., Rennie, A., Mccallum, K.J.(1964), «Investigations of the dynamics of soil humus utilizing carbon dating techniques », Ed. Gong, Znt. Sci, Sol, 8, Bucarest, V. 3, pp.201-208.
- 47. Grinhut T**, Hadar Y, Chen Y (2007). Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms. Fungi. Biol. Rev.

21: 179–89.

48. Aouabed, A.(2003) Extraction, caractérisation et aptitude à la coagulation-floculation de la matière organique naturelle des eaux du barrage de Keddara (Algérie) Thèse Doctorat d'état.

49. Leenheer, J.L. (1981). Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and waste- waters. Environ. Sci. Technol., 15 : 578-587.

50. Thurman E.M., Malcolm R.L., (1981). Preparative isolation of aquatic humic substances. Environ. Sci. Technol., 15 (14), 463-466

51. MacCarthy, J. F. and B. D. Jimenez. (1985). Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material: Binding and dissociation. Environ. Sci. Technol. 19: 1072-1076.

52. Croue, J.P., (1987). Contribution à l'étude de l'oxydation par le chlore et l'ozone d'acides fulviques naturels extraits d'eaux de surface, Doctorat de l'Université de Poitiers.

53. Visser S.A. (1983). Fluorescence phenomena of humic matter of aquatic origin and microbial cultures. in : Aquatic and terrestrial humic materials, R.F. Christman et E.T. Gjessing, éditeurs. Ann. Harbor Science, Ann Arbor, 9, 538-557.

54. Norwood, D.L. (1988) Critical comparison of structural implications from degradative and nondegradative approaches. In Humic Substances and their Role in the Environment, F.H. Frimmel and R.F. Christman (eds) pp. 133-148, Wiley, Chichester.

55. Thurman, E.M., Aiken, G.R., Ewald, M., Fischer, W.R., Förstner, U., Hack, A.H., Mantoura, R.F.C., Parsons, J.W., Pocklington, R., Stevenson, F.J., Swift, R.S. and Szpakowska, B. (1988). Isolation of soil and aquatic humic substances. Group Report. In Humic Substances and their Role in the Environment, F.H. Frimmel and R.F. Christman (eds) pp. 31-43, Wiley, Chichester.

56. Liao W., Christman R.F., Johnson J.D., Millington D.S., Hass J.R., (1982). Structural characterization of aquatic humic materials. Environ. Sci. Technol., 16: 403-410.
from actinomycetes. Journal of General Microbiology 136, 1251-125.

57. Schulten, H.R., Schinitzer, M.(1997), « Chemical Model Structures for Soil Organic Matter and Soils », Ed. Soil Science, V.162, pp.115-130.

58. Christman F.R., Norwood D.L., Seo Y., Frimmel F.H., (1987). Oxidative degradation of humic substances from freshwater environments. In : Humic substances II : In Search of structure. New York : John Wiley and Sons.

- 59. Johnson** J.D., Christman R.F., Norwood D.L., Millington O.S., (1982). Reaction products of aquatic humic substances with chlorine. *Environ. Health Perspectives*, 46: 63-71.
- 60. Miller** J.W., Uden P.C., (1983). Characterization of non volatile aqueous chlorination products of humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 17:150-157.
- 61. Norwood** D.L., Johnson J.D., Christman R.F., Millington D.S. (1983). Chlorination products from aquatic humic material at neutral pH. In : *Water Chlorination Environmental Impact and Health Effects*, R.L. Jolley Ed. (Ann Arbor Science Publishers), vol. 4,191-200.
- 62. Coleman** W.E., Munch J.N., Kaylor W.H., Streicher R.P., Ringhand H.P., Meier J.R., (1984). Gas chromatography/ Mass spectroscopy analysis of mutagenic extracts of aqueous chlorinated humic acid. A comparison of the byproducts to drinking water contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, 18: 674-681.
- 63. Reckhow** D.A., (1984). Organic halide formation and the use of pre-ozonation and alum coagulation to control organic halide precursors. Ph. D. Thesis, Department of Environmental Sciences and Engineering, Chapel Hill (N.C.).
- 64. Seeger** R., Moore LA., Stevens A.A., (1984). Formation of acidic trace organic byproducts from chlorination of humic acids. In : *Water Chlorination : Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. R.L. Jolley Ed. (Ann Arbor Science Publishers, INC), vol. 5. 859-873.
- 65. De Greef** E., Morris J. C, Vankreijl.F., Morrach.F.H., (1980). Health effects in the chemical oxidation of polluted waters. In : *Water Chlorination : Environmental Impact and Health Effects*, R.L. Jolley Ed. (Ann Arbor Science Publishers), vol. 3, 913-924.
- 66. Kringstad** K.P., Ljungquist P.O., De Sousa F. Stromberg L.M.. (1983). On the formation of mutagens in the chlorination of humic acid. *Environ. Sci. Technol.*, 17: 553-555.
- 67. Kool** H.J., Van Kreijl CF., Hrubec J., (1984). Mutagenic and carcinogenic properties of drinking water. In : *Water Chlorination : Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, R.L. Jolley Ed. (Lewis publishers, INC), vol. 5, 187-228.
- 68. Meier** J.R., Ringhand H.P., Coleman W.E., Munch J.W., Streicher R.P., Kaylor W. H. , Schenck K.M., 1985, Identification of mutagenic compounds formed during chlorination of humic acid. *Mutation Research*, 157:11-112.
- 69. Hemming** J., Holmbom B., Reunanen M., Kronberg L., (1986). Determination of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in chlorinated drinking and humic waters. *Chemosphere*, 15, 549-556.

- 70. Hisano T.**, Hata Y., Fujii T., Liu J.Q., Kurihara T., Esaki N., Soda K. (1996) Crystalstructure of L-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL. An alpha/beta hydrolase structure that is different from the alpha/beta hydrolase fold. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 20322-20330.
- 71. Gourdon, R.**(2002), « Aide à la définition des déchets dits biodégradables, fermentescibles, méthanisables, compostables », Ed. Record, 00-0118/1A.
- 72. Kastner, M.**, Hofrichter, M. (2001), « Biodegradation of humic substances », Ed. Hofrichter and A. Steinbüchel. *Biopolymers, Lignin, Humic Substances and Coal*, Vol. 1, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 349-378.
- 73. Senesi, N.**, Loffredo, E.(2001), « Soil humic substances », Ed. Hofrichter and A.Steinbüchel, *Lignin, Humic Substances and Coal*, V.1, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp.247-299 .
- 74. Adhi, T.P.**, Korus, R. A., Crawford, D.L.(1989), « Production of major extracellular enzymes during lignocellulose degradation by two streptomycetes in agitated submerged culture », Ed. *Appl, Environ, Microbiol*, V.55, pp.1165-1168.
- 75. Gramss, G.**, Ziegenhagen, D., SORGE, S.(1999), « Degradation of soil humic extract by wood- and soil-associated fungi, bacteria, and commercial enzymes », Ed. *Microbial Ecology*, V. 37, pp.140-151.
- 76. Dehorter, B.**, Kontchou, C. Y., Blondeau, R.(1992), « ¹³C-NMR spectroscopic analysis of soil humic acids recovered after incubation with some white rot fungi and actinomycetes », Ed. *Soil Biol, Biochem*, V.24, pp.667-673.
- 77. Dehorter, B.**, Blondeau, R. (1992), « Extracellular enzyme activities during humic acid degradation by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor* », Ed. *FEMS, Microbiol, Lett*, V.94, pp.209-215.
- 78. Ralph, J.P.**, Catcheside, D. E. A.(1994),« Decolorization and depolymerization of solubilized low-rank coal by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* », Ed. *Appl, Microbiol, Biotechnol*, V. 42, pp.536-542.
- 79. Hofrichter, M.**, Fritsche, W. (1997) « Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. II. The ligninolytic enzymes of the coal-humicacid- depolymerizing fungus *Nematoloma frowardii*», Ed. *Appl, Microbiol, Biotechnol*,V. 47,pp.419-424.
- 80. Kastner, M.** (2000), « Humification Process or Formation of Refractory Soil Organic Matter », Ed. Wiley-VCH, *Environmental Processes*, V. 11, pp.89-125.
- 81. Richard, J.F.**(2002), « Caractérisation de substances humiques-like, comparaison avec des substances humiques naturelles », Toulouse.

