

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Isolement et sélection des souches
d'actinomycètes productrices de
peroxydases

Présenté par :

MOUDOUB Malek & OUMELLIL Mourad

Soutenu le : **23 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme YAHIAOUI HAOUA	MAA	Présidente
Mme BALLA née BOUCHERBA NAWEL	MCA	Promotrice
Mme IDRES née KERAMANE BADRIA	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018



Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu tout puissant qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent à **Mme YAHIAOUI HAOUA** d'avoir accepté de présider le jury et **IDRES née KERAMANE BADRIA** pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciements à notre promotrice **Mme BALLA née BOUCHERBA NAWEL** qui a accepté de nous accueillir dans le laboratoire de microbiologie appliquée. Nous lui témoignons, notre gratitude et notre reconnaissance.

Nos remerciements s'adressent à **M^{lle} MAIBECHE RYMA** doctorante à l'université d'A. Mira, qui nous a prodigués de précieux conseils et nous a orientés.

Nous remercions l'ensemble du personnel du laboratoire pour nous avoir permis d'effectuer les différents tests et analyses et pour avoir mis à notre disposition le matériel et les moyens nécessaires à la Réalisation de notre travail.

Nous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui nous ont beaucoup appris et qui nous ont aidés, conseillés et soutenus à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleurs conditions.

Mourad & Malek

***D* édicaces**

Je dédie ce modeste travail aux êtres qui me sont les plus chers au monde

A mes très chers parents,

A ceux qui sont mon exemple de réussite, ceux que j'aime tant et je respecte, qui m'ont donné de l'amour, de la tendresse, du soutien et de la force. Mes parents, dont les conseils et sacrifices m'ont permis de réussir dans mes études, qu'ils trouvent ici, l'expression de mon profond respect,

Que D ieu vous protège et vous prête une longue et heureuse vie, que ce travail soit le témoignage profond de mon amour.

A mon très cher grand frère :

Yidhir qui m'a soutenu sur Tous les plans, auquel je souhaite beaucoup de Réussite et tout le bonheur du monde; qu'il trouve Dans ce travail la preuve modeste d'une Reconnaissance infinie et d'un profond amour.

A mes chères sœurs auxquels je souhaite beaucoup

De réussite et tout le bonheur du monde.

A mes très chères amis : Mourad, Yacine, Jugurtha, Salim, Fouad, Amir, Walid et karim, Mouhamed, walid, Aissa.

A mes très chères amies Sabrina, Fadwa, Souhila, Salima, kenza, Souhila, Thiziri Tinhinane et Ryma .

A tous mes camarades de la promotion BM, ensemble nous avons

Partagé d'agréables moments tout au long de la

Réalisation de ce travail et de notre cursus

Universitaire.

M alek



***D** édicaces*

Je dédie ce modeste travail aux êtres qui me sont les plus chers au monde.

***A** mes très chers parents*

A ceux qui sont mon exemple de réussite, ceux que j'aime tant et je respecte,

Qui m'ont donné de l'amour, de la tendresse, du soutien et de la force, mes parents dont les conseils et sacrifices m'ont permis de réussir dans mes études, qu'ils trouvent ici, l'expression de mon profond respect.

Que D ieu vous protège et vous prête une longue et heureuse vie, que ce travail soit

L e témoignage profond de mon amour.

***A** mes très chers frères*

Au petit Nafaa qui est la joie de la famille

A Omar et Salim qui m'on soutenu sur tous les plans, auxquels je souhaite beaucoup de

Réussite et tout le bonheur du monde, qu'il trouve dans ce travail la preuve

Modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour.

A ma très chère sœur **Hanane** à la quelle je souhaite beaucoup de réussite et tout

Le bonheur du monde.

A mes très chères amis : Malek, karim, Hadi, Fouad jacson, Aissa, Razik, Hamidouche,

Bachire, Remtane, walid et mouhamed.

A mes très chères amies Souhila, Salima, Sabrina, kenza, Thiziri, Fadwa, Souhila et
Tinhinane

A tous mes camarades de la promotion BM, ensemble nous avons

Partagé d'agréables moments.

***M** ourad*



LISTE DES TABLEAUX

N° tableau	Titre	page
I	Distribution des <i>actinomycètes</i> dans la nature.	3
II	Activité de la peroxydase extracellulaire produite par quelques genres d' <i>actinomycètes</i> .	11
III	Isolats retenus selon le critère « couleur de colonie ».	19
IV	Mesure de la croissance des sept souches	Annexe 3
V	Résultat de l'activité à 470 nm sur milieu R2A7	Annexe 3
VI	Résultat de l'activité à 470 nm sur milieu R2A9	Annexe 3
VII	Activité peroxydasique de trois isolats	25
VIII	Croissance des isolats après 7,9 et 11 jour d'incubation.	Annexe 3
IX	Activité de la peroxydasique produite par des souches d' <i>actinomycètes</i>	28

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Fig.01	Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i>	04
Fig.02	Métabolites secondaires produits par les actinomycètes	06
Fig.03	Mécanisme réactionnel des peroxydases	09
Fig.04	Différents échantillons du sol.	13
Fig.05	Isolats obtenus à partir des trois échantillons du sol.	17
Fig.06	Colonies obtenues sur chaque milieu	18
Fig.07	Croissance des onze (11) isolats dans le milieu R ₂ A7.	19
Fig.08	Croissance des isolats à 600 nm dans le milieu R ₂ A9.	20
Fig.09	Aspect des isolats E ₂ .6.1.10 ⁻² et E ₁ .10.1.10 ⁻¹ sur milieux R2A7 et R2A9.	21
Fig.10	Absorbance des isolats à 600 nm sur milieu R ₂ A7	21
Fig.11	Absorbance des isolats à 600 nm sur milieu R ₂ A9	22
Fig.12	Activité peroxydasique des 4 isolats à différents temps sur milieu R2A7.	23
Fig.13	Activité peroxydasique des 3 isolats sur milieu R2A9	24
Fig.15	Suivi de la croissance et de l'activité de l'isolat E ₂ .6.1.10 ⁻² sur milieu R2A7 en fonction des jours.	26
Fig.16	Suivi de la croissance et de l'activité de l'isolat E ₂ .4.1.10 ⁻² sur milieu R2A7 en fonction des jours et du temps.	26
Fig.17	Suivi de la croissance et de l'activité de l'isolat E ₂ .5.1.10 ⁻² sur milieu R2A7 en fonction des jours	27
Fig.18	Isolats les plus performants	27

LISTE DES ABREVIATIONS

rpm: Rotation par minute.

R2A: Reasoner's 2A Agar.

ADN : Acide Désoxyribonucléique

SOD: Superoxyde dismutase.

H₂O₂: Eau oxygénée.

AsP: Acrobate peroxydases.

CaP: Catalase-peroxydases.

A°: Radicaux libres.

UV.vis : Ultraviolet-visible.

prx : peroxydase.

LiP : Lignine-peroxydase.

(GC)% : pourcentage Guanine –Cytosine.

SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les *actinomycètes* 2

II. Ecologie, taxonomie et importance des *actinomycètes* 2

II.1. Ecologie et cycle de développement du genre *Streptomyces*..... 2

II.2. Cycle de développement 3

II.3. Taxonomie et critères d'identification 4

II.4. Importance des *actinomycètes* 4

III. Métabolisme des Actinomycètes 5

IV. Peroxydases 6

IV.1. Classification des peroxydases selon Welinder.....6

IV.2. Mécanisme réactionnel de la peroxydase..... 9

V. Application des peroxydases 10

VI. Actinomycètes producteurs de peroxydases 11

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel analytique et produits chimiques..... 12

II. Méthodes..... 12

II.1.	Site et nature de prélèvement.....	12
II.2.	Préparation et ensemencement des milieux de culture	13
II.3.	Purification des isolats.....	14
II.4.	Culture sur milieu liquide	14
II.4.1.	Préparation de la préculture	14
II.4.2.	Culture proprement dite.....	15
II.5.	Production de peroxydases	15
II.5.1.	Mesure de l'activité peroxydasique	15
II.5.2.	Sélection des isolats les plus actifs	16

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I.	Site et nature des prélèvement.....	17
II.	Préparation et ensemencement des milieux de cultures.....	17
II.1.	Purification des isolats.....	18
III.	Culture sur milieu liquide	19
III.1.	Culture proprement dite	20
IV.	Mesure de l'activité peroxydasique	22
V.	Sélection des isolats les plus performants	25
VI.	Test de confirmation	25
	Conclusion et perspective.....	29

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Introduction

L'utilisation des enzymes est connue depuis longtemps, mais leur emploi a été développé après la mise au point des différentes méthodes d'extraction, de séparation et de purification sans altérer leur fonctionnement. Ceci a permis de les utiliser dans des applications à l'échelle industrielle (Kula 1982).

Durant ces dernières années, la biotechnologie des enzymes a augmenté de plus en plus du fait de l'énorme avantage qu'elle fournit par rapport aux méthodes chimiques, non seulement sur le plan énergétique, mais également grâce à l'efficacité, la rapidité et la spécificité au substrat.

Parmi les microorganismes les plus prometteurs à l'échelle industrielle, on cite les actinomycètes qui sont fréquemment utilisés en raison de leurs diverses capacités métaboliques. Les actinomycètes produisent : des cellulases, des xylanases, des protéases et également des peroxydases (Corvini, 2000).

les peroxydases sont des protéines à hème, capables de catalyser l'oxydation d'une large gamme de substrats, en utilisant le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Delannoy et al., 2004). Elles ont plusieurs applications dans divers domaines comme : la dégradation des déchets industriels et des polluants de l'industrie du papier et des détergents.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail; portant sur l'isolement des souches d'actinomycètes productrices des peroxydases, à partir du sol. La première partie de ce travail est consacrée à la synthèse bibliographique, là où nous décrivons des généralités sur les actinomycètes ainsi qu'un aperçu général sur les peroxydases.

La seconde partie du document traite les principes généraux des matériels et méthodes utilisés à savoir:

- Isolement des actinomycètes à partir du sol.
- Etude de la croissance sur milieu R_2A .
- Test d'activité enzymatique.
- Confirmation du test d'activité enzymatique.

Et enfin, la troisième partie du manuscrit présentera les résultats et discussion des principales parties de cette étude.

Ce travail entrepris est un travail pionnier au niveau de la faculté des sciences de la nature et de la vie et également à l'échelle nationale.

Synthèse

Bibliographique

I. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif (Williams et *al.*, 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997) avec un (G+C) % élevé (60-70 %) (Prescott, 2010) qui diffèrent d'une espèce à une autre tels que les espèces du genre *Corynebacterium* qui présentent un taux de 51% et les espèces du genre *Streptomyces* et *Frankia* avec un taux de 70% (Benson et Silvester, 1993 ; Perrine-Walker et *al.*, 2011).

Les actinomycètes ont été classés parmi les champignons (eucaryotes), vu leur morphologie fongicoïde (Otto, 1998 et Lefebvre, 2008), mais actuellement ils sont classés parmi les bactéries (procaryote) dû à leur matériel génétique qui est dépourvu de noyau à l'opposé des eucaryotes dont le matériel génétique est entouré d'une enveloppe nucléaire. Leur croissance donne naissance à des colonies circulaires, constituées d'hyphes, ils se propagent tout autour du germe qui leur a donné naissance (Kitouni, 2007), ce qui explique leur dénomination provenant de deux substantifs grecs « actino » et « mycète » qui signifient « champignons à rayons » ou « champignons rayonnants » (Gottlieb, 1973).

Ils sont généralement des saprophytes aérobies, mais il existe des formes anaérobies regroupant généralement des espèces pathogènes (Andariambololona, 2010). Les actinomycètes sont des chimioorganotrophes qui utilisent une grande variété de source d'énergie mais il existe également d'autres espèces qui sont chimioautotrophes (Mariat et Sebald, 1990).

II. Ecologie, taxonomie et importance des actinomycètes.

II.1. Ecologie et cycle de développement du genre *Streptomyces*.

Les actinomycètes ont une grande capacité d'adaptation aux différentes conditions environnementales ainsi qu'une large variabilité métabolique ; ce qui leur permet d'être répons dans presque tous les écosystèmes comme le montre le tableau I. Ils ont une certaine préférence pour le sol qui demeure le réservoir le plus riche (Lechavalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983). Ils se retrouvent dans des sols désertiques chauds et secs (Stackebrandt et Schumann, 2000), les sols hautement contaminés avec les métaux lourds, les sols polaires gelés, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés (Kitouni, 2007), les milieux aquatiques tels que l'eau de mer (Subramani et Aalbersberg, 2013), les sédiments océaniques (Solano et *al.*, 2009 ; Jensen et *al.*, 2005), et au niveau de certains végétaux et animaux (Fiedler et *al.*, 2005).