- 82. Busnot, A.**, Busnot, F., Lequerler, J.F., Yazebeck, J.(1995), « Caractérisation de matériel humique, d'origine terrestre de la région Bas-Normande, *Thermochimica Acta* », V. 254, pp.319-330.
- 83. Mills, C. J.**, Bull, R. J., Cantor, K. P., Reif, J., Hrudey, S. E. et Huston, P. (1998), Workshop report. Health risks of drinking water chlorination by-products: report of an expert working group, *Chronic Dis Can*, 19(3), 91-102.
- 84. Levallois, P.** (1997), Qualité de l'eau potable et trihalométhanes, *Bulletin d'information en santé environnementale*, 8(6), 1-4.
- 85. Cumming, R. B.** et Jolley, R. L. (1993), *Occurrence and exposures to disinfectants and disinfection by-products*, In *Safety of water disinfection : Balancing chemical & microbial risks* (Ed, Gunther F. Craun) ILSI Press, Washington, D.C., pp. 257-275.
- 86. Wright, J. M.**, Schwartz, J., Vartiainen, T., Maki-Paakkanen, J., Altshul, L., Harrington, J. J. et Dockery, D. W. (2002), 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) and mutagenic activity in Massachusetts drinking water, *Environ Health Perspect*, 110(2), 157-164.
- 87. Tremblay, H.** (1999), *La problématique des trihalométhanes pour les réseaux s'alimentant en eau de surface au Québec*, Service de l'assainissement des eaux et du traitement des eaux de municipal, ministère de l'Environnement du Québec, 22 p.
- 88. Milot, J.**, Rodriguez, M. J. et Sérodes, J. B. (2000), Modeling the susceptibility of drinking water utilities to form high concentrations of trihalomethanes, *Journal of Environmental Management*, 60, 155-171.
- 89. Santé Canada** (2000), Sous-produits chlorés de désinfection (SPCD), Accessible à :
- 90. Singer, P. C.** (1993), *Formation and characterization of disinfection by-products*, In *Safety of water disinfection : Balancing chemical & microbial risks* (Ed, Gunther F. Craun) ILSI Press, Washington, D.C., pp. 201-219.
- 91. Laferrière, M.**, Levallois, P. et Gingras, S. (1999), La problématique des trihalométhanes dans les réseaux d'eau potable s'alimentant en eau de surface dans le Bas St-Laurent, *Vecteur Environnement*, 32(3), 38-43.
- 92. Zidane, F.** Cheggari, K. Jean-François Blais , J.F. Khilil, N.(2011), Effet de la chloration sur la formation de trihalométhanes dans les eaux alimentant la ville de Casablanca au Maroc ; *J. Mater. Environ. Sci.* 3 (1) (2012) 99-108.
- 93. Shepherd, J. L.**, Corsi, R. L. et Kemp, J. (1996), Chloroform in indoor air and wastewater: the role of residential washing machines, *Journal of the Air & Waste Management Association*, 46, 631-642.

- 94. Boorman, G. A.** (1999), Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation, *Environ Health Perspect*, 107 Suppl 1, 207-217.
- 95. Shaogang Liu, Zhiliang Zhu, Chenfeng Fan, Yanling Qiu, Jianfu Zhao** (2011) Journal: [Journal of Environmental Sciences-china - J ENVIRON SCI-CHINA](#) , vol. 23, no. 9, pp. 1503-1511.
- 96. King, W. D.** (2001), Epidemiological studies of disinfection by-products and cancer risk, In *Microbial pathogens and disinfection by-products in drinking water: Health effects and management of risks* (Eds, G.F. Craun, Hauchman, F.S. and Robinson, D.E.) ILSI Press, Washington, D.C., pp. 243-254.
- 97. Chater, K. F. (1993).** *Genetics of differentiation in Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol* **47**, 685–713.
- 98. Waksman et Henrici**, 1943 Taxonomic Study of Strains labeled *Streptomyces Albus*.
- 99. Williams S. T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D. I., Kurznetsov V. D., Le Monnier F. J et al.**, (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. *Ressources of Microbiology*. 144: 653-656.
- 100. Stackbrandt E., Geobel B. M.** (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal Systematic of Bacteriology*. 44: 846-9
- 101. Kinoshita T., Yamada K., Hiraiwa N., Kondo M., Nishimura M., Hara Nishimura I** (199). Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stress conditions. *Plant J*. 19, 43–53.
- 102. Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M.J., Natale, D.A., O'Donovan, C., Redaschi, N., Yeh, L.S.,** (2004). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 32, D115–D119.
- 103. Mellouli L., Karray-Rebai .I, Sioud S., Ben Ameer-Mehdi R., Naili B, Bejar S.** (2004). Efficient transformation procedure of a newly isolated *Streptomyces* sp. TN58 strain producing antibacterial activities. *Current Microbiology* 49(6) : 400-406.
- 104. Fourati Ben Fguira L., Fotso S., Ben Ameer Mehdi R., Mellouli L. and Laatsch H.** (2005) Purification and Structure Elucidation of Antifungal and Antibacterial Activities from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. US80 strain. *Research in Microbiology*. 156 (3): 341-347.

- 105. Ben Ameer-Mehdi R., Mellouli L., Chabchoub F., Fotso S. and Bejar S.** (2004) Purification and Structure Elucidation of two Biologically Active Molecules from a new Isolated Streptomyces sp. US24 strain *Chemistry of Natural Compounds*: 40 (5): 510-513.
- 106. Toumatia O., Zitouni A., Driche E.H. & Sabaou N.,** (2010), "Recherche d'actinomycètes des sols sahariens antagonistes et essais de lutte contre les maladies taches chocolat de la féverole et la fusariose du lin", Séminaire National sur la protection des plantes cultivées. Les 25 et 26 mai 2010, Centre Universitaire de Khemis Miliana, Algérie.
- 107. Driche E.H., Badji B., Belghit S., A.Zitouni A., & Sabaou N,** (2011), "Identification of two strain of Streptomyces from Saharan soils, active against multi-resistant Gram-negative bacteria", Communication affichée présentée à « Mediterranean Conference on Natural Products », Tipaza, October 9-10th
- 108. Belghit S., Badji B, Zitouni A. & N.Sabaou,** (2011), "Isolation and identification of Saharan soil Streptomyces producers of bioactive compounds against *Candida albicans*", Communication affichée présentée à « Mediterranean Conference on Natural Products », Tipaza, October 9-10th
- 109. Theilleux J.** (1993). In Levreau J. Y., Bouix M. O. *Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriel.* TEC & DOC-Lavoisier. France. Ch 6 : 425-481.
- 110. Guiraud J. P.** (1998). *Microbiologie alimentaire.* Dunod. France. Partie / B : 79-168.
- 111. Korkmaz H., Unaldi M.N., Aslan B., Coral G., Arican B., Dinçer S. et al.,** (2003). Keratinolytic activity of Streptomyces Strain BA7 a new isolate from Turkey. *Annals of Microbiology*.53: 85-93.
- 112. Kang J. H., Kondo.F.** (2004). Streptomyces sp strain isolated from river water has high bisphenol A degradability. *Letters in Applied Microbiology*. 39: 178-180.
- 113. Oulmi L.** (2004). Identification d'actinomycétales isolés des eaux et de sol de sebkha. Optimisation des milieu de culture de sporulation et de croissance. Mémoire de Magistère en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. 84p.
- 114. Kitouni M.** (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de

Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie.

115. Jaradat Z., Dwagreh A., Ababneh Q., Saadoun I. (2008). Influence of culture condition on cellulose production by *Streptomyces* sp (Strain J2). *Biological Sciences*. 1: 141-164.

116. Hernandez A., Lopez J. G., Arenas M., Santamaria R., Diaz M., Fernandez J. M et al., (2008). Xylan-binding xylanase Xyl 230 from *Streptomyces avermitilis* cloning characterization and overproduction in solid state fermentation. *International Microbiology*. 11: 133-141.

117. Khan M. R., Saha M. L., Zuha S. B. (2008). Bacteria and actinomycetes growing on floppy and compact discs under ambient conditions. *Bangladesh Journal of antibiotics*. 37: 7-14.

118. Zerman F. (2008). Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliqués dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse. Mémoire de Magistère en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. 126p.

119. Mane U.V., Deshmukh A.M. (2009). Chitin degrading potential of three aquatic actinomycetes and its optimization. *African Journal of Biotechnology*. 23: 6617-6620.

120. Aboul-Enein A., About elalla F., Serour E., Hussien T. (2010). *International Journal of Academic Research*. 2: 81-85.

121. Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., Lumyong S. (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp isolated from some Thai medicinal plant rhizospheres soil. *EurAsian Journal of BioSciences*. 4: 23-32.

122. Merrouche, R. Bouras, N. Coppel, Y. Mathieu, F. Monje, M.C. Sabaou, N. Lebrihi, A. (2010), "Dithiopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*", *Journal of Natural Products*, 73, 1164-1166. [URL : http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np900808u](http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np900808u)

123. Aouiche, A. Sabaou, N. Meklat, A. Zitouni, A. Mathieu, F. Lebrihi, A. (2011), Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. *Journal de mycologie médicale*.

124. Sanasam S., Ningthoujam D.S. (2010). Screening of local actinomycete isolated in manipur for anticandidal activity. *Asian Journal of Biotechnology*. 2: 139-145.

125. Lakshmipathy D.T., Krishnan K. (2009). A report on the antidermatophytic activity of Actinomycetes. *International Journal of Integrative Biology*. 6: 132-136.

- 126. Jinenez J. T., Sturdikova M., Sturdik E.** 2009. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta chimica Slovaca*. 2: 63-74.
- 127. Liu S., Liu S. Y., Lu Z. X.** 2007. Antibacterial activity and property of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp GB-2. *Chinese Journal of Biotechnology*. 23: 1077-1081.
- 128. Inoue O., Netto W., S., Padilla G., Facciotti M.C.R.** (2007). Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 58-61.
- 129. Fukunaga K., Misatot T., Asakawa M.** (2008) Blastocidin, A new Anti-Phytopathogenic Fungal Substance. Part I. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*. 19: 181-188.
- 130. Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S.** (2001). Isolation In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3739-3745.
- 131. Carle S., Pharm B.** (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*. 36: 25-41.
- 132. Omura S., Iwai Y., Takahashi Y., Sadakane N., Nakagawa A., Oiwa H et al.,** 2006. Herbimycine, a new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. *The journal of Antibiotics*. 32: 255-261.
- 133. Dierckx S. and Dewettinck K.** (2002). Seed gums. In *Biopolymers. Polysaccharides II*. Eds : Vandamme E.J., De Baets S., Steinbüchel A. Weinheim, Germany. 6, 321–343.
- 134. Ralet M.C., Bonnin E. and Thibault J.F.** (2002). Pectins. In: *Biopolymers. Polysaccharides II*. Eds : Vandamme E.J., De Baets S., Steinbüchel A. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- 135. Chandra R. and Rustgi R.** (1998). Biodegradable polymers, *Prog. Polym. Sci.* 23, 1273–335.
- 136. Kimura N. and Urushigawa Y.** (2001). Metabolism of dibenzo-p-dioxin and chlorinated dibenzop-dioxin by a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO 101. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 138-143.
- 137. Lin T.C., Young C.C., Ho M.J., Yeh M.S., Chou C.L., Wei YH. and Chang JS.** (2005). Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates. *J. Biosci. Bioengin.* 99, 466-472.

- 138. Cerniglia C.E. (1992).** Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biodegradation*. **3**, 351-368.
- 139. Pelmont J. (1993).** Bactéries et environnement - Adaptations physiologiques. *Presses Universitaires de Grenoble*. 899.
- 140. Bossert I. D. and Kosson D.S. (1997).** Methods for Measuring Hydrocarbon Biodegradation in Soils. In *Manual of Environmental Microbiology*. Eds : Hurst C.J. *et al.* ASM Press, 1997.
- 141 Nishino S.F. and Spain J.C. (1997).** Biodegradation and Transformation of Nitroaromatic Compounds. In : *Manual of Environmental Microbiology*. Eds : Hurst, C.J. *et al.* ASM Press.
- 142. Focht D.D. (1997).** Aerobic Biotransformation of Polychlorinated Biphenyls. In *Manual of Environmental Microbiology*. Eds : Hurst, C.J., *et al.* ASM Press.
- 143. Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., and Hopwood, D.A. (2002)** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- 144. Rivard Marie-Eve (2010)** Peroxydase lave plus blanc que blanc : introduction présentée à Pierre Pichet pour le cours Chimie 1515 (France).
- 145. NC-IUBMB (1992)** Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.. Recommendations et nomenclatures des enzymes, corrections et additions supplémentaires.
- 146. Lamb C, (1997)** Dixon RA. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*; **48**:251-75.
- 147. Davies MJ, Hawkins CL, Pattison DI, Rees MD. (2008),** Mammalian heme peroxidases: From molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*; **10**:1199-234.
- 148. Koua D, Cerutti L, Falquet L, Sigrist CJ, Theiler G, Hulo N, Dunand C. (2009)** PeroxiBase: A database with new tools for peroxidase family classification. *Nucleic Acids Res*; **37**:D261-266.
- 149. Welinder KG, Mauro JM, Norskov-Lauritsen L.** Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochem Soc Transact* **1992**; **20**:337-40.

- 150. Passardi F**, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, Teixeira F, Margis-Pinheiro M, Ioannidis V, Penel C, Falquet L, Dunand C. PeroxiBase:(2007) The peroxidase database. *Phytochemistry*; 68:1605-11.
- 151. Kjalke M**, Andersen MB, Schneider P, Christensen B, Schulein M, Welinder KG.(1992) Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Arthromyces ramosus*. *Biochim Biophys Acta*; 1120:248-56.
- 152. Targovnik AM**, Romero LV, Wolman FJ, Cascone O, Miranda MV.(2010) Horseradish peroxidase production from *Spodoptera frugiperda* larvae: A simple and inexpensive method. *Process Biochem* 45:835-40.
- 153. Ahariz, M.** (2012) Peroxidases regulation of *Candida albicans* oral biofilms/ Effet régulateur des peroxydases sur les biofilms oraux à *Candida albicans*. Thèse de doctorat (France)
- 154. Wong H**, Su JQ, Zheng X.W, Tian Y, Xiong XJ, Zheng TL (2009). Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red 180 by *Citrobacter* sp. CK3, *Int Biodet. Biodegrad.* doi:10.1016/j.ibiod.2008.11.006. In press
- 155. Dahan A**, Duhamel C, Bonnet H, Sarrut B (2001) Perchlorate de potassium et pathologies thyroïdiennes. *Dossier XXII*, 3. 34.
- 156. Morel, Carol** .(2007) Etude de larégulation de la sulfhydryl oxydase QSOX1 et de son implication dans l'apoptose induite par les stress oxydants. Thèse de doctorat ;Université de Franche comté.
- 157. Amthorf.R** , Jaksonc.A (1986) Staining of retinal neurons in the isolated eyecup by extracellular horseradish peroxidase injection. *Univ. Alabama, dep. psychology, Birmingham AL 35294, ETATS-UNIS.* vol. 26, no2, pp. 269-274 (9 ref.)
- 158. Baaziz, M.**, Mokhlisse, N., Bendiab, K., Koulla, L., Hadadou, H. and Majourhat, K. (1996). Peroxidases ias markers in date palm culture in: Obinger, C., Burner, U., Ebramann, R., Penel, C. and Gerppin, H. (editors) *Plant peroxidase, biochemistry and physiology. International Symposium. Universities of Vienna and Geneva.* 243-246.
- 159. Henriksen, A.**, Welinder, K. G., and Gajhede, M. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 2241–2248
- 160. Bennett, P.M.**, Grinsted, J. and Richmond, M.H. (1977) *Mol.Gen.Genet.*, 154, 205-211

- 161. Choinowski, T.** Blodig, W. Winterhalter, KH and Piontek, K J. (1999) *Mol. Biol.* **286**, 809, in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10024453>.
- 162. Wertz Jean-Luc** (2010) *La lignine Document ValBiom – Gembloux AgroBioTech*
- 163. Piontek, K,** Smith, A.T and Blodig, W. (2001) *Biochem. Soc. Trans* **29**, 111, in <http://www.biochemsoctrans.org/bst/029/0111/bst0290111.htm>
- 164. Dashtban, M.,** Schraft, H., SYED, T.A., and QIN, W. (2010), *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **1**, 36, in <http://www.ijbmb.org/files/IJBMB1004005.pdf>
- 165. Perez-boada, M.** F.J. Ruiz-duenas, R. Pogni, R. Basosi, T. Choinowski, M.J. Martinez, K. Piontek and A.T. Martinez, (2005) *J. Mol. Biol.* **354**, 385.
- 166. Senoussi M** (1992). Contribution à l'étude de quelques sols de la Mitidja, évolution de la matière organique. Thèse. Magister, E.N.S. Algérie. p. 150.
- 167. Badis, A.,** Ferradji, F.Z., Boucherit, A., Fodil, D., Boutoumi, H., 2009. Characterization and biodegradation of soil humic acids and preliminary identification of decolorizing actinomycetes at Mitidja plain soils (Algeria). *Afr. J. Microbiol. Res.* **3**, 997–1007.
- 168. Badis, A.,** Ferradji, F.Z., Boucherit, A., Fodil, D., Boutoumi, H., 2010. Removal of natural humic acids by decolorizing actinomycetes isolated from different soils (Algeria) for application in water purification. *Desalination* **259**, 216–222.
- 169. Fukushima M,** Tatsumi K, Morimoto K (2000). Influence of iron (III) and humic acid on the photodegradation of pentachlorophenol. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**: 1711–16.
- 170. Lopez MJ,** Vargas-García MC, Suárez-Estrella F, Moreno J (2006). Biodelignification and humification of horticultural plant residues by fungi. *Int. Biodet. Biodegrad.* **57**: 24–30.
- 171. Bertrand, D.** (1992), Clotaire, Y.K., Blondeau, R., « ¹³C NMR spectroscopic of soil humic acid recovered after incubation with some white rot fungi and actinomycetes », Ed. *Soil, Biol, Biochem*, V.24, pp.667-673.
- 172. Hayes-Micheal, H.B.,** « Solvent Systems for the Isolation of Organic Components from Soils », (2006).
- 173. Vusumzi, M.,** « Methods for the production of humic acids from black liquor », Ed. Stellenbosch, (2006).

- 174. Richard, J.F.**(2002), « Caractérisation de substances humiques-like, comparaison avec des substances humiques naturelles », Toulouse.
- 175. Eberhart, J.P.** (1976), « Méthodes physiques d'étude des minéraux et des matériaux Staneck JL, Roberts GD (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 28: 226–31.
- 176. Blondeau, R.**(1988), « Évolution des acides humiques soumis à l'activité d'une microflore bactérienne hétérotrophe », Ed. Sci-Sol, V.26, (1988), pp.41-50.
- 177. Shirling EB,** Gottlieb D (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313–40.
- 178. Nonomura H,** Williams ST, Sharpe ME, Baltimore MD, Holt JG (1989). Genus *Streptosporangium* Couch. In: (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins Co., 4 : 2545–2551. Panikov ;
- 179. Becker, B.,** M. P. Lechevalier, R. E. Gordon & H. A. Lechevalier (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, 12: 421-423
- 180. LECHEVALIER,** H. A. & LECHEVALIER, M. P. (1970). A critical evaluation of the genera of aerobic actino- mycetes. In *The Actinomycetales*, pp. 393-405. Edited by H. Prauser. Jena: Gustav Fischer.
- 181. Sambrook, J.,** Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2nd edn: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- 182. Altschul S. F.,** Madden T.L., Schäffer A. A., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402.
- 183. Benson D. A.,** Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Rapp B. A. and Wheeler D. L. (2000). GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 28:15-18.
- 184. Antonopoulos VT,** Rob A, Ball AS, Wilson MT.(2001) Dechlorination of chlorophenols using extracellular peroxidases produced by *Streptomyces albus* ATCC 3005. *Enzyme Microb Technol* ; 29:62-9.
- 185. Putter J,** Becker R.(1983) Peroxidases, in *Methods of Enzymatic Analysis*, vol III, Enzymes I Oxidoreductases, Transferases (Bergmeyer, H U, ed.), Verlag-Chemie, Weinheim, pp 286-93.