Le genre le plus dominant dans les sols et les divers autres substrats est le genre *Streptomyces* avec un taux de 80 à 95% du total des *actinomycètes* suivi par le genre *Nocardia* et *Micromonospora*. Les autres genres sont peu fréquents (Boucheffa, 2011).

Tableau I : Distribution des actinomycètes dans la nature (Larpent, 1989).

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumière, litières
<i>Saccharomanospora</i>	Matière en décompositions
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décompositions et fermentations

II.2. Cycle de développement

Les actinomycètes possèdent un cycle de développement complexe (Fig. 1), il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes qui se ramifient. Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium secondaire ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores qui sont des agents de dissémination (Smaoui, 2010). Ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat et sont en général pigmentés (Theilleux, 1993).

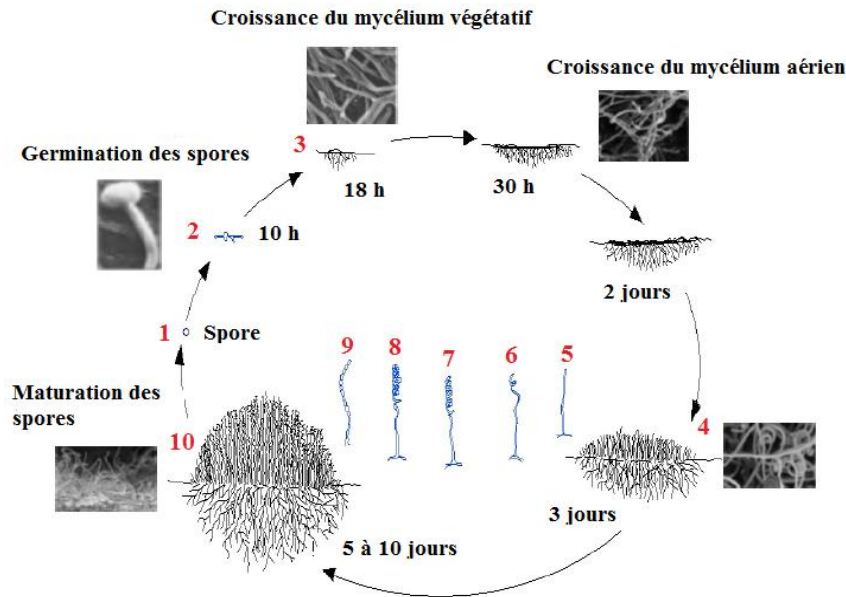


Fig.1 : Cycle de développement du genre *Streptomyces* (Hopwood et *al.*, 1985).

II.3. Taxonomie et critères d'identification

Selon les différentes éditions du manuel de Bergey, les formes bactériennes non mycéliennes ont été rattachées aux *actinomycètes* en se basant sur leur parenté phylogénétique. Les *actinomycètes* ont été reliés au phylum Actinobacteries qui comprend 5 classes, 15 ordres, 43 familles et 203 genres (Goodfellow, 2012).

Leur classification et identification sont basées essentiellement sur des critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires (Smaoui, 2010), Tels que la présence ou absence du mycélium aérien, les constituants de la paroi cellulaire (Lechevalier et Lechevalier, 1970) ; le coefficient de Chargaff ou G+C % (Stackebrandt et *al.*, 1981) et les tests de dégradation des différents composés organiques.

II.4. Importance des actinomycètes

La production d'enzymes par les différents genres d'*actinomycètes* d'application industrielle a révélé un potentiel très intéressant à exploiter dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire et dans l'agriculture (fertilisation des sols). Les *actinomycètes* produisent des substances bioactives présentant différentes applications : les molécules utilisées dans la lutte contre les phytopathogènes. Les *actinomycètes* produisent d'autres métabolites secondaires telles que les vitamines, les herbicides, les pesticides, les antibiotiques, les antiviraux ou encore les antiparasitaires (Oskay et *al.*, 2004).

En domaine pharmaceutique, les *actinomycètes* produisent 60 % des médicaments telle que l'actinomycine D (Demain et Leucini, 2006), ils possèdent diverses activités biologiques (Manivasagan et *al.*, 2014 ; Blunt et *al.*, 2016) comme les activités anticancéreuses, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti oxydantes (Lam, 2006).

Ils produisent une variété de substances qui aident la croissance des plantes et protègent leurs racines contre l'attaque des phytopathogènes (Kekuda et *al.*, 2013). Ils ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes ou difficilement dégradables telles que les polysaccharides, les lignocelluloses et la chitine (Lechevalier, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983). En outre, ils jouent un rôle significatif dans la fixation de l'azote et l'amélioration des paramètres physiques du sol (Goodfellow et Williams, 1983).

III. Métabolisme des Actinomycètes

Les métabolites primaires jouent un rôle important dans la formation de la structure cellulaire et assurent son bon fonctionnement (Theilleux, 1993). Ils sont utilisés comme initiateur de construction des métabolites (Rokem et *al.*, 2007). Les *actinomycètes* sont caractérisés par la production d'une large gamme de métabolites secondaires Fig.2 (Das et *al.*, 2008). Ils sont synthétisés lorsque il y'a une réduction ou un arrêt de croissance (Doull et Vining, 1990), leur synthèse est régulée par différents facteurs (Theilleux, 1993). tels que les nutriments (Augustine et *al.*, 2004, Fourati et *al.*, 2005), le pH et la température (Sujatha et *al.*, 2005), les sels minéraux (Wang et *al.*, 2003), les ions métalliques (Gesheva et *al.*, 2005), les précurseurs (Omura et Tanaka, 1986) et les inhibiteurs (Bibb, 2005) qui influent sur les métabolites lors de la fermentation, outre la production d'antibiotiques, les *actinomycètes* produisent un large éventail de molécules à activités variées.

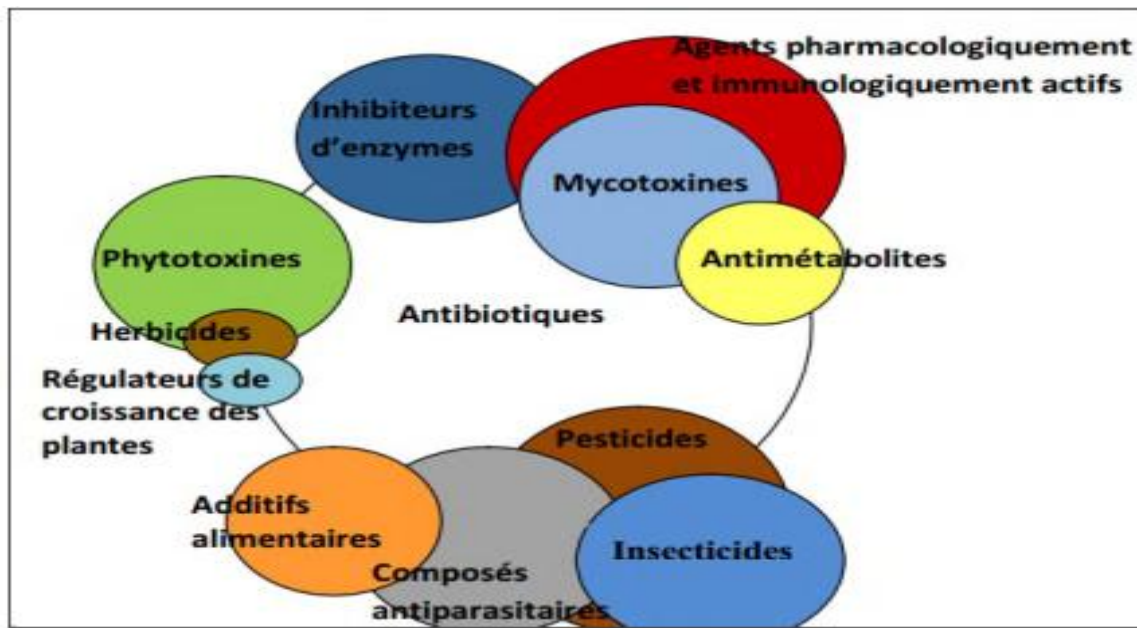


Fig.2 : Métabolites secondaires produits par les actinomycètes (Conn, 2005).

IV. Peroxydases

Les peroxydases sont largement présentes dans différents types d'organismes vivants (animaux, plantes et micro-organismes) (Sişecioglu *et al.*, 2010 ; Kumar et Jagannadham, 2011 ; Zheng, 2012). Ce sont des enzymes intra et extracellulaires avec des rôles importants dans les processus cellulaires (Everse et Grisham, 1990). La peroxydase est une enzyme qui catalyse la réaction d'oxydation du H_2O_2 pour des fins métaboliques (Sreenivasulu *et al.*, 1999 ; Velikova., 2005), ils catalysent la réaction d'oxydation d'une grande variété de substrats (Yemenicio et Cemer, 1998 ; Rompel 2007 ; Kalın, 2014) et participent également à la défense de la cellule contre les peroxydes très toxiques et radicaux libres, les oxydations peuvent être observées à l'œil nu ou mesurées au photomètre ou au colorimètre. Il suffit pour cela d'utiliser un réactif donnant un produit coloré, le gaïacol (incolore), dont l'oxydation par l'eau oxygénée aboutit à la gaiacoquinone, de couleur marron.

La production de peroxydases extracellulaires par les bactéries *actinomycètes* a été décrite par plusieurs auteurs en citant les travaux de Godden en 1992 et par Ramachandra en 1988.

IV.1. Classification des peroxydases selon Welinder

La classification repose sur les caractéristiques de la structure primaire des peroxydases à hème ferrique. Elle exclue les NADH et NADPH peroxydases, les

glutathion peroxydases, les peroxydases à deux hèmes, dont le cytochrome c peroxydase (CcP) de *Pseudomonas aeruginosa* et les halo peroxydases qui catalysent l'halogénéation de composés organiques. On distingue ainsi trois superfamilles :

- les peroxydases animales comprenant les peroxydases à halogènes et les prostaglandines synthases ; les catalases ; les peroxydases végétales.

WeIinder, en 1992, a séparé les peroxydases en trois classes :

La classe I

Elle renferme les peroxydases d'origine procaryotique dont la Cytochrome c Peroxydase (CcP) de *Saccharomyces cerevisiae*, les Ascorbates Peroxydases (AsP) et les Catalase-Peroxydases (CaP) bactériennes. Celles-ci sont toutes des peroxydases intracellulaires, non glycosylées, sans calcium ni pont disulfure. La CcP est une protéine soluble de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie ou elle doit servir à la détoxification des peroxydes (Yonetani et Ohnishi, 1966).

Les AsP sont les principales enzymes de détoxification de l'H₂O₂ des végétaux supérieurs. Elles ont une très grande spécificité et une grande affinité pour l'ascorbate qui leur sert de réducteur dans la destruction de l'H₂O₂ (Smirnoff, 2000) ; on les trouve dans le cytosol, les chloroplastes, les mitochondries, les peroxysomes et les glyoxysomes (Asada, 1999). L'expression des gènes AsP semble directement être contrôlée par l'H₂O₂ (Morita et al., 1999).

Enfin, les CaP bactériennes sont des enzymes bi-fonctionnelles avec à la fois une activité catalase importante et une activité peroxydase moindre, mais conséquentes proches des AsP et de la CcP, elles sont issues de la duplication d'un gène ancestral (Zamocky et al., 2000). Elles semblent partager les mêmes fonctions, ce qui pourrait également les impliquer en tant que facteurs de virulence de certaines bactéries (Faguy et Doolittle, 2000).