- 186. Tien M**, Kirk TK. Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic cycle of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2280-4.
- 187. Paszczyński A**, Crawford RL, Huynh VB (1988). Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Purification. In: *Meth. Enzymol.* (Wood, W.A. and Kellogg, S.T. eds.) 161, Academic Press, NY, pp 264 -70. 1988.
- 188. Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- 189. Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- 190. Hunkapiller, M. W.** and Hood, L. E. (1978). Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a nonprotein carrier (polybrene), and high pressure liquid chromatography. *Biochemistry* **17**, 2124-33.
- 191. Hewick, R. M.**, Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. and Dreyer, W. J. (1981). A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J Biol Chem* **256**, 7990-7.
- 192. Edwin V.B.**, Daniel E.T., Remko T.W., Marco W.F.,(2010) "A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily," *Applied Microbiology and Biotechnology*; Vol. 86: 1419-1430.
- 193. Nicell JA**,(1997) Wright H. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme Microb Technol*; **21**:302-10. amphotericin-producing bacterium *Streptomyces nodosus*. *J. Microbiol. Methods* **55**, 273 – 277
- 194. Yumoto I**, Ichihashi D, Iwata H, Istokovics A, Ichise N, Matsuyama H, Okuyama H, Kawasaki K. Purification and characterization of a catalase from the facultatively psychrophilic bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1(T) exhibiting high catalase activity. *J Bacteriol* 2000;182:1903-9.
- 195. Swift, R.S.**, « Organic matter characterization », *Analysis, Part 3: Chemical methods*, SSSA Book Series No. 5. SSSA and ASA, Madison, WI, (1996), pp. 1011-1069.
- 196. Berry EA**,(1987) Trumpower BL. Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem*; **161**:1-15.
- 197. van Hellemond EW**, Janssen DB, Fraaije MW.(2007) Discovery of a novel styrene monooxygenase originating from the metagenome. *Appl Environ Microbiol*;73:5832-9.

- 198. Torres Pazmino DE**, Baas BJ, Janssen DB, Fraaije MW. Kinetic mechanism of phenylacetone monooxygenase from *Thermobifida fusca*. *Biochemistry* 2008;47:4082-93
- 199. Chen, Y.**, Senesi, N., Schnitzer, M., «Information provided on humic substances by E4/E6 ratios », Ed. *Soil Sci, Soc*, V.41, (1970), pp.353-358.
- 200. Schnitzer, M. (1982)**, « Organic matter characterization », Ed. *Methods of Soil Analysis*, American Society of Agronomy, Madison, WI.
- 201. Schnitzer, M.**(1990), «Selected Methods for characterization of soil Humic Substances », Ed. *Humic Substances in Soil and Crop Science: Selected Readings*, Madison, Wisconsin, USA, pp. 65-89.
- 202. Lucas, N.**(2007), « Etude et mise au point d'une nouvelle méthode d'évolution de la bioassimilation: utilisation des isotopes stables du carbone pur le marquage de la biomasse microbiennes », These de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- 203. Ki.Hoon, K.**, Hyun, S.S., Heekyung, A.(2002), «Characterization of humic substances present in landfill leachates with different landfill ages and dits implications», *Water research*, V. 36, pp. 4023-4032.
- 204. Hyum, C.**, Myong, J.,(2007) « Characterization of aquatic substances to DBPs formation in advanced treatment processes for conventionally treated water », Ed. *Journal of Hazardous Materials*, V.143, pp.486-493.
- 205. Schnitzer, M.** et Khan, S.U.(1972), « Humic Substances in the Environment », Ed. Marcel Dekker, Inc, New York.
- 206. Amir, S.**, Hafidi, M., Merlinab,G., Hamd, H., Eveleb, J.G.(2004), «Elemental analysis, FTIR, 13C-NMR of humic acids from sewage sludge composting » ,Ed. Marrakech, Maroc.
- 207. Lingbo, L.**, Song, Y.(2005), Guangbo, S., « Comprehensive characterization of soil refinery effluent derived humic substances using various spectroscopic approaches », *Chemosphere*, pp.467-476.
- 208. Syhvie, B.**, « Rapport de stage de Claudia NAG Amoultou, Traitement thermiques et caractérisations physico chimiques de matériaux carbonés », Ed. Centre de recherche sur la matière dévisée, (2006), pp.34.
- 209. Remunni, A.**, Scialdone, R., Fellaca, D.(1987), « Decomposition of humic acids by incubation in a soil water extract under various condition of oxygene availability », Ed. *Plant; soil*, V. 97, pp.15-23.

- 210. Saikat, G.**(2006), Seunghun, K., Prasanta, C.B., Baoshan, X., « Adsorption of Humic Acid on Minerals as Examined by FTIR, NMR, and Elemental Analysis », Ed. Univ of Massachusetts, Stockbridge Hall, Amherst.
- 211. Eyeraguibel, B.**(2004), « Caractérisation des substances humiques biomimétiques-effets sur les végétaux », Thèse, Toulouse.
- 212. Panikov N.S,** Abu El-Naga S.A, Zvyagintsev D.G,(1982) Kinetics of glucose decomposition
- 213. Dari, K.,** Béchet, M., Blondeau, R.(1995), « Isolation of soil Streptomyces strains capable of degrading humic acids and analysis of peroxidase activity », Ed. FEMS Microbiology Ecology, V.16, pp.115-122.
- 214. Hayakawa, M.,** Nonomura, H.(1987), « Humic acid vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycete », Ed. J.Ferment, Technol, V. 65, pp.69-76.
- 215. Murata M,** Terasawa,N., Homma,S., (1992) Screening of microorganisms to decolorize a model melanoidin, Biosci. Biotechnol. Biochem. 56 (1992) 1182–1187.
- 216. Vukovic M,** Domanovac T, Briski F (2008). Removal of humic substances by biosorption. J. Environ. Sci. 20: 1423–1428.
- 217. Sabaou,N.** Hacène,H. Bennadji,A. Bennadji,H. Bounaga,N. (1992)Description quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne, Can. J. Microb. 38 1066–1073.
- 218. An SY,** Min SK, Cha IH, Choi YL, Cho, YS, Kim, CH, Lee YC (2002). Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by Citrobacter sp. Biotechnol. Lett. 24: 1037–40
- 219. Rezacova V,** Hrselova H, Gryndlerova H, Miksik I, Gryndler M (2006). Modifications of degradation-resistant soil organic matter by soil saprobic microfungi. Soil Biol. Biochem. 38: 2292–99.
- 220. Asad S,** Amoozegar MA, Pourbabae AA, Sarbolouki MN, Dastgheib SMM (2007). Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. Biores. Technol. 98: 2082–88.
- 221. Fan L,** Zhu S, Liu D, Ni J (2009). Decolorization of 1-amino-4-bromoanthraquinone-2-sulfonic acid by a newly isolated strain of Sphingomonas herbicidovorans. Int Biodet Biodeg. 63: 88-92

- 222. Filip F**, Tesarova M (2004). Microbial degradation and transformation of humic acids from permanent meadow and forest soils. *Int. Biodet. Biodegrad.* 54: 225–231
- 223. Liang Z**, Liu JX, Li J (2008). Decomposition and mineralization of aquatic humic substances (AHS) in treating landfill leachate using the Anammox process. doi:10.1016/j.chemosphere.11: 73
- 224. Yanagi Y**, Yoda K, Ogura K, Fujitake N (2008). Population of humic acid degrading microorganisms in andosols under different vegetation types and grassland management regimens. *Microb. Environ.* 23: 44–48.
- 225. Ramachandra M**, Crawford DL, Hertel G (1988) Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:3057-63.
- 226. Burke NS**, Crawford DL.(1998) Use of azo dye ligand chromatography for the partial purification of a novel extracellular peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A. *Appl Microbiol Biotechnol*; 49:523-30.
- 227. Watson IN**, Watson LM, Murray PA, Lige B, van Huystee RB, McManus MT. Identification of two further cationic peroxidase isoenzymes secreted by peanut cells (*Arachis hypogaea* L.) in suspension culture. *Plant Physiol Biochem* 1998;36:591-9.
- 228. Boer CG**, Obici L, de Souza CGM, Peralta RM. (2006) Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. *Process Biochem* 41:1203-7.
- 229. Yousefi, V.**, Kariminia, H.-R., 2010. Statistical analysis 621 for enzymatic decolorization of acid 622 orange 7 by *Coprinus cinereus* peroxidase. *International Biodeterioration and 623 Biodegradation* 64, 245-252.
- 230. Schomberg D**, Salzmann M, Stephan D. editors. *Enzyme Handbook 7*, EC 1.11.1.7: 1-6. 1993.
- 231. Choi, D. H.**, Kim, H. M., Noh, J.-H. & Cho, B. C. (2007). *Nocardioides marinus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 775–779
- 232. Handy DE**, Zhang Y, Loscalzo J.(2005) Homocysteine down-regulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. *J Biol Chem* 2005;280:15518-25.
- 233. Abuknesha RA**, Jeganathan F, Wu J, Baalawy Z (2009) Labeling of biotin antibodies with horseradish peroxidase using cyanuric chloride. *Nature protocols*; 4:452-60.

- 234. Spiker JK**, Crawford DL, Thiel EC,(1992). Oxidation of phenolic and non-phenolic substrates by the lignin peroxidase of *Streptomyces viridosporus* T7A. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992;37:518-23.
- 235. Ikehata K**, Buchanan ID, Pickard MA, Smith DW. (2005) Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenol treatment. *Bioresour Technol* ;96:1758-70.
- 236. Sturm A**, Schierhorn A, Lindenstrauss U, Lillie H, Bruser T. YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. *J Biol Chem* 2006;281:13972-78
- 237. Zubieta C**, Joseph R, Krishna SS, McMullan D, Kapoor M, Axelrod HL, Miller MD, Abdubek P, Acosta C, Astakhova T, Carlton D, Chiu HJ, Clayton T, Deller MC, Duan L, Elias Y, Elsliger MA, Feuerhelm J, Grzechnik SK, Hale J, Han GW, Jaroszewski L, Jin KK, Klock HE, Knuth MW, Kozbial P, Kumar A, Marciano D, Morse AT, Murphy KD, Nigoghossian E, Okach L, Oommachen S, Reyes R, Rife CL, Schimmel P, Trout CV, van den Bedem H, Weekes D, White A, Xu Q, Hodgson KO, Wooley J, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Wilson IA (2007). Identification and structural characterization of heme binding in a novel dye-decolorizing peroxidase, TyrA. *Proteins* ;69:234-43.
- 238. van Bloois E**, Torres Pazmino DE, Winter RT, Fraaije MW. (2010) A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily. *Appl Microbiol Biotechnol*; 86:1419-30.
- 239. Veitch NC**. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 2004;65:249-59.
- 240. Antipov E**, Cho AE, Wittrup KD, Klivanov AM. Highly L and D(2008) enantioselective variants of horseradish peroxidase discovered by an ultrahigh-throughput selection method. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;105:17694-9.
- 241. Khattabi, D.**, Blondeau Roland(1994), Activités cataboliques de *Streptomyces* sp sur des préparations d'acides humiques naturels ou de synthèse. Université de Lille 1, Villeneuve-d'Ascq, FRANCE
- 242. Gottschalk LM**, Bon EP, Nobrega R.(2008) Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: Enzyme concentration using ultrafiltration. *Appl Biochem Biotechnol* ;147:23-32.
- 243. Zabin K**. Bagewadi, Amitkumar G. Vernekar, Aishwarya Y. Patil, Abhijit A.Limaye, Vandana M. Jain (2011) Biodegradation of industrially important textile dyes by actinomycetes isolated from activated sludge. Article, *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.* 2011, 1(3):351-360

- 244. Hofrichter, M**, Scheibner K, Schneegass I, Ziegenhagen D, Fritsche W (1998). Mineralization of synthetic humic substances by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl. Microb. Biotechnol.* 49: 584–588
- 245. Ziegenhagen D**, Hofrichter M (1999). Degradation of humic acids by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Clitocybula dussenii*. *J. Basic Microbiol.* 38: 289–29.
- 246. De Nobili M**, Chen Y (1999). Size exclusion chromatography of humic substances: Limits, perspectives and prospectives. *Soil Sc.* 164: 825–33.
- 247. Steffen KT**, Hatakka A, Hofrichter M (2002). Degradation of humic acids by the litter-decomposing basidiomycete *Collybia dryophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3442–3448.
- 248. Sugano Y.** (2009) DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell Mol Life Sci* ;66:1387-03.
- 249. Cartron ML**, Mitchell SA, Woodhall MR, Andrews SC, Watson KA.(2007), Preliminary X-ray diffraction analysis of YcdB from *Escherichia coli*: A novel haem-containing and Tat-secreted periplasmic protein with a potential role in iron transport. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*; 63:37-41.
- 250. Zubieta C**, Krishna SS, Kapoor M, Kozbial P, McMullan D, Axelrod HL, Miller MD, Abdubek P, Ambing E, Astakhova T, Carlton D, Chiu HJ, Clayton T, Deller MC, Duan L, Elsliger MA, Feuerhelm J, Grzechnik SK, Hale J, Hampton E, Han GW, Jaroszewski L, Jin KK, Klock HE, Knuth MW, Kumar A, Marciano D, Morse AT, Nigoghossian E, Okach L, Oommachen S, Reyes R, Rife CL, Schimmel P, van den Bedem H, Weekes D, White A, Xu Q, Hodgson KO, Wooley J, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Wilson IA. Crystal structures of two novel dye-decolorizing peroxidases reveal a beta-barrel fold with a conserved heme-binding motif. *Proteins* 2007;69:223-33.
- 251. Tuncer M**, Kuru A, Isikli M, Sahin N, Celenk FG. Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F2621 isolated in Turkey. *J Appl Microbiol* 2004;97:783-91.
- 252. Mliki A**, Zimmermann W.(1992) Purification and characterization of an intracellular peroxidase from *Streptomyces cyaneus*. *Appl Environ Microbiol*; 58:916-9.
- 253. Ball AS**, Trigo C.(1995) Characterization of a novel non-haem-containing extracellular peroxidase from *Thermomonospora fusca*. *Biochem Soc Transact*; 23:272-6.

- 254. Ortiz de Orue Lucana D, Schaa T, Schrempf H.**(2004) The novel extracellular *Streptomyces reticuli* haem-binding protein HbpS influences the production of the catalase-peroxidase CpeB. *Microbiology*; 150:2575-85.
- 255. Rob A, Ball AS, Tuncer M, Wilson MT** (1997). The detection and quantification of novel non-haem extracellular glycosylated peroxidases produced by the thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25 by means of PAGE-zymogram. *Biochem Soc Transact*; 25:37S.
- 256. Gottschalk LM, Nobrega R, Bon EP**(2003). Effect of aeration on lignin peroxidase production by *Streptomyces viridosporus* T7A. *Appl Biochem Biotechnol*; 105 -108:799-07.
- 257. Gottschalk LM, Bon EP, Nobrega R.**(2008) Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: Enzyme concentration using ultrafiltration. *Appl Biochem Biotechnol* ;147:23-32.

Annexe 1

Milieux de culture

| ISP 2 |
|-----------------------|
| Extrait de levure 4 g |
| Extrait de malt 10 g |
| Glucose 4 g |
| Eau distillée 1000 ml |
| Agar 20 g |
| pH = 7,3 |
| Extrait de levure 4 g |

| ISP 3 |
|-------------------------------|
| Solution d'avoine 1000ml |
| Solution d'oligo-éléments 1ml |
| Agar 20g |
| pH = 7,2 |
| Solution d'avoine 1000ml |
| Solution d'oligo-éléments 1ml |
| Agar 20g |

| ISP 4 |
|---|
| Amidon soluble 10 g |
| K ₂ HPO ₄ 1 g |
| MgSO ₄ 7H ₂ O 1 g |
| NaCl 1 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g |
| CaCO ₃ 2 g |
| Solution d'oligo-éléments 1 ml |
| Eau distillée 1000 ml |
| Agar 20 g |
| pH = 7,0-7,4 |

| ISP 5 |
|--------------------------------|
| Glycérol 10 g |
| L-Asparagine 1 g |
| Solution d'oligo-éléments 1 ml |
| Eau distillée 1000 ml |
| Agar 20 g |
| pH = 7,0-7,4 |

| Milieu HA-Agar : (g/L) |
|---|
| AH : 2.5 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O: 0.5 |
| FeSO ₄ 7H ₂ O: 0.01 |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O: 0.01 |
| H ₂ O: 1000 mL |

Annexe 2

Principe de fonctionnement

Cette galerie de 20 microcuvettes permet d'étudier 19 activités enzymatiques de manière semi-quantitative.



Figure : Galerie API ZYM® (d'après <http://www.didier-pol.net>)

Toutes les étapes de l'identification sont manuelles. Un inoculum de densité optique de cinq à six de l'échelle de McFarland est requis, ce qui peut être difficile à obtenir pour les bactéries de croissance difficile.

La lecture nécessite l'addition préalable de réactifs. L'utilisateur attribue une note à chaque réaction selon l'intensité. La galerie doit être incubée pendant quatre heures à 37°C.

La lecture nécessite l'addition préalable de réactifs. L'utilisateur attribue une note à chaque réaction selon l'intensité de la couleur observée dans les microcuvettes, à l'aide d'une échelle de lecture (figure 29). Les colorations restent stables plusieurs heures mais moins de 24 heures.

La lecture présente donc l'avantage de pouvoir être différée. Les réactions sont faciles à interpréter et le système est reproductible.

Le système API ZYM ne possède pas de base de données ; les résultats sont interprétés en fonction des données de la littérature.