La Classe II

Elle contient les peroxydases secrétées par les champignons. Leur structure ressemble beaucoup à celle des peroxydases de classe III avec la présence de sites de glycosylation (Kjalke et al., 1992), de ponts disulfures, de deux molécules de calcium (Kunishima et al., 1994) et d'un peptide signal. Ces enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine sont présentes chez un grand nombre de champignons, notamment les basidiomycètes (Varela et al., 2000). Elles sont en général induites dans des conditions de carence nutritive pour le champignon, même s'il existe de nombreuses

exceptions (Cullen, 1997), les peroxydases de la classe II sont organisées en deux types selon Conesa et collaborateurs (2002) :

- ✚ La lignine-peroxydase (LiP), qui oxyde un grand nombre de composés aromatiques non phénoliques dérivés de la lignine ; le substrat type des LiP est le vératrol fongique qui interviendrait dans le mécanisme de réaction ,soit en protégeant l'enzyme contre l'inactivation par l'H₂O₂ (Valli et *al.*, 1990), soit en servant d'intermédiaire d'oxydoréduction entre l'enzyme et les substrats ne pouvant approcher le site actif (Chung et Aust, 1995)
- ✚ Les peroxydases à manganèse, qui oxydent la lignine et les composés phénoliques qui en dérivent via l'oxydation du Mn²⁺ en Mn³⁺ qui sert d'intermédiaire d'oxydoréduction (Glenn et *al.*, 1986).

Classe III

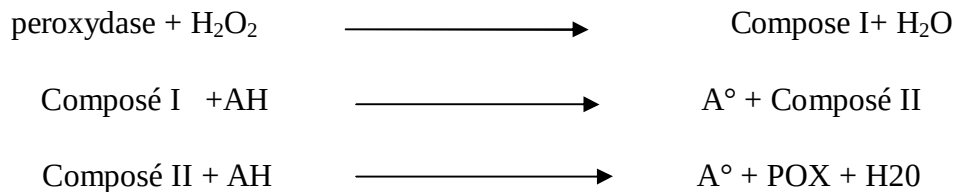
Les peroxydases de classe III sont secrétées par les cellules des plantes.

On peut distinguer aussi :

- **Les peroxydases à hème :**
 - La famille des cyclo-oxygénases : exemples des ubiquistes prostaglandines H synthases (cyclo-oxygénase, lacto-peroxydases, myélo-peroxydaseset d'autres moins ubiquistes : alpha-di-oxygénase, perodains (Pxd).
 - Les peroxydases à 2 hèmes : exemples des cytochromes C peroxydases.
 - La famille des catalases.
 - La famille des peroxydases DyP-type A/B/C/D : très répandues chez les bactéries et les champignons.
- **Les peroxydases sans hème :**
 - La famille des alkylhydroperoxydases D.
 - Les halos peroxydases : exemple la manganèse catalase.
 - La glutathionne peroxydase : enzyme-clé du métabolisme oxydatif chez tous les animaux et plantes.
 - Les peroxyrédoxines.
 - NADPH oxydases : exemple des NADPH oxydases et déshydrogénase.

IV.2. Mécanisme réactionnel de la peroxydase

Les peroxydases sont des enzymes non michaeliennes (Dunford, 1999). L'action de ces enzymes nécessite la présence de l'eau oxygénée (H_2O_2) qui déclenche l'activité peroxydase qui induit la formation d'enzymes transitoires (composés I, II) en oxydants le substrat, les composés I et II donnent naissance à des radicaux libres (A°) qui peuvent former des polymères en réagissant entre eux. La réaction se déroule selon la formule développée par Dunford, 1999.



Avec AH donneur d'hydrogène

Le Mécanisme réactionnel commence par la réaction entre la peroxydase et le H_2O_2 où ce dernier est réduit en H_2O et l'enzyme est oxydée. Le site actif de l'enzyme constitué de Fe^{+3} va être oxydé en oxyferryl ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) pour donner le composé I, ce dernier va oxyder le substrat (AH) et subir une seconde oxydation générant le composé II qui est constitué d'un centre oxyferryl. A la fin le composé II est réduit à l'état ferrique (Fe^{+3}) natif et régénère la peroxydase (Plemont, 1998). La Fig.3 illustre le mécanisme réactionnel.

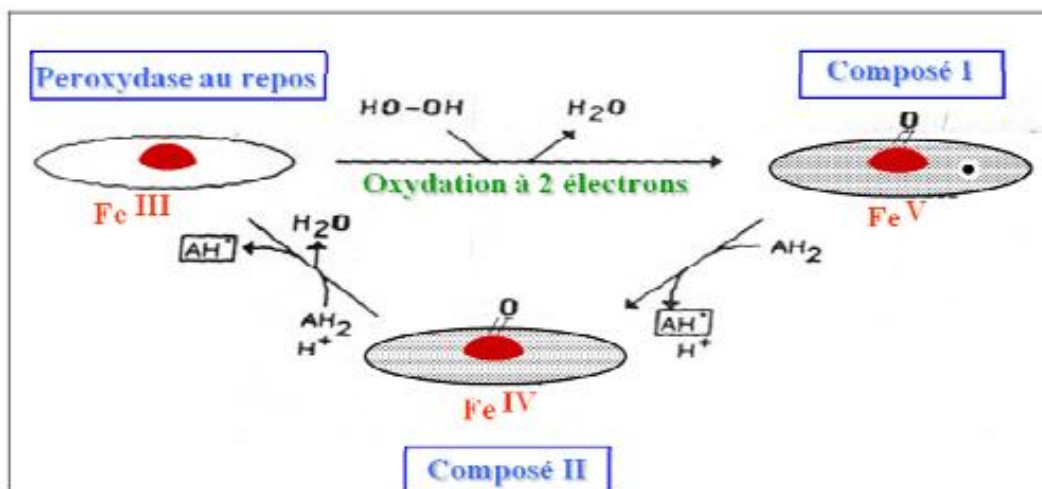
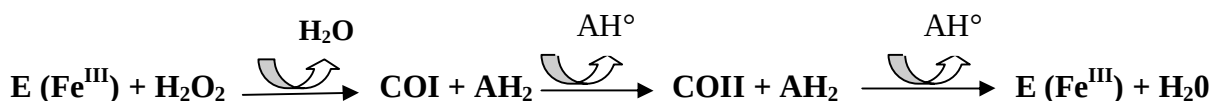


Fig.3 : Mécanisme réactionnel des peroxydases (Plemont, 1998).

V. Application des peroxydases

L'aptitude de la peroxydase à oxyder plusieurs substrats en utilisant H_2O_2 par des réactions d'oxydoréductases, leur a contribué un vaste champ d'applications dans différents domaines tels que :

Dans le secteur agroalimentaire, la peroxydase permet de déterminer la dose limite des additifs alimentaires comme l' H_2O_2 qui est utilisé dans l'industrie alimentaire comme additif mais devant être éliminé dans le produit fini (Thompson, 1987).

Elles sont utilisées dans les techniques de décoloration de plusieurs produits alimentaires (jus et thé). En synthèse chimique, les peroxydases catalysent une grande variété de déshydrogénations comme la transformation des composés organiques (Veld et *al.*, 2001)

Dans l'industrie de papier, pour remplacer certains traitements chimiques très polluants. Elles sont utilisées dans le blanchiment des papiers (Antonopoulouse et *al.*, 2001)

Détoxifications des eaux usées par l'élimination du phénol et décontamination du sol (Berry et Boyd 1985).

Elles sont employées dans les analyses biologiques comme marqueur tels que les marqueurs de croissance, stress biotique et abiotique, marqueur de sonde (grigorenk et *al.*, 2001)

Elle joue un rôle dans les analyses immuno-enzymatiques grâce aux réactions colorées que génère les produits des substrats des peroxydases, on peut déterminer sa localisation dans les tissus (Saida 2012).

VI. Actinomycètes producteurs de peroxydases

Le genre actinomycète est producteur de peroxydases intracellulaires et extracellulaires. Le tableau qui suit résume quelques espèces productrices de peroxydase.

Tableau II : quelques exemples de souches d'actinomycètes productrices de peroxydase

(Mercer, 1996 ; Rose-Hill, 2011)

<i>Actinomycètes productrice de peroxydase</i>
<i>Streptomyces</i> sp. EC
<i>S. viridosporus</i> T7A,
<i>Thermomonosporacurvata</i> BD3
<i>Thermomonospora</i> sp. RW4
<i>Streptomyces lividans</i> TK64
<i>Thermomonosporamesoviformis</i> BD12,
<i>Thermomonosporasp</i>
<i>Thermoactinomycescandidus</i> BD28
<i>Saccharomonosporaviridis</i> 30 Urban K
<i>Pseudonocardia</i> sp. EC20
<i>Mycobacterium</i> Sp.McS
<i>Streptomyces toyocaensis</i>
<i>Acidothermuscellulolyticus</i> 11B
<i>Nocardiafarcinica</i>
<i>Renibacteriumsalmoninarum</i>

Matériel et méthodes

Notre travail de recherche a été réalisé entre le 8 février et le 9 mai 2018 au niveau du Laboratoire de recherche « Microbiologie appliquée » (LMA) de la faculté des Sciences de la Nature et de la vie. Ce travail est initié pour la première fois par notre modeste contribution néanmoins le Co-encadrement de ce travail est assuré par Melle Maibeche R., une doctorante intégrée dans l'équipe « Enzymes Microbiennes » (dirigée par Dr. Boucherba N.) qui travaille sur la même thématique depuis deux ans.

I. Matériel analytique et produits chimiques

Le matériel et les produits chimiques utilisés dans cette étude sont rapportés dans l'annexe I.

II. Méthodes

II.1. Site et nature de prélèvement

Notre étude est menée sur Trois types d'échantillons du sol prélevés au niveau de la commune d'Akbou dans 3 endroits différents, le premier échantillon «E1» est récupéré sous un compost et sous une profondeur de 10 cm tout en éliminant la couche superficielle tellurique, le deuxième échantillon «E2» est récupéré sous une profondeur de 10 cm à proximité des racines et le troisième échantillon «E3» est récupéré à la même profondeur que les précédents mais sous une liasse de bois. Le prélèvement est réalisé selon la méthode standard de Pochon et Tradieux (1962). La figure suivante illustre le site de prélèvement et les différents types de sol.

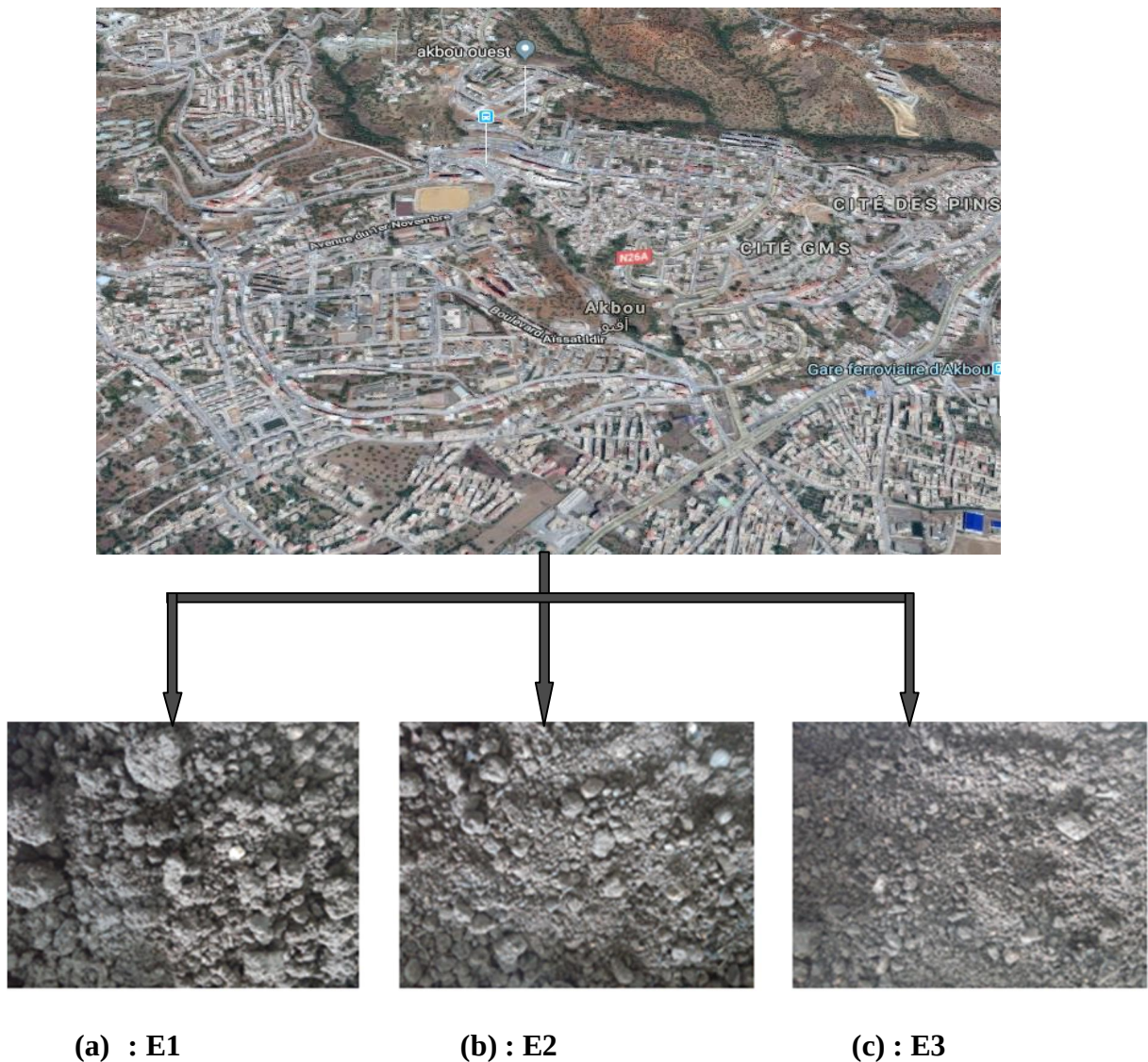


Fig.04: Différents échantillons du sol.

II.2. Préparation et ensemencement des milieux de culture

La gélose R2A est utilisée pour les numérations hétérotrophiques des bactéries. Ce milieu, développé par Reasoner et Gelreich (1988), plus sélectif que la gélose nutritive est meilleure que les milieux classiques pour le dénombrement des bactéries stressées ou résistantes au chlore. L'utilisation d'un milieu pauvre en nutriments favorise la croissance de ces bactéries au détriment des espèces à croissance rapide, permettant ainsi leur numération.

Pour l'isolement des actinomycètes le milieu R2A modifié et additionné de gäiacol (Sigma-Aldrich) est utilisé. La composition de ce milieu est rapportée en annexe II, est son pH est ajusté à pH 7 et 9. Les mêmes composants de base ont été utilisés par Mercer en 1996 pour l'isolement des espèces appartenant au genre *Streptomyces*.

10 g de chaque sol sont mis dans un erlen contenant 90 ml d'eau physiologique stérile, ceci est considéré comme la solution mère, Par la suite, une série de dilutions décimales est réalisée en prélevant 1ml de la dilution précédente et en l'ajoutant dans un tube qui contient 9 ml d'eau physiologique jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-9} (Bastide, 1986).

À partir de chaque dilution, un volume de 200µl est prélevé et ensemencé en surface sur le milieu gélosé « R2A7 et R2A9 ». Les boîtes de Petri sont incubées à 37°C pendant 7 à 15 jours (Kitouni, 2007).

II.3. Purification des isolats

Les colonies d'actinomycètes sont reconnues par leur aspect morphologique caractéristique, aspect cotonneux avec une couleur marron adhérent à la gélose et formant un mycélium

Des colonies marron ayant l'aspect des *actinomycètes* sont sélectionnées. En effet, ces colonies colorées sont révélatrices de l'oxydation du gaïacol. Deux repiquages successifs sur les milieux de culture « R₂A7 ou R₂A9 » sont réalisés puis les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 7 à 15 jours. L'obtention de colonies pures est déterminante pour le nombre de repiquages à faire.

II.4. Culture sur milieu liquide

II.4.1. Préparation de la préculture

Les colonies marron obtenues sur les milieux R2A7 et R2A9 sont sélectionnées. Au total Vingt et un (21) isolats sont obtenus. Onze (11) isolats se développent à pH 7 et dix (10) à pH 9.

Une colonie de chaque isolat est ensemencée dans 5 ml des milieux liquides R₂A7 ou R₂A9 (il s'agit des milieux gélosés cités précédemment mais sans l'addition d'agar) puis incubée à une température de 37°C dans un bain Marie (Meymert) pendant 3 jours. La croissance est mesurée à 600 nm.

II.4.2. Culture proprement dite

Les isolats qui ont poussé dans les milieux de culture liquides sont sélectionnés pour ensemer à raison de 3 % (600 µl) dans des erlens ayant un volume de 20 ml de R₂A7 ou R2A9. Les cultures sont incubées dans un bain Marie agitateur réglé à 37 °C pendant 5 jours. La croissance microbienne est suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm chaque 48 h.

II.5. Production de peroxydases

Une fois la fermentation terminée, les cultures sont centrifugées à 6000 rpm dans une centrifugeuse réfrigérée (Centurion Scientific) pendant 20 min afin d'obtenir le surnageant de culture qui contient les peroxydases extracellulaires.

II.5.1. Mesure de l'activité peroxydasique

Le mélange réactionnel (1ml) est constitué de 400 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7), 200 µl du surnageant de culture et 200 µl de substrat à savoir le gaïacol (20 mM), la réaction est initiée par l'addition de 200 µl H₂O₂ (50 mM), elle est arrêtée par l'ajout de 40 µl de NaOH (5 M) à différents temps : 2, 4 et 6 min, à la fin une mesure d'absorbance est réalisée à 470 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Shimadzu UVmini-1240

Une unité d'activité peroxydasique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui transforme un (1.0) µ mol de peroxyde d'hydrogène par minute à 25°C et à pH 7,4.

L'activité peroxydasique est calculée selon la formule de Chance et Maehly (1955).

$$U/ml = \frac{A/t * \text{Volumeréactionnel} * \text{Facteur de dillution}}{\text{Volume enzymatique}}$$



A : Absorbance à 470 nm.



t : Temps optimum en minutes.



Volume surnageant : 0,2 ml.

II.5.2. Sélection des isolats les plus performants

Les isolats ayant les activités peroxydasiques les plus élevées font l'objet d'une cinétique de croissance et d'activité peroxydasique à 7, 9 et 11 jours. La croissance est mesurée à 600 nm, l'activité est détectée selon la méthode décrite dans le paragraphe II.5.1.

Résultats et discussion

Dans ce chapitre, seront abordés les résultats et discussion des principales parties de ce travail à savoir l'isolement et la sélection des isolats les plus performants et l'activité peoxydasique.

I. Site et nature de prélèvement

Cette étude est basée sur l'isolement des *actinomycètes* à partir de 3 échantillons de sol prélevés à différentes zones de la commune d'Akbou. En effet, les travaux de Küster et Williams (1964) ont montré que les actinomycètes sont considérés comme le plus grand groupe microbienne de la population tellurique et ils sont largement distribués dans les sols. (Lechevalier et Lechevalier, 1967). Le choix des sites de prélèvement revient au fait que les *actinomycètes* sont des chimioorganotrophes. Ils utilisent la matière organique et sont capables de dégrader la lignine, principal constituant du bois (cité par Tuomela et *al.*, 2000). Les racines présentent souvent des symbioses avec un *actinomycète* du genre *Frankia* (Benson et Silvester, 1993).

II. Préparation et ensemencement des milieux de culture

L'isolement à partir des échantillons de sol nous a permis de regrouper un nombre important d'isolats (174) sur les milieux R₂A7 et R₂A9. Ce nombre est représenté dans la Figure N° 5. A partir de l'échantillon 1 64 isolats sont obtenus, pour l'échantillon 2 62 isolats et pour l'échantillon 3 48 isolats

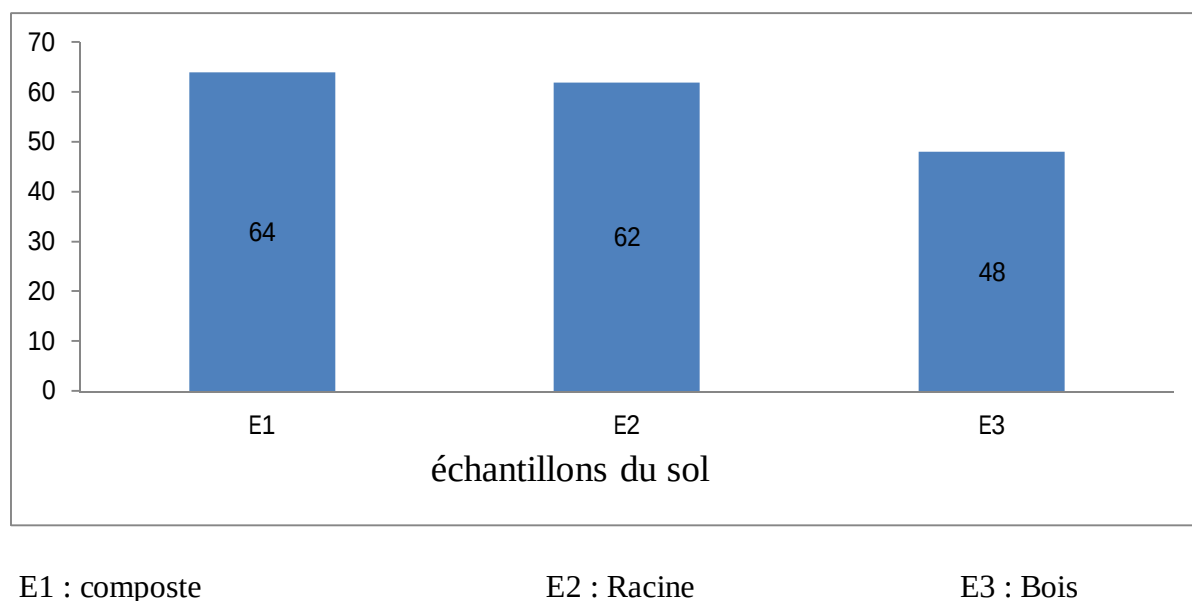


Fig.05 : Isolats obtenus à partir des trois échantillons du sol.

Les résultats ont montré que le sol prélevé sous le composte « E1 » possède le nombre d'isolats le plus élevé par rapport aux 2 autres échantillons, c'est peut-être dû au fait que ce sol est riche en matières organiques et en éléments nutritifs qui favorisent la croissance des *actinomycètes*. Les travaux de Lee et Hwang en (2002) ont rapporté également la même observation.

II.1. Purification des isolats

Les colonies obtenues sont purifiées en repiquant 2 fois sur le milieu R₂A7 ou R₂A9 jusqu'à l'obtention de colonies marron et isolées ayant le même aspect (Fig.6).



(a) : Milieu R₂A7

(b) : Milieu R₂A9

Fig. 06 : Colonies obtenues sur chaque milieu

Parmi les isolats obtenus on a choisi 21 isolats, le critère de sélection est basé sur la couleur des colonies, qui est marron révélatrice de l'oxydation du gaïacol. Les isolats retenus sont représentés dans le Tableau III.

Tableau III : Isolats retenus selon le critère « couleur de colonie ».

Milieu R2A7		Milieu R2A9	
E1	E2	E1	E2
$E_1 10.1.10^{-1}$	$E_2 7.3.10^{-2}$	$E_1 1.2.10^{-7}$	$E_2 5.1.10^{-2}$
$E_1 1.1.10^{-4}$	$E_2 1.1.10^{-2}$	$E_1 10.1.10^{-1}$	$E_2 1.1.10^{-9}$
$E_1 4.1.10^{-5}$	$E_2 7.2.10^{-2}$	$E_1 4.1.a.10^{-1}$	
$E_1 1.3.10^{-4}$	$E_2 4.1.10^{-2}$	$E_1 8.1.10^{-2}$	
$E_1 2.10^{-1}$	$E_2 6.1.10^{-2}$	$E_1 9.10^{-1}$	
$E_1 1.4.10^{-4}$		$E_1 1.1.10^{-7}$	
		$E_1 4.10^{-1}$	
		$E_1 4.1.b.10^{-1}$	

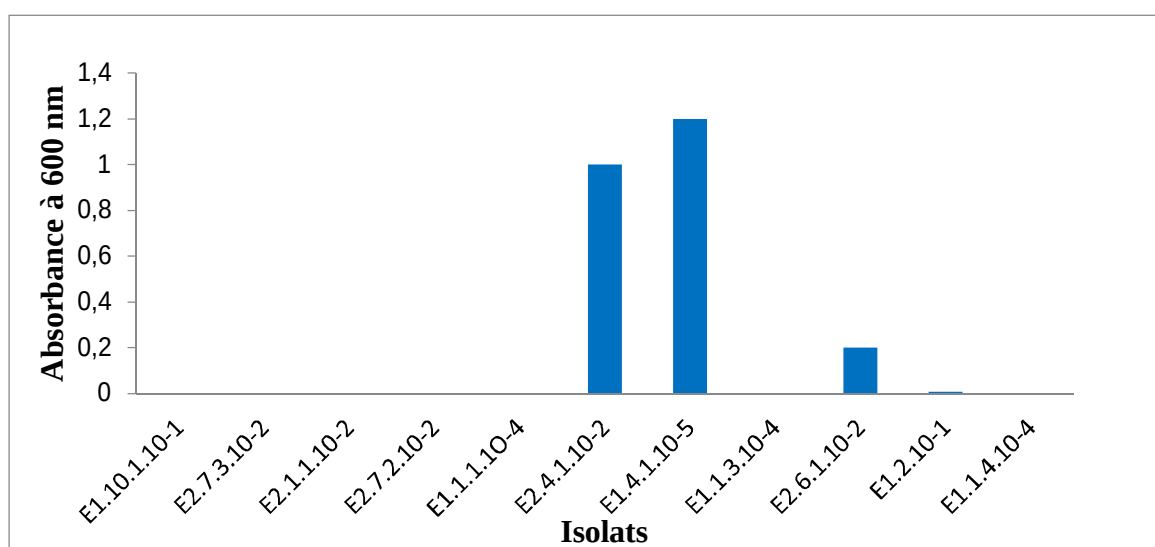
E1 : composte

E2 : Racine

III. Culture sur milieu liquide

Dans cette étape, une préculture de 3 jours est utilisée pour favoriser la croissance des isolats et augmenter leur charge microbienne.