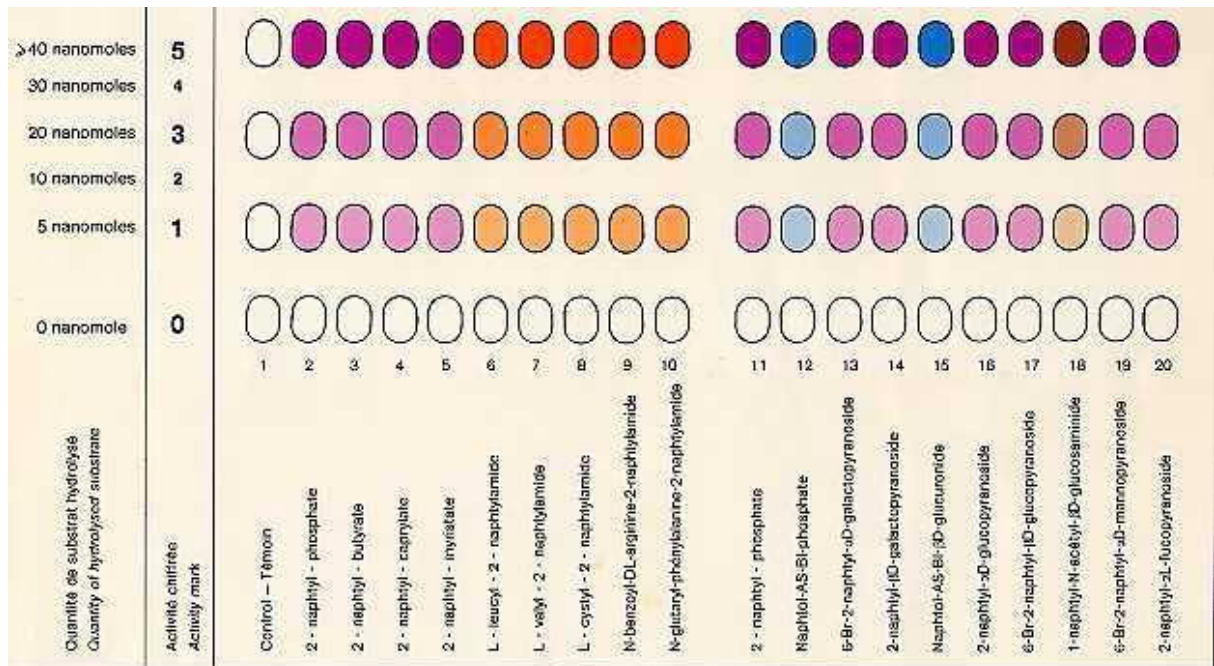


Figure : Echelle de lecture aidant à l'interprétation de la galerie API ZYM®

(d'après <http://www.didier-pol.net>)

II.6.4.4. Galerie API 50CH

API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes.

La galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif.

Annexe 3

II.7.1. Principe d'utilisation de l'ARN 16S

En 1983, Kimura a émis le concept d'horloge "évolutionnaire" : la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement de conséquences phénotypiques, mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre généalogique (phylogénique) en utilisant des méthodes mathématiques et en respectant quelques règles.

Le principe de base consiste à comparer des gènes homologues c'est à dire descendant d'un ancêtre commun et ayant conservé une fonction identique au cours du temps. Le choix des séquences à comparer a posé un problème car il était difficile de trouver une molécule qui soit présente et homologue chez tous les organismes et qui présente des niveaux successifs d'information. En effet, pour comparer des organismes très éloignés il faut utiliser des séquences qui restent sensiblement conservées durant des centaines de millions d'années, tandis que la comparaison d'organismes proches requiert l'étude de séquences où des mutations se seront accumulées en quelques millions d'années.

Le séquençage des ARN 16S peut-être automatisé et les données concernant ces molécules s'accroissent en permanence. L'utilité du séquençage des ARN 16S est reconnue par tous les taxonomistes mais, comme cette technique n'analyse qu'une faible partie du génome, elle ne permet pas de différencier les espèces proches les unes des autres. En revanche le séquençage des ARN 16S est très utile pour classer les bactéries dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce.

Annexe 4

2. Souches d' *Escherichia coli* utilisées dans l'étude Biotechnologique de la souche AM2

Nous avons utilisé pour cette étude trois souches de *Escherichia coli* (DH5 α , Top 10 et ER2566), dont les génotypes sont les suivants:

➤ **DH5 α** : F⁻ *supE44* Φ 80 δ *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17* (*r_k⁻, m_k⁺*) *deoR thi-1 λ ⁻ gyrA96 relA1*.

➤ **Top 10**: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr- hsdRMS- mcrBC*) Φ 80 *lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*araleu*) 7697 *galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*.

Ces deux souches portent le gène *lacZ* Δ M15 qui permet l' α -complémentation, permettant ainsi la sélection des colonies recombinante par criblage phénotypique bleu/blanc, sur milieu contenant du 5 bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-gal) et d'isopropyl--D-thiogalactopyranoside (IPTG).

➤ **ER2566**: F⁻ λ ⁻ *fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11* Δ (*mcrC-mrr*) 114 :IS10 R(*mcr-73::miniTn10*)2 R(*zgb-210:Tn10*) (*TetS*) *endA1[dcM]*.

Cette souche porte une copie chromosomique du gène d'une ARN polymérase bactérienne (l'ARN polymérase du phage T7) et a été utilisée comme hôte pour la surexpression de l'activité peroxydase sous le contrôle du P T7. En présence d'IPTG, cette enzyme va être également exprimée et augmenter considérablement la quantité d'ARN messager produit.

3. Vecteurs de clonage

➤ **pCR-Blunt** (3512 pb) : Ce plasmide porte le gène *lacZ* β codant pour la β -galactosidase, permettant l' α -complémentation et donc la sélection des clones par criblage bleu/blanc. Il est également porteur des gènes de résistance à la kanamycine et à la zéocine, deux marqueurs de sélection, permettant ainsi une sélection positive des plasmides recombinants. Le gène létal *ccdB* (« control of cell death ») est incorporé dans le **site multiple de clonage** ou (« polylinker ») du vecteur et est fusionné au fragment *lacZ* α . Comme l'expression de la protéine CcdB est toxique, le vecteur pCR-Blunt empêche la croissance des bactéries à

moins que l'expression de la protéine de fusion LacZ α -CcdB ne soit interrompue du fait de l'insertion d'une séquence d'ADN en son sein.

➤ **pCR2.1** (3900 pb) : Ce vecteur porte, également, un gène lacZ et deux gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. Il contient une désoxy-Thymidine (dTTP) à chaque extrémité 3' et permet ainsi le clonage des fragments amplifiés par l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (Taq[®]) qui génère des produits PCR portant une seule désoxy-Adénine (dATP) à chaque extrémité 3'. Les fragments générés par l'ADN polymérase de *Pyrococcus furiosus* (Pfu, Appligene) peuvent également être clonés dans ce vecteur après ajout par PCR de dATP. Enfin, il permet l'utilisation des amorces universelles et inverses M13 ainsi que les amorces T3 et T7 s'hybridant de part et d'autre du site de clonage, permettant le séquençage de la séquence insérée.

Les cartes de restriction de ces deux vecteurs sont représentées ci-dessous

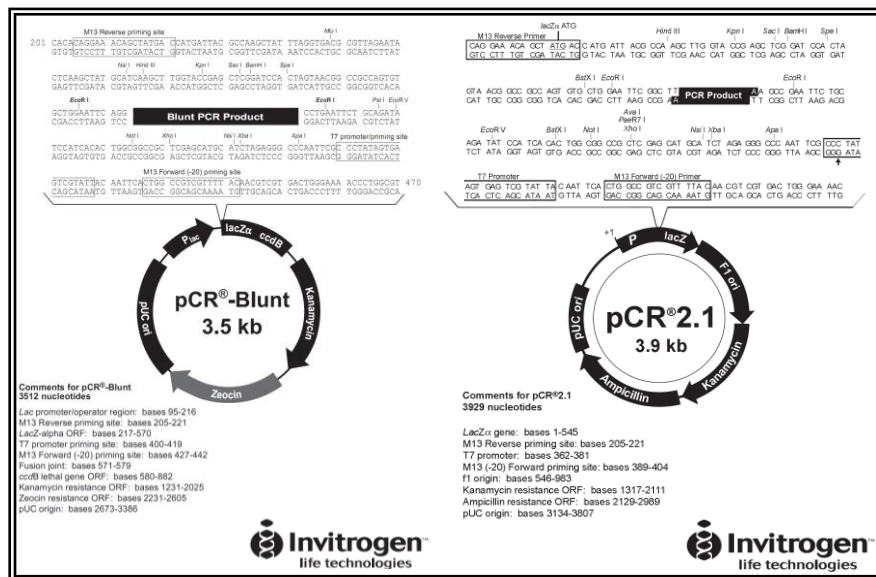


Figure : Cartes de restriction des vecteurs de clonages pCR-Blunt et pCR2.1. Ces vecteurs possèdent un site de clonage multiple contenant les site EcoRI.

➤ **pGEM-T Easy** (3015 pb) : Ce vecteur porte aussi le gène *lacZ* et un gène de résistance à l'ampicilline. A l'instar du vecteur pCR2.1, le vecteur pGEM-T Easy possède une dTTP à chaque extrémité 3' permettant le clonage des fragments PCR ayant un dATP à l'extrémité 3'. Enfin, il permet l'utilisation des amorces universelles et inverses M13 ainsi que les amorces SP6 et T7 s'hybridant de part et d'autre du site de clonage, permettant le séquençage de la séquence insérée.