Les absorbances des vingt et un (21) isolats à 600 nm ont révélé une croissance qui diffère d'un isolat à un autre. Les résultats sont représentés dans les Figures 7 et 8.

**Fig. 7** : Croissance des onze (11) isolats dans le milieu R₂A7.

Les résultats d'absorbance ont montré la croissance de quelques isolats avec des taux différents, cette différence est due à leur métabolisme. Les isolats sont ($E_{2.4.1.10^{-2}}$), ($E_{1.4.1.10^{-5}}$), ($E_{2.6.1.10^{-2}}$) et ($E_{1.2.10^{-2}}$).

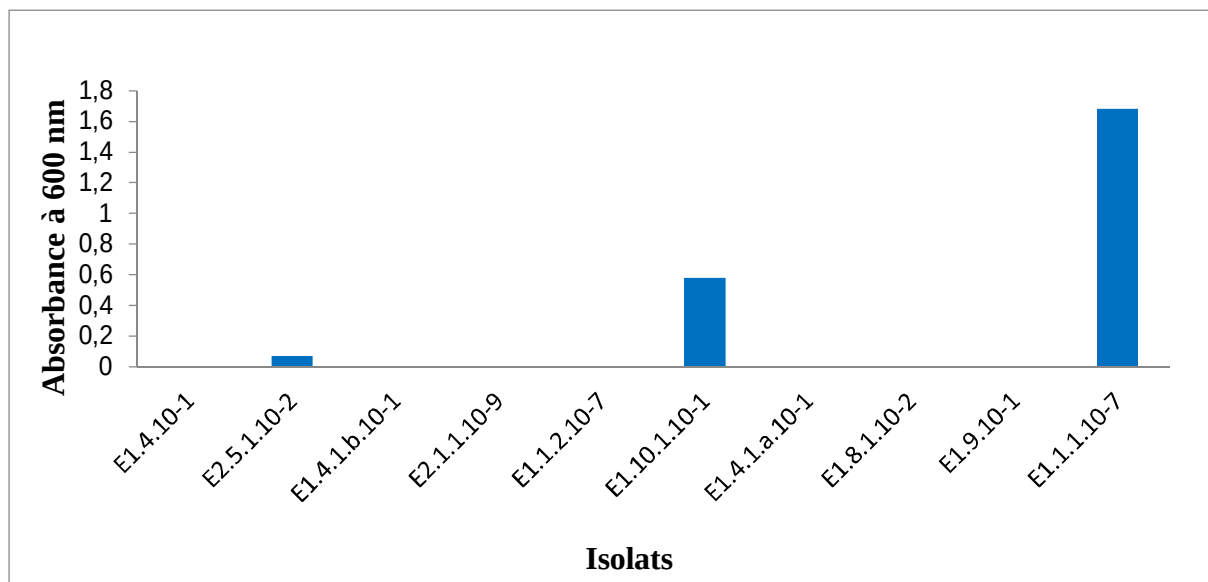


Fig. 08 : Croissance des isolats à 600 nm dans le milieu R₂A9.

D'après Les résultats de l'absorbance, on note une croissance uniquement de trois (03) isolats avec des taux différents d'une espèce à l'autre du à leur métabolisme. Les isolats sont ($E_{2.5.1.10^{-2}}$), ($E_{1.10.1.10^{-1}}$) et ($E_{1.1.1.10^{-7}}$).

III.1. Culture proprement dite

D'après les résultats de l'absorbance à 600 nm, sept isolats dont ($E_{2.4.1.10^{-2}}$), ($E_{1.4.1.10^{-5}}$), ($E_{2.6.1.10^{-2}}$), ($E_{1.2.10^{-2}}$), ($E_{2.5.1.10^{-2}}$), ($E_{1.10.1.10^{-1}}$) et ($E_{1.1.1.10^{-7}}$) qui se sont développés dans les milieux R2A7 et R2A9 ont été retenus (Figure 09).



Fig 09 : Aspect des isolats $E_{2.6.1.10^{-2}}$ et $E_{1.10.1.10^{-1}}$ sur milieux R2A7 et R2A9.

Une culture de 5 jours a été menée à partir de la pré-culture en utilisant les sept (07) isolats (quatre (04) pour le pH 7 et trois (03) pour le pH 9) dans le but de faire un suivi de leur croissance en fonction du temps. Les résultats d'absorbance à 48 h et 96 h de ces isolats sont représentés dans le Tableau IV (annexe).

Les résultats de l'absorbance sont représentés dans la Figures 10 et 11.

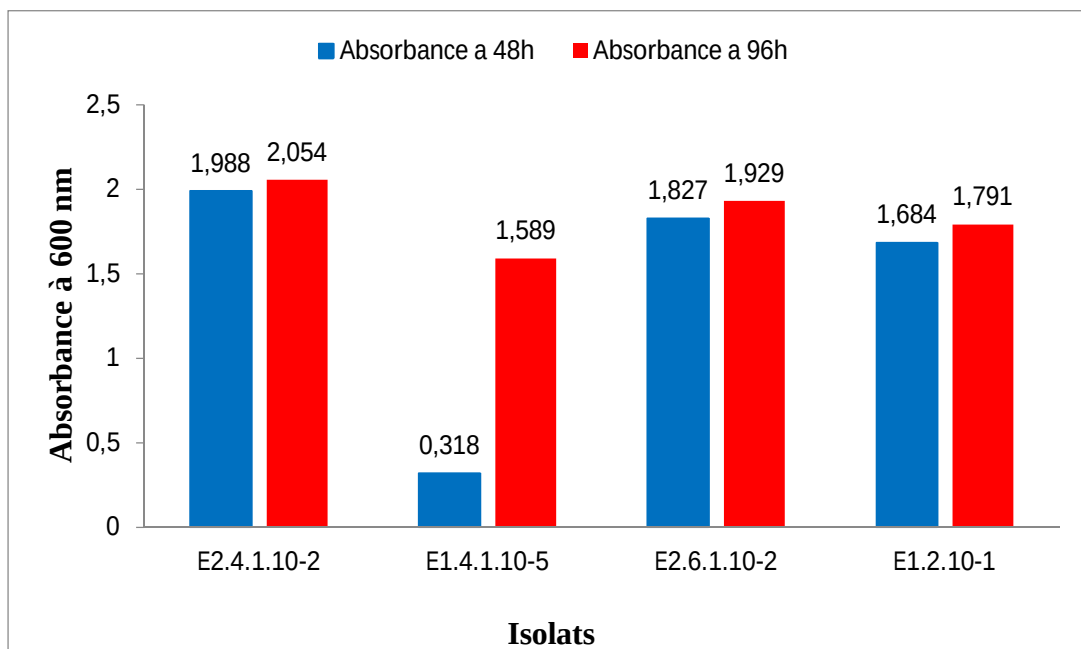


Fig.10: croissance des isolats dans milieu R₂A7

Les résultats de l'absorbance après 5 jours d'incubation ont montré un taux de croissance important pour les isolats ($E_{2.4.1.10^{-2}}$), ($E_{2.6.1.10^{-2}}$) et ($E_{1.2.10^{-1}}$) après 48h. La

prolongation de l'incubation après 96 h n'a pas montré une grande augmentation. Ce qui permet de conclure que les isolats sont en phase stationnaire.

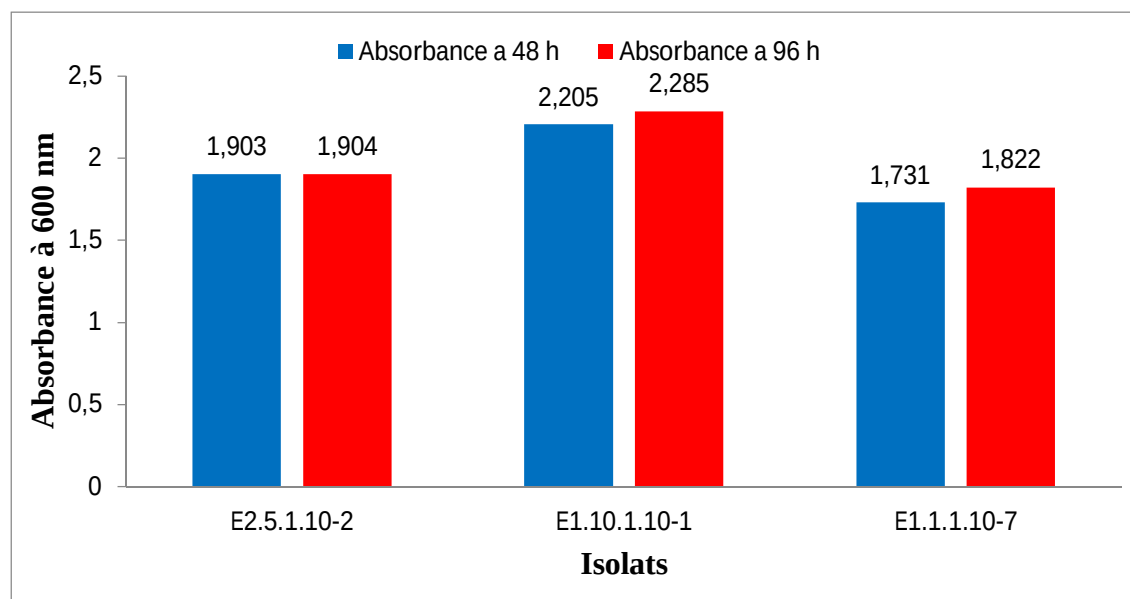


Fig.11 : croissance des isolats dans milieu R₂A9

D'après les résultats d'absorbance, on remarque la croissance de 3 isolats ($E_{2.5.1.10^{-2}}$), ($E_{1.10.1.10^{-1}}$) et ($E_{1.1.1.10^{-7}}$) après 48h d'incubation, qui est presque la même après 96 h. Ce qui permet de conclure que les isolats ont entamé une phase stationnaire

D'après ces résultats, on conclut qu'il y'a eu une croissance différentielle des isolats. Cette différence est peut être due à la variabilité de l'état physiologique de l'inoculum liée à la préparation des pré-cultures et à la particularité de différenciation du genre.

IV. Mesure de l'activité peroxydasique

Le résultat de l'activité enzymatique des sept isolats (4 Sur milieu R2A7 et 3 sur milieu R2A9) est représenté dans les Tableaux V et VI (annexe).

Le résultat de l'activité peroxydasique des quatre isolats qui se sont développés dans le milieu R2A7 sont représentés dans la Figures 12.

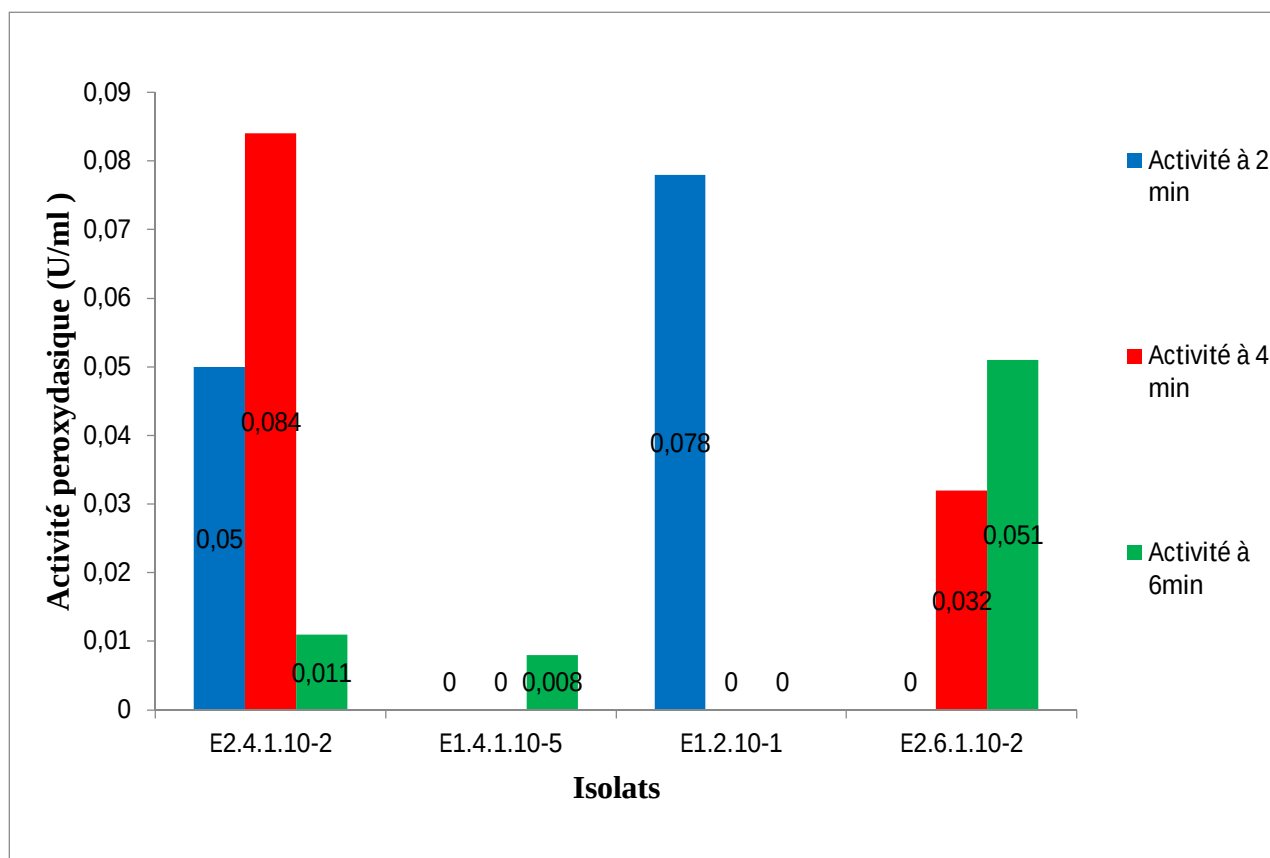


Fig.12 : Activité peroxydasique des 4 isolats a différents temps sur milieu R2A7.

L'isolat ($E_{2.4.1.10^{-2}}$) montre une activité à 2 ,4 et 6 minutes après 5 jours d'incubation. L'activité maximale est obtenue à la quatrième minute avec un taux de 0,084 U/ml.

L'activité peroxydasique de L'isolat $E_{1.4.1.10^{-5}}$ apparait uniquement à la sixième minute avec un taux très faible de 0,008 U/ml.

L'isolat ($E_{1.2.10^{-1}}$) montre uniquement une activité peroxydasique après deux minutes avec un taux de 0,078 U/ml.

L'isolat ($E_{2.6.1.10^{-2}}$) présente une activité peroxydasique à quatre et à six minutes avec un taux maximal de 0,051 U/ml.

L'activité peroxydasique des 3 isolats sur le milieu R2A9 est donnée dans la figure 13.

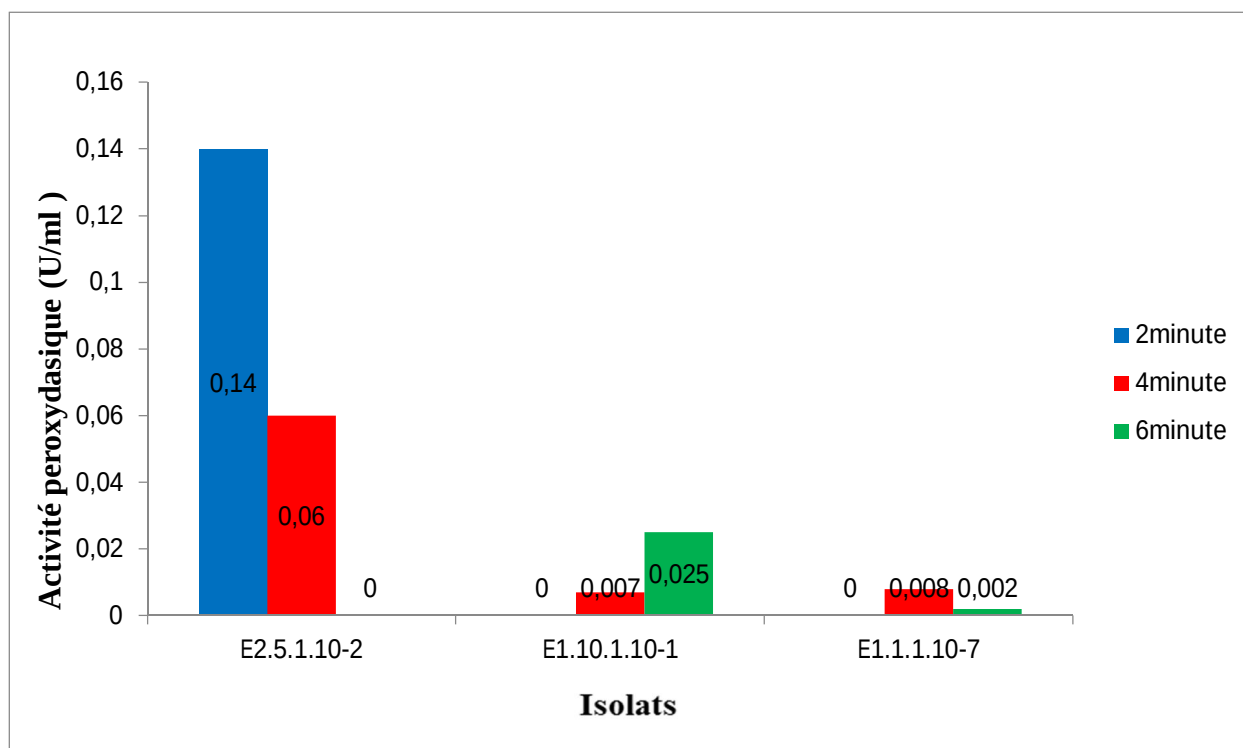


Fig.13 : Activité peroxydasique des 3 isolats sur milieu R2A9

L'isolat ($E_{2.5.1.10^{-2}}$) montre une activité peroxydasique à 2 et à 4 minutes avec un taux maximal de 0,14 U/ml après 5 jours d'incubation.

L'activité peroxydasique de L'isolat ($E_{1.10.1.10^{-1}}$) apparaît à 4 et à 6 minutes avec un taux maximal de 0,025 U/ml à la sixième minute après 5 jours.

L'activité peroxydasique maximale de l'isolat ($E_{1.1.1.10^{-7}}$) apparaît à la quatrième (4) minute avec un taux très 0,008 U/ml.

Les résultats de ce test montrent que chaque isolat exhibe une activité peroxydasique à des temps optimum et chaque enzyme possède un temps optimal d'activité depuis l'initiation de la réaction avec H_2O_2 jusqu'à son arrêt avec la soude pour montrer une activité qui correspond à l'oxydation du substrat (guaïacol) en utilisant H_2O_2 par la peroxydase.

La mesure de l'activité peroxydasique est réalisée selon la méthode de Chance et Maehly (1955).

Ce même test d'activité a été réalisé sur des plantes (racine et feuilles) en utilisant comme substrat analytique le pirogallol, des agents pathogènes ont été utilisés pour induire la production de la peroxydase. (Bateman, 1967).

Mercer, (1996) ont également utilisé ce même test pour déterminer l'activité peroxydasique de 39 souches d'*actinomycètes* en utilisant différents substrats.

V. Sélection des isolats les plus performants

Sur les sept (07) isolats trois (03) présentant les meilleures activités peroxydasiques sont sélectionnés pour effectuer un suivi de 7, 9 et 11 jours.

Les isolats retenus selon l'activité sont rapportés dans le Tableau VII.

Tableau VII : Activité peroxydasique de trois isolats.

R ₂ A7			R ₂ A9		
Nom des isolats	Activité maximale	Temps Optimale	Nom des isolats	Activité maximale	Temps Optimale
E ₂ .6.1.10 ⁻²	0,051 U/ml	6 min	E ₂ .5.1.10 ⁻²	0,14 U/ml	2 min
E ₂ .4.1.10 ⁻²	0,083 U/ml	4 min			

VI. Test de confirmation

Les résultats des tests de confirmation de l'activité sur milieu R₂A7 et R₂A9 sont représentés dans le Tableau VIII (annexe 3).

Les résultats des tests de confirmation de l'activité et de croissance des isolats sur milieu R₂A7 sont représentés dans la Figure 15 et 16.

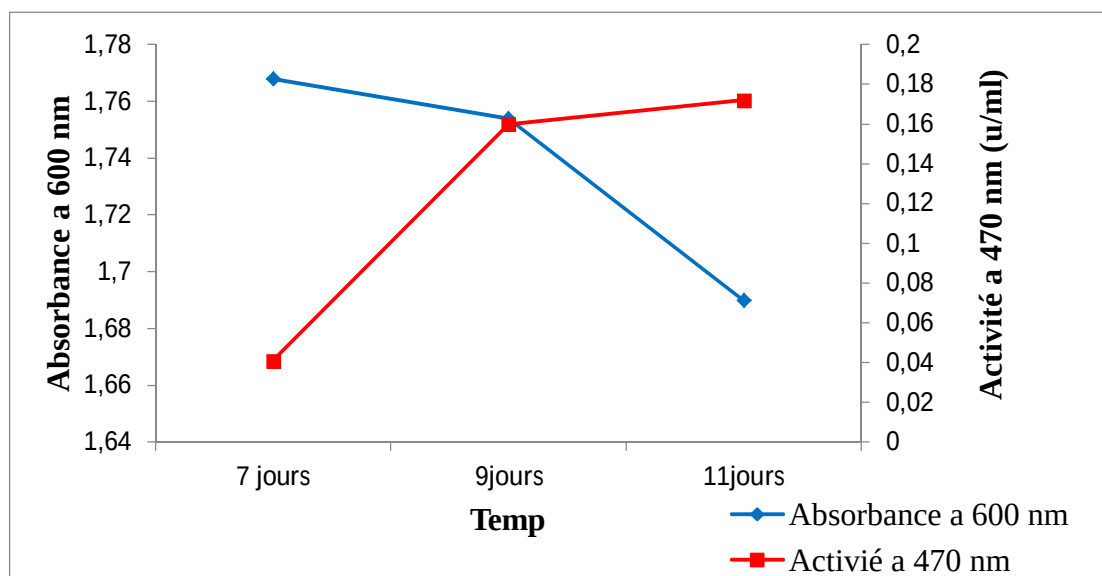


Fig.15 : Suivi de la croissance et de l'activité de l'isolat $E_{2.6.1.10^{-2}}$ dans milieu R2A7 en fonction des jours.

D'après les résultats du test d'activité on remarque que l'activité enzymatique de l'isolat $E_{2.6.1.10^{-2}}$ est de 0,041 U/ml au septième jour par la suite elle augmente jusqu'à atteindre son maximum au onzième jour 0,17 U/ml. L'activité peroxydasique et la croissance ne sont pas dépendantes.

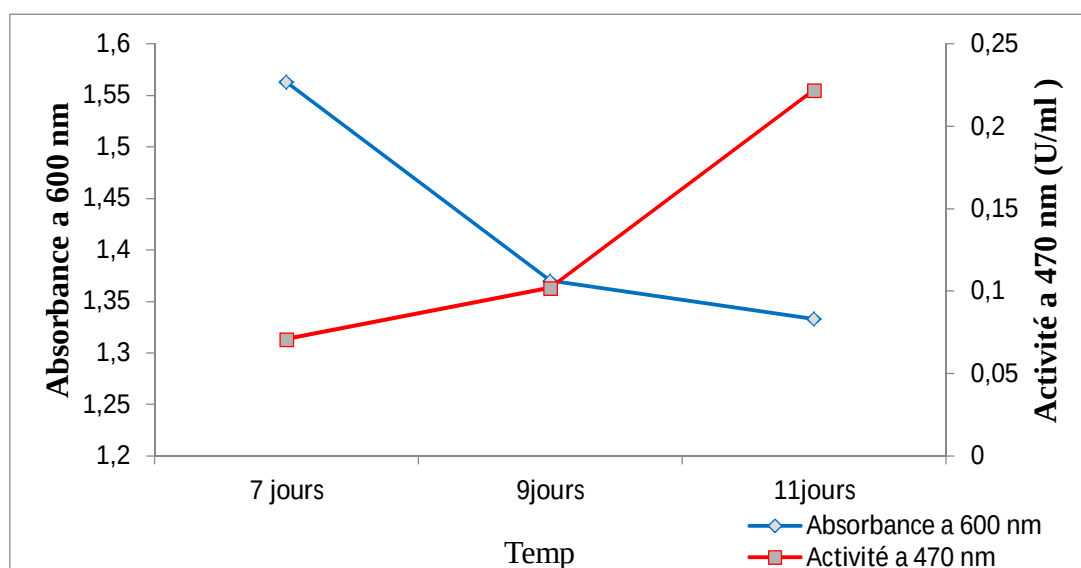


Fig.16 Suivi de la croissance et de l'activité de l'isolat $E_{2.4.1.10^{-2}}$ dans milieu R2A7 en fonction des jours.

Pour l'isolat $E_{2.4.1.10^{-2}}$, son activité peroxydasique augmente progressivement de 0,071 U/ml à 0,22 U/ml. La croissance et l'activité ne sont pas dépendantes

Les résultats du test de confirmation de l'activité et de croissance de l'isolat $E_{2.5.1.10^{-2}}$ dans le milieu R₂A9 sont représentés dans la Figure 17.

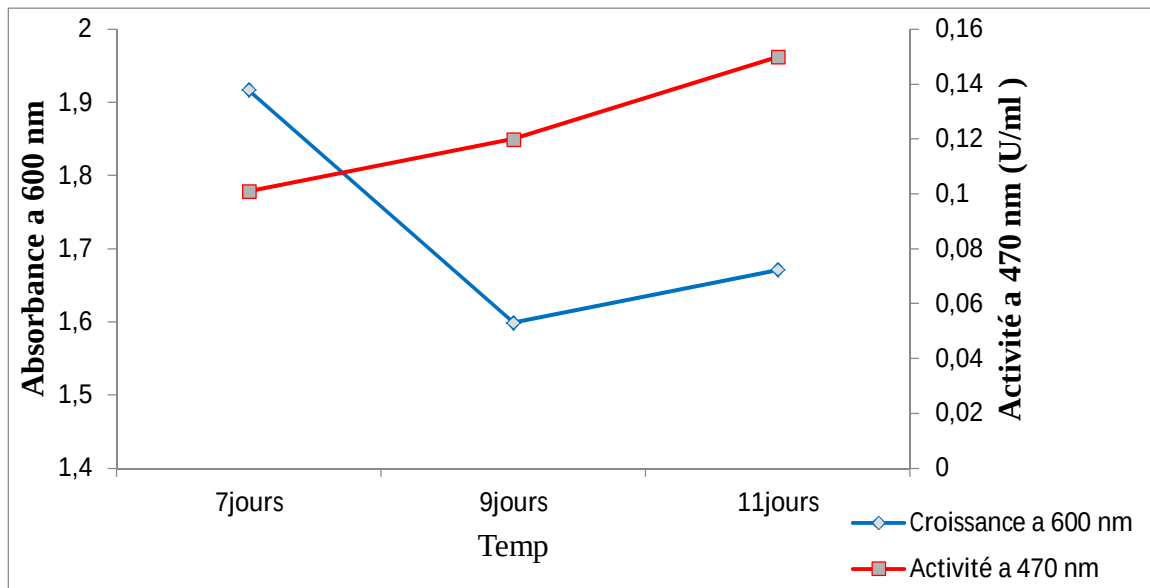


Fig.17 : Suivi de la croissance et de l'activité de l'isolat $E_{2.5.1.10^{-2}}$ dans milieu R2A7 en fonction des jours.

Pour l'isolat $E_{2.5.1.10^{-2}}$, son activité enzymatique augmente de 0,101 U/ml jusqu'à atteindre un niveau plus élevé de 0,15 U/ml, la croissance et l'activité peroxidasique sont indépendantes.

Les résultats des tests d'activités enzymatiques des 3 souches ont montré que les trois isolats présentent une activité peroxydasique extracellulaire indépendante et non associée à la culture.

La figure 18 représente les 3 isolats les plus performants $E_{2.4.1.10^{-2}}$, $E_{2.6.1.10^{-2}}$, $E_{2.5.1.10^{-2}}$

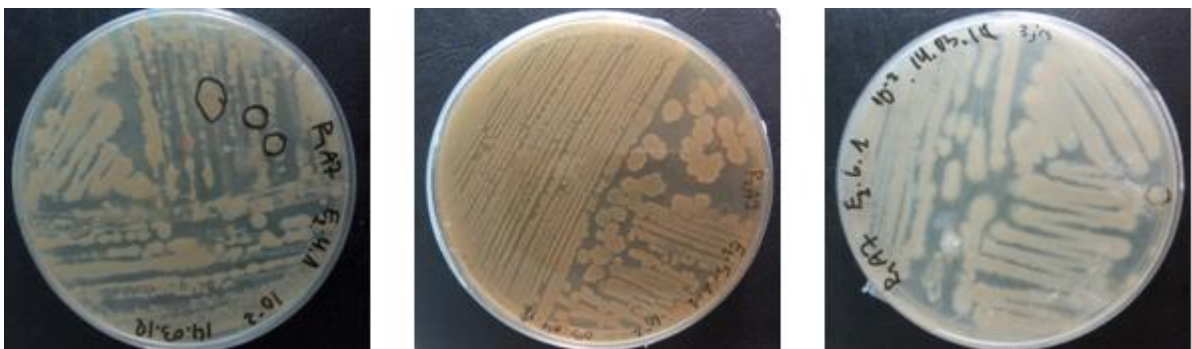


Figure 18 : Isolats les plus performants

Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus par Mercer et Derry, 1996 et Le Roes-Hil, 2011

Tableau IX : Activité peroxydasique produite par des souches d'*actinomycètes*

Les souches	Activité Peroxydase	Référence
<i>Streptomycessp.</i>	4.47 U/ml	Mercer, Derry, 1996
<i>Saccharomonospora viridis</i> BD42	7.14 U/ml	Mercer, Derry, 1996
<i>Thermomonosporasp.</i>	5.76 U/ml	Mercer, Derry, 1996
<i>Streptomycessp. EC5</i>	3.74 U/ml	Mercer, Derry, 1996
<i>T. fusca</i> MC8	>1 U/ml	Mercer, Derry, 1996
<i>Saccharomonospora viridis</i>	>1 U/ml	Mercer, Derry, 1996
<i>Streptomycescoelicolor</i>	0.068 U/ml	Le Roes-Hil 2011
<i>Streptomycesgriseus</i> NRRL B-2165	0.054 U/ml	Le Roes-Hil 2011
<i>Streptomyces</i> MV2	0,131 U/ml	Le Roes-Hil 2011
<i>Streptomyces</i> MV4	0,001 U/ml	Le Roes-Hil 2011
<i>Streptomyces</i> MV19	0,069 U/ml	Le Roes-Hil 2011
E _{2.6.1.10⁻²}	0,172 U/ml	Travail actuel
E _{2.4.1.10⁻²}	0,222 U/ml	Travail actuel
E _{2.5.1.10⁻²}	0,15 U/ml	Travail actuel

La comparaison de nos résultats de l'activité peroxydasique des actinomycètes avec les résultats obtenus par Mercer, Le Roes-Hil montre que l'activité des 3 isolats obtenus est inférieure à celle de *Saccharomonospora viridis* BD42 et *Thermomonosporasp* et on retrouve aussi des activités supérieures à celles de *Streptomyces* MV2 et *Streptomycescoelicolor*.

Cette différence d'activité est liée à l'optimisation de la production enzymatique par des plans d'expériences et au protocole de purification qui donne des activités spécifiques.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de notre travail est l'isolement et la sélection de souches d'actinomycètes telluriques productrices de peroxydase. Cette dernière joue un rôle important en biotechnologie.

Les vastes champs d'application de la peroxydase ont permis de l'exploiter en biotechnologie comme substitut aux méthodes classiques et chimiques et comme remède contre la toxicité dans l'environnement.

Nous avons obtenu un total de 174 isolats. Les tests d'activité peroxydasique nous ont permis de sélectionner 21 isolats issus à partir du sol sur milieux R2A7 et R2A9 dont 3 isolats sont de potentiels producteurs de peroxydases.

Les résultats obtenus semblent prometteurs mais restent préliminaires et méritent d'être approfondis pour arriver à des conclusions définitives et confirmées. Les résultats obtenus durant cette étude nous incitent à poursuivre nos efforts de recherche dans cette thématique, dans le but d'isoler des espèces d'actinomycètes avec une activité peroxydasique qui répondent aux exigences industrielles.

Toutefois, Il serait donc souhaitable de compléter et d'approfondir ce travail par :

- Isolement et sélection d'autres isolats plus performants (ayant des activités supérieures à 1U/ml)
- Optimisation de la production peroxydasique par la méthode des plans d'expériences.
- Purifications de l'enzyme à partir des surnageants de culture afin d'obtenir des activités spécifiques intéressantes dans l'industrie pharmaceutique et pour le dosage analytique.

Ce travail marque le début d'une modeste contribution à l'élaboration d'un projet autour de la peroxydase microbienne, dont l'échéancier de travail nécessite au minimum trois ans.

Listes des Références

A

- Andariambololona T. (2010). Etudes biologiques et chimiques des métabolites secondaires des *actinomycetes* telluriques cas: de la forêt d'Ankafobe. Thèse Maître ès Sciences. Université d'Antananarivo-Madagascar, Faculté des sciences, 6p.
- Augustine, S, K., Bhavsar, S, P., Baserisalehi, M., and Kapadnis, B, P. Isolation and characterization of antifungal activity of an *actinomycete* of soil origin. Indian J ExpBiol. (2004) ; vol. 42, p.928–32.
- Asada, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bioi. (1999) ; vol. 50, p.601-639.
- Antonopoulouse, V, T., Hernadez, M., Arias, M., Mavrakos, E., and Ball, A. The use of extracellular enzyme from *Streptomyces albus* ATCC 300 (for the bleaching of eucalyptus Kraft pulp. appl microbial biotechnol. (2001) ; vol. 57, p.92-97.
- Adhi, T, P., Korus, R, A., Crawford, D, L. Production of major extracellular enzymes during lignocellulose degradation by two streptomy-cetes in agitated submerged culture. Appl. Environ. Microbiol. (1989) ; vol.55, p. 1165-1168.

B

- Benson, D, R., Silvester, W, B. Biology of Frankia strains, actinomycet symbionts of actinorhizal plants. Microbiol Rev. (1993) ; vol. 57, p.293-319.
- BoucheffaK.(2011). Criblage de souches d'*actinomycètes* productrices d'antifongiques non-polyéniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits. Thèse Magister En microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes. Université de Bejaia, Abderrahmane Mira, faculté de la science de la nature et de la vie, 90p.
- Blunt,J, W., Copp, B, R., Keyzers,R, A., Munroa, M, H, G., Prinsep, M, R. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. (2016); vol. 33, p.382-431.
- Bateman DF. (1967).Increase in peroxidase desearsed plant tissue in source book of laboratory exercise in plant pathology. San Fransisco: WH Freeman and Co.
- Bastide, A., De, Méo, M., Andriantsoa, M., Laget, M., and Duménil, G. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure nonpolyéniques. MIRCEN J ApplMicrobiolBiotechnol. (1986) ; vol. 2, p.453-466.

- Bibb, M, J. Regulation of secondary metabolism in Streptomyces. Curr Opin Microbiol. (2005) ; vol. 8, p. 15-208.
- Berry, D, F., Boyd, S, A. Decontamination of soil through enhanced formation of bound residues environ. Sci. Technol. (1985) ; vol. 19, p.1132-1133.