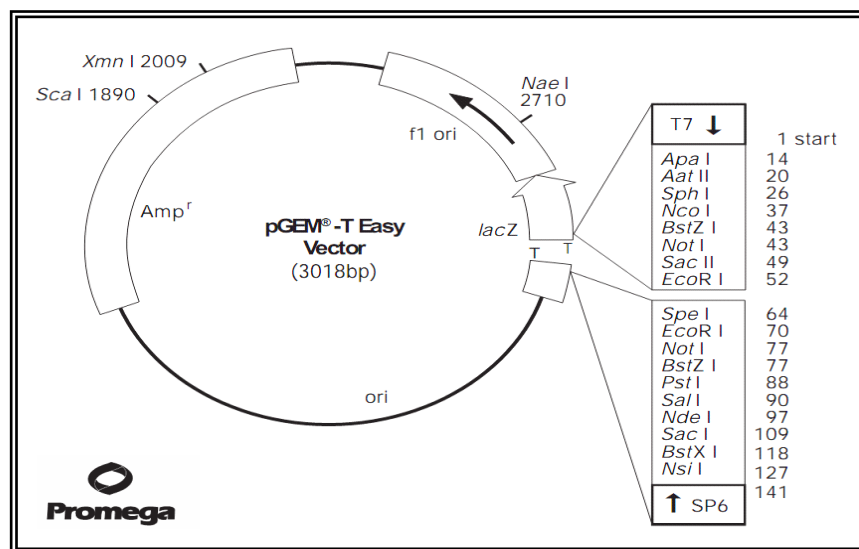


Figure : Carte de restriction du vecteur de séquence pGEM-T Easy. Ce vecteur possède un site de clonage multiple contenant le site *EcoRI*.

4. Vecteurs d'expression

Nous avons utilisé deux vecteurs commerciaux ; pUT57, fourni grassement par le Professeur Gérard TIRABY de l'Université de Paul Sabatier, (Toulouse-France, figure 4 A) et pTrc99A (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède, figure 4 B).

➤ **pUT57** (2900 pb) : C'est un vecteur ayant un nombre de copie élevé, portent le gène de résistance à l'ampicilline, seul marqueur de sélection et un **site multiple de clonage**. C'est un plasmide dérivé du plasmide pUC19 il contient une partie du plasmide pBR322 et du bactériophage M13mp 19, il est à nombre de

copies élevé et il porte aussi le gène *lacZ*. L'expression dans ce vecteur est sous le contrôle d'un promoteur assez fort (promoteur Lac) et elle est inductible par l'IPTG grâce à la présence du gène *lacZ*.

➤ **pTrc99A** (4176 pb) : C'est un vecteur de surexpression renfermant une résistance à l'ampicilline. L'expression dans ce vecteur est sous le contrôle d'un promoteur fort (promoteur Taq ou Trc) et elle est inductible par l'IPTG grâce à la présence du gène *lac I* (Amann et al., 1988; Nishihara et al., 1994; Thomas et al., 1985).

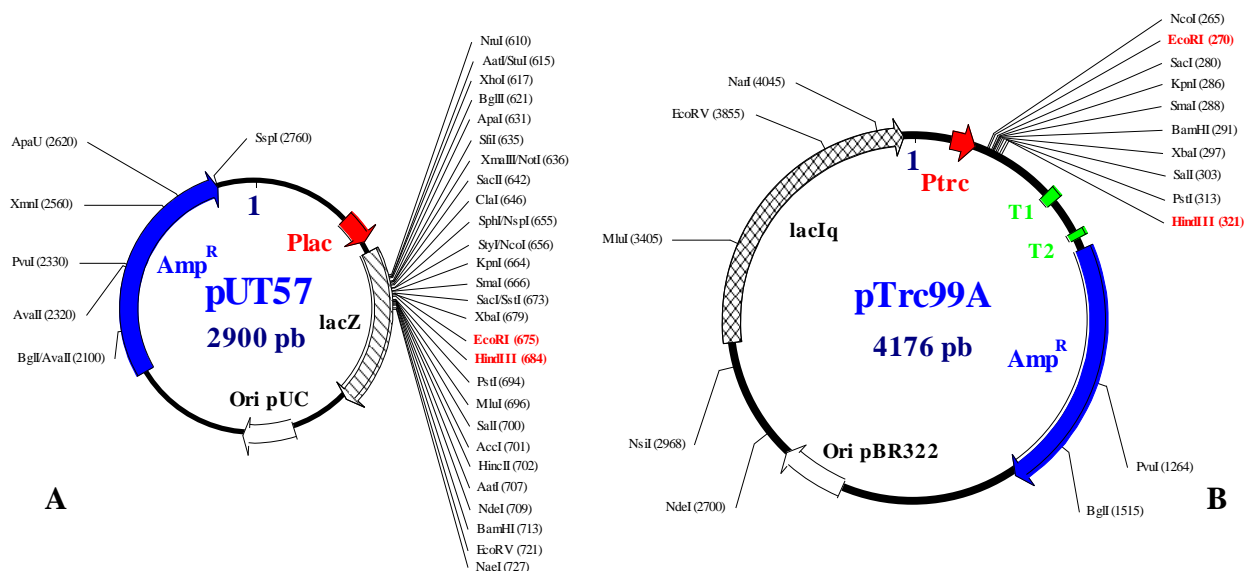


Figure : Cartes de restriction des vecteurs d'expression chez *E. coli* ; pUT57(A) et ptrc99A (B). Ces deux vecteurs possèdent un site de clonage multiple contenant les sites *EcoRI* et *HindIII*.

5. Plasmides pBJ

Les plasmides générés au cours de ce travail sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : **Plasmides (nommés pBJ) générés au cours de ce travail.**

| <u>INSERT</u> | <u>VECTEUR DE CLONAGE</u> | | | <u>VECTEUR D'EXPRESSION</u> | |
|----------------------------------|---------------------------|---------------|--------------------|-----------------------------|----------------|
| | <u>pCR Blunt</u> | <u>pCR2.1</u> | <u>pGME-T Easy</u> | <u>pUT-57</u> | <u>pTrc99A</u> |
| Gène de l'ARNr 16S | | | | | |
| Gène <i>sapB</i> (WT) | pBJ2 | | | pBJ3 | pBJ4 |
| Gène <i>sapB</i> -F159T | | | pBJ5 | | pBJ7 |
| Gène <i>sapB</i> -G182S | | | pBJ8 | | pBJ10 |
| Gène <i>sapB</i> -F159T/G182S | | | pBJ11 | | pBJ13 |
| Gène <i>sapB</i> -F159S | | | pBJ14 | | pBJ16 |
| Gène <i>sapB</i> -F159S/G182S | | | pBJ17 | | pBJ19 |
| Gène <i>sapB</i> -L31I | pBJ20 | | | | pBJ22 |
| Gène <i>sapB</i> -T33S | pBJ23 | | | | pBJ25 |
| Gène <i>sapB</i> -N99Y | pBJ26 | | | | pBJ28 |
| Gène <i>sapB</i> -L31I/T33S | pBJ29 | | | | pBJ31 |
| Gène <i>sapB</i> -L31I/N99Y | pBJ32 | | | | pBJ34 |
| Gène <i>sapB</i> -T33S/N99Y | pBJ35 | | | | pBJ37 |
| Gène <i>sapB</i> -L31I/T33S/N99Y | pBJ38 | | | | pBJ40 |
| Gène <i>sapB</i> -N56Q | | pBJ41 | | | pBJ43 |
| Gène <i>sapB</i> -N123Q | | pBJ44 | | | pBJ46 |
| Gène <i>sapB</i> -N130Q | | pBJ47 | | | pBJ49 |
| Gène <i>sapB</i> -N187Q | | pBJ50 | | | pBJ52 |
| Gène <i>sapB</i> -N240Q | | pBJ53 | | | pBJ55 |
| Gène <i>sapB</i> -N56Q/N187Q | | pBJ56 | | | pBJ58 |

6. Enzymes de restriction

Elles sont fournies essentiellement par Amersham, Biogène, Promega, Fermentas et Invitrogen et sont utilisées selon les instructions du fournisseur.

7. Marqueurs de taille et de masse moléculaire

Les marqueurs de taille pour ADN utilisés sont préparés par une simple digestion de l'ADN du phage Lambda (λ) par les enzymes de restriction *HindIII* ou *HincII*.

Pour les protéines, nous avons utilisé les marqueurs de masses moléculaires fournis par Invitrogen (SeeBleu[®] Plus2 Pre-Stained Standard, #LC5925), Fermentas (Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431) et Amersham (LMW-SDS Marker Kit, #17-0446-01).

8. Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés dans cette étude (tableau V.2) sont fournis essentiellement par Prologo, Sigma et Eurogentec. Ces amorces sont utilisées pour l'identification de la souche retenue, les amplifications d'ADN génomique (ADNg) et d'ADN plasmidique (ADNp), les manipulations de mutagenèse dirigée ainsi que pour le séquençage d'ADN.