C

- Conn V M. (2005). Molecular Interactions of endophytic *Actinobacteria* in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University, Adelaide, South Australia, 297p.
- Chance, B., Maehly, A, C. Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol. (1955) ; vol. 2, p.764-775.
- Cullen, D. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. J. Biotechnol. (1997) ; vol. 53, p.273- 289.
- Conesa, A., Punt, P, J., van den Hendel, C, A, M, J. Fungal peroxidases : molecular aspects and applications. J. Biotechnol. (2002) ; vol. 93, p.143-158.
- Chung, N., Aust, S, D. Veratryl alcohol-mediated indirect oxidation of pentachlorophenol by lignin peroxidase. Arch. Biochem. Biophys. (1995) ; vol. 322, p.143-148.
- Corvini P. (2000). Étude physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* producteur de pristinamycines: activités enzymatiques du métabolisme central et mesure du Ph intracellulaire (Doctoral dissertation, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL).

D

- Das, S., Ward, L, R., Burke, C. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2008) ; vol. 81, p.419-429.
- Dunford H B. (1999). Heme peroxidases. Wiley-VCH (H: Brian Dunford Ed.). New York : 507p.
- Doull, J, C., Vining, L, C. Physiology of antibiotic production in *actinomycetes* and some control mechanisms. Biotech. Adv. (1990); vol. 8, p.141-158.
- Demain, A, L., Lancini, G. Bacterial pharmaceutical products. The Prokaryotes Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology. (2006) ; vol. 1, p.812-833.

E

- Everse, J., Everse, K, E., Grisham, M, B. Peroxidases in chemistry and biology, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1990) ; vol. 1.

F

- Fiedler, H, P., Bruntner, C., Bull, A, T., Ward, A, C., Goodfellow, M., Potterat, O., ... and Mihm, G. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Leeuwenhoek*. (2005) ; vol. 87, p.37-42.
- Fguira, L, F, B., Fotso, S., Ameer-Mehdi, R, B., Mellouli, L., and Laatsch, H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Res Microbiol*. (2005) ; vol. 156, n°3, p.341-347.
- Faguy, D, M., Doolittle, W, F. Horizontal transfer of catalase-peroxidase genes between archaea and pathogenic bacteria. *Trends Gen*. (2000) ; vol. 16, p.196-197.

G

- Gottlieb D. (1973). General consideration and implication of the *Actinomycetales*. In: *Actinomycetales* characteristics and practical importance. Edited: G. Sykes and F.A. Skinner. Academic Press. London, New York.
- Goodfellow, M., Williams, S, T. Ecology of *Actinomycètes*. *Annual Review of Microbiology*. (1983) ; vol. 37, p.189-216.
- Gesheva, V., Ivanova, V., Gesheva, R. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res*. (2005) ; vol. 160, p.243-248.
- Godden, B., Ball, A, S., Helvenstein, P., McCarthy, A, J., and Penninckx, M, J. Towards elucidation of the lignin degradation pathway in *actinomyces*. *J. Gen. Microbiol*. (1992) ; vol.138, n°11, p.2441-2448.
- Glenn, J, K., Akileswaran, L., Gold, M, H. –Mn (II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys*. (1986) ; vol. 251, p.688-696.
- Grigorenk, V., Andreeva, I., Borchers, T., Spener, F., and Egorov, A. A genetically fusion protein with horseradish peroxidase as a marker enzyme for use in competitive immunoassays. *Anal chem*. (2001) ; vol. 73, n°6, p.1134-1139.
- Goodfellow, M. Phylum XXVI. Actinobacteria in: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Whitman WB, Goodfellow M, Kampfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki k, Parte A. (2012) ; vol. 5, p.34-2028.

H

- Hopwood DA., Bibb MJ., Chater KF. (1985). Genetic Manipulation of *Streptomyces*, Colney, Norwich NR4, England.

J

- Jensen, P, R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T, C., Fenical, W. Culture marine *actinomycetes* diversity from tropical Pacific Ocean sediments. Environ Microbiol. (2005) ; vol. 7, p.1039.

K

- Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries *actinomycétales* productrices d'antibiotiques à partir d'écosystème extrême. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat d'état en Microbiologie appliquée. Université des frères Mentouri Constantine, 170p.
- Kekuda, Prashith, T, R., Rakesh, K, N., Syed, J., et al. Antibacterial and antioxidant activities of *Streptomyces* species Srdp-H03 Isolated from soil of Hosudi, Karnataka, India. Journal of Drug Delivery & Therapeutics. (2013) ; vol. 3, n°4, p.47-53.
- Kjalke, M., Andersen, M, B., Schneider, P., Christensen, B., Schulein, M and Welinder, K, G. Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Arthromyces ramosus*. Biochim.Biophys.Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology. (1992) ; vol. 1120, p.248-256.
- Kunishima, N., Fukuyama, K., Matsubara, H., Hatanaka, H., Shibano, Y and Amachi, T. Crystal structure of the fungal peroxidase from *Arthromyces ramosus* at 1.9 Å resolution. Structural comparisons with the lignin and cytochrome c peroxidases. J. Mol. Biol. (1994); vol. 235, p.331-344.
- Kalın, R., Atasever, A., Özdemir, H. The single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L) and turnip (*Brassica rapa* L) roots. Food Chemistry. (2014) ; vol. 150, p.335-340.
- Küster, E., Williams, S, T. Selection of media for isolation of *streptomyces* Nature. (1964); vol. 202, n°4935, p.928.
- Kula, M, R., Kroner, K, H., and Hustedt, H. (1982). Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. In reaction engineering Springer, Berlin, Heidelberg, pp.73-118.

L

- Larpent J P., Sanglier J J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Editions Masson. Paris : 481p.
- Lefebvre T. (2008). Associations biologiques entre les termites du genre *Nasutitermes* et leur microflore *actinomycétale*: spécificité et évolution. Thèse doc : Ecole doctorale Science de la Vie et de la Santé, Paris, 168p.
- Lam, K, S. Discovery of novel metabolites from marine *actinomycetes*. Curr Opin Microbiol. (2006) ; vol. 92, p.45-51.
- Lechevalier, M, P., Lechevalier, H, A. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic *actinomycetes*. International Journal of Systematic Bacteriology. (1970) ; vol. 20, p.435-443.
- Lechevalier MP. (1967). Ecological associations involving *actinomycetes*. In: Actinomycetes. Shal and pulverer (Eds). Zbl. Bakt. Suppl. (1981) ; vol. 11, p.159-166.
- Lechevalier, H, A., Lechevalier, M, P. Biology of *actinomycetes*. Annual Reviews in Microbiology. (1967) ; vol. 21, n°1, p.71-100.
- Lee, J, Y., Hwang, B, K. Diversity of antifungal *actinomycetes* in various vegetative soils of Korea. Canadian journal of microbiology. (2002) ; vol. 48, n°5, p.407-417.
- Le Roes-Hill., Marilize., Nuraan Khan., Burton, S, G. "Actinobacterial peroxidases: an unexplored resource for biocatalysis." Applied biochemistry and biotechnology. (2011) ; vol. 164, n°5, p.681-713.
- Lechevalier MP. (1981). Ecological associations involving actinomycetes. In: Actinomycetes. Shal and pulverer (Eds.). Zbl. Bakt. Suppl. vol. 11. p.159-166.
- Le Roes-Hill., Marilize., Jeffrey Rohland., Burton, S. "Actinobacteria isolated from termite guts as a source of novel oxidative enzymes." Antonie Van Leeuwenhoek. (2011) ; vol. 100, n°4, p.589-605.

M

- Mariat F., Sebald M. (1990). Les *actinomycetes*. Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, SK. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. Microbiol Res. (2014) ; vol. 169, p.262-278.

- Morita, S., Kaminaka, H., Masumura, T., and Tanaka, K. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress ; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. *Plant Cell Physiol.* (1999) ; vol. 40,n°4, p.417-422.
- Mercer, D, K., Iqbal, M., Miller, P., and McCarthy, A, J. "Screening actinomycetes for extracellular peroxidase activity. " *Applied and Environmental Microbiology.* (1996) ; vol. 62, n°6, p.2186-2190.

O

- Otto H J. (1998).Écologie forestière.Institut pour le développement forestier : Paris. pp.397.
- Omura, S., Tanaka, Y., Taki, A., Masuma, R. Mechanism of nitrogen regulation of protylenolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.* (1986) ; vol. 39, p.813-821.
- Oskay, A., Mustafa., Tamer Ü., and Azeri C. Antibacterial activity of some *actinomycetes* isolated from farmingsoils of Turkey. *Afr J Biotechnol.* (2004) ; vol. 3, n°9, p.441-446.

P

- Perrine-Walker, F., Gherbi, H., Imanishi, L., Hoher, V., Ghodhbane-Gtari, F., Lavenus, J., ... and Laplaze, L. Symbiotic signaling in actinorhizal symbioses. *Curr Protein Pept Sci.* (2011) ; vol. 12,n°2, p.156-164.
- Prescott LM., Harley JP., Klein DA. (2010). *Microbiologie.* De Boeck : Bruxelles. 3^{ème} édition, pp.1088.
- Pelmont J. (1998). *Enzymes.* Presses Universitaires De Grenoble. ISBN 2 7061 03659.
- Pochon, J.,Tradieux, P. *Techniques d'analyses en microbiologie du sol* Edition de la tourelle, St Mandé. (1962) ; p.110-111.

R

- Ramachandra, M., Crawford, D, L., Hertel, G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic *actinomycete* *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* (1988) ; vol. 54, p.3057–3063.

- Rompel, A., Albers, M., NaserI, J, I., Gerdemann, C., Büldt-Karentzopoulos, K., Jasper, B., and Krebs, B. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoeabatatas*). *Biochimica et BiophysicaActa*. (2007) ; vol. 1774,n°11, p.1422-1430.
- Rokem, J, S., Lantz, A, E., Nielsen, J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat Prod Rep*. (2007) ; vol. 24, p.1262–87.
- Reasoner, D, J., Gelreich, E, E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *AppliedEnvironmentalMicrobiology*. (1985) ; vol. 49, p.1.

S

- SmaouiS. (2010). Purification et Caractérisation de Biomoléculesà partir de microorganismes nouvellement isoléset identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement, Université de Toulouse, France, 207p.
- Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismesnouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse, France. 251p.
- Stackebrandt, E., Schumann, P. Description of *Bogoriellaceafam*. Nov,*Dermacocaceafam*. Nov. *Rarobacteraceafam*.Nov. and *Sanguibacterceafam* Nov. andemandation of some familiesof the suborder *Micromcoccineae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. (2000) ; vol.50, p.1279-1285.
- Sujatha P., BapiRaju, K, V., Ramana, T. Studies on a new marine *Streptomycete* BT 408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res*. (2005) ;vol. 160,p.119-126.
- Sişecioglu, M., Gülçin, İ.,Çankaya, M., Atasever, A., Şehito ğ lu, M, H., Budak Kaya, H., et *al*. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanussativus* L.). *Journal ofMedicinal Plants Research*. (2010) ;vol. 4, p.1187-1196.
- Sreenivasulu, N., Ramanjulu, S., Ramachandra-Kini, K., Praskash, H, S., Shekar-Shetty, H., Savithri, H, S.,et *al*. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars offox-tail millet with differential salt tolerance. *Plant Science*. (1999) ; vol. 141, p.1 – 9.
- Smirnoff, N. Ascorbic acid: metabolism and func-tions of a multi-facettted molecule. *Cur. Op. PlantBioi*. (2000) ; vol. 3, p.229-235.

- Subramani, R., Aalbersberg, W. Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2013) ;vol. 97, n°21,p.9291-321.
- Solano, G., Jiménez, K, R., Jaspars, M., et al. Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica. *AntonieVan Leeuwenhoek.* (2009) ; vol. 96, p.71-8.
- Sanglier, J, J., Turjillo, M. Substance bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de selection des souches.*Bulltin de la société Française et Microbiologie.* (1997) ; vol. 12,n°13.
- Stackebrandt, E., Woese, C, R. The evolution of procaryotes.*Synopsia of the society for general microbiology.* (1981) ; vol. 32, p.1-31.
- Saini, A., Neeraj, K., Aggarwal., Sharma., Anuja., et *al.* Actinomycetes a Source of Lignocellulolytic Enzymes. *Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research.* (2015) ; vol. 2015, n°1.
- Saida MM. (2012). Peroxydase d'origine Végétale: purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application dans la détermination des peroxydes au niveau des aliments conservés (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar de Annaba).

T

- Theilleux J. (1993). Les actinomycètes In : *Microbiologie industrielle Les microorganismes d'intérêt industriel*, Lavoisier, Tech et Doc, vol 612, p 425.
- Tuomela, M., Vikman, M.,Hatakka, A.,and