Tableau : Les séquences des différents oligonucléotides utilisés dans cette étude. Pour les amplifications du gène de l'ARNr 16S (Oligo D-S73 et Oligo R-S74), du gène *sapB* sauvage (Oligos JB₁, JB₂, JB₃, JB₄, JB₅ et JB₆) et pour les manipulations de la mutagenèse dirigée. Les oligonucléotides : Oligos JB₁₁' et JB₁₂ correspondent aux séquences des deux oligonucléotides externes utilisés pour les manipulations de la mutagenèse dirigée. Les sites de restriction *EcoRI* et *HindIII* sont soulignés.

| <u>POSITI ON DE LA MUTATI ON</u> | <u>OLIGO- NUCLEOTI DE</u> | <u>SEQUENCES D'OLIGONUCLEOTIDE</u> | <u>TAIL LE (PB)</u> | <u>TM (°C)</u> |
|--|-----------------------------------|---|-----------------------------|--------------------|
| | Oligo D-S73 | 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ^{3'} | 20 | 48 |
| | Oligo R-S74 | 5'AAGGAGGTGATCCAAGCC ^{3'} | 18 | 51 |
| | Oligo JB₁ | 5'GCCTATCTCTATTA ^{3'} | 19 | 52 |
| | Oligo JB₂ | 5'CGAAAAAATGGAAAAGGCAG ^{3'} | 20 | 56 |
| | Oligo JB₃ | 5'GAAAAAGGGATGTGGAATG ^{3'} | 19 | 54 |
| | Oligo JB₄ | 5'GTCACACTTATTTTAGTTAG ^{3'} | 20 | 52 |
| | Oligo JB₅ | 5'CATGACCCTAGCATTGCTTA ^{3'} | 20 | 58 |
| | Oligo JB₆ | 5'TAGAATGAGTCACCAAGCGGT ^{3'} | 21 | 56 |
| | Oligo JB_{11'} | 5' <u>CCGG</u> [*] AATTCAGGGAAAAAGGGATGTGGAATG ^{3'} | 28 | 58 |
| | Oligo JB₁₂ | 5'GGGA [*] AGCTTCGAAAAAATGGAAAAGGCAG ^{3'} | 29 | 55 |
| F159T | Oligo JB₇ | 5'GAAATTCAGGTTCA <u>ACT</u> GGCTCTACTAGC ^{3'} | 29 | 59 |
| | Oligo JB₈ | 5'GCTAGTAGAGCC <u>AGT</u> TGAACCTGAATTC ^{3'} | 29 | 59 |
| G182S | Oligo JB₉ | 5'GCCAATGTAAAC <u>AGT</u> AACAATGTCAGAAAC ^{3'} | 30 | 59 |
| | Oligo JB₁₀ | 5'GTTTCTGACATTGTT <u>ACT</u> GTTTACATTGGC ^{3'} | 30 | 59 |
| F159S | Oligo JB₁₆ | 5'GAAATTCAGGTTCA <u>TCT</u> GGCTCTACTAGC ^{3'} | 29 | 62 |
| | Oligo JB₁₇ | 5'GCTAGTAGAGCC <u>AGAT</u> TGAACCTGAATTC ^{3'} | 29 | 62 |
| | | | | |
| L31I | Oligo JB₁₈ | 5'CAAAGTAGCTGTC <u>ATT</u> GATACTGGAATCCACG C ^{3'} | 33 | 58 |
| | Oligo JB₁₉ | 5'GCGTGGATTCCAGTATC <u>AAT</u> GACAGCTACTTT G ^{3'} | 33 | 58 |
| T33S | Oligo JB₂₀ | 5'GTAGCTGTCCTTGATT <u>TCT</u> GGAATCCACGCTGC ACACCC ^{3'} | 38 | 65 |
| | Oligo JB₂₁ | 5'GGGTGTGCAGCGTGGATTCC <u>AGA</u> ATCAAGGA CAGCTAC ^{3'} | 38 | 65 |

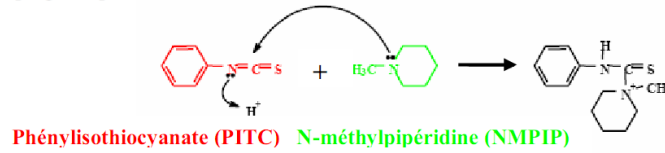
| | | | | |
|--------------|------------------------------|--|----|----|
| N99Y | Oligo JB₂₂ | 5'GTATTAGACCGT <u>TAT</u> GGCGACGGACAATACA GC ^{3'} | 33 | 59 |
| | Oligo JB₂₃ | 5'GCTGTATTGTCCGTCGCC <u>ATA</u> ACGGTCTAATA C ^{3'} | 33 | 59 |
| N56Q | Oligo JB₂₄ | 5'CCCTTCAGAGCCA <u>CAG</u> GCCACCCAAGACTTT C ^{3'} | 32 | 63 |
| | Oligo JB₂₅ | 5'GAAAGTCTTGGGTGGC <u>CTG</u> TGGCTCTGAAGG G ^{3'} | 32 | 63 |
| N123Q | Oligo JB₂₆ | 5'CATGGATGTCATCC <u>CAG</u> ATGAGCTTAGGCGGA CC ^{3'} | 33 | 62 |
| | Oligo JB₂₇ | 5'GGTCCGCCTAAGTCTAT <u>CTG</u> GATGACATCCAT G ^{3'} | 33 | 62 |
| N130Q | Oligo JB₂₈ | 5'GCTTAGGCGGACCA <u>CAG</u> GGCTCCACAGCGC ^{3'} | 30 | 66 |
| | Oligo JB₂₉ | 5'GCGCTGTGGAGCCCTGTG <u>GTC</u> CGCCTAAGC ^{3'} | 30 | 66 |
| N187Q | Oligo JB₃₀ | 5'CGGTAACAATGTCAGAC <u>CAG</u> TATCTTCTAGCG C ^{3'} | 33 | 59 |
| | Oligo JB₃₁ | 5'GCGCTAGAAGATGA <u>CTG</u> TCTGACATTGTTACC G ^{3'} | 33 | 59 |
| N240Q | Oligo JB₃₂ | 5'CCTTTCTAAGTATCCG <u>CAG</u> CTATCAACTTCTC AGGTTCG ^{3'} | 39 | 62 |
| | Oligo JB₃₃ | 5'CGAACCTGAGAAGTTGATAG <u>CTG</u> CGGATACTT AGAAAG ^{3'} | 39 | 62 |

9. Culture et conservation d'*Escherichia coli*

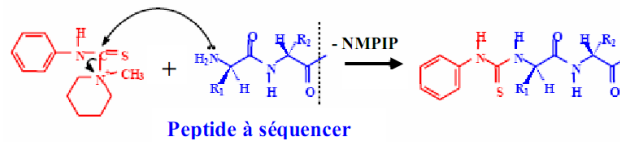
En milieu solide, les bactéries de *E. coli* sont cultivées sur des boîtes de pétri sur milieu LB (« Luria-Bertani ») [10 g peptone ; 10 g NaCl ; 5 g extrait de levure et 0,3 ml NaOH 10 N dans un litre d'eau distillée et ajuster le pH à 7,4] solide (contenant 16 g/l d'agar) additionné si nécessaire d'antibiotique, de X-gal 160 µg/ml et d'IPTG 360 µg/ml. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant une nuit. Alors qu'en milieu liquide, les cellules sont cultivées sur milieu LB additionné si nécessaire d'antibiotique. La mise en culture est toujours effectuée à partir d'une colonie ou d'une préculture de cette colonie. La culture est incubée à 37 °C sous une agitation constante de 250 rpm pendant une nuit.

Annexe 5

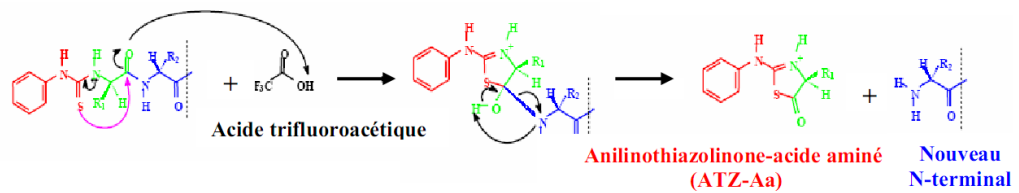
Etape 1 : Couplage du phénylthiocyanate (PITC) au N-méthylpiperidine (NMPiP : base)



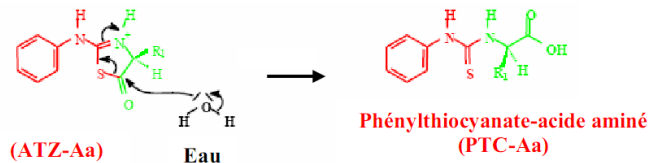
Etape 2 : Couplage du PITC-base au peptide



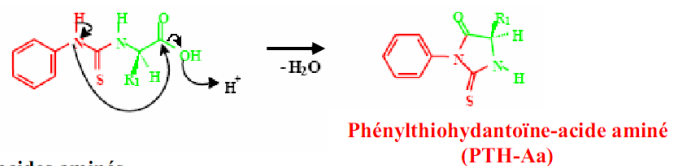
Etape 3 : Clivage de l'acide aminé N-terminal modifié par l'acide trifluoroacétique



Etape 4 : Conversion de l'ATZ-acide aminé en PTC-acide aminé



Etape 5 : Conversion du PTC-acide aminé en PTH-acide aminé



Etape 6 : Analyse des PTH-acides aminés

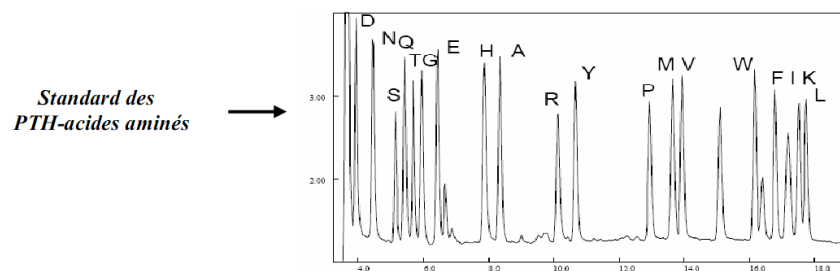


Figure : Dégradation chimique d'EDMAN automatisée sur microséquenceur de protéines. D'après (Hewick, et al.1981; Hunkapiller et Hood, 1978)

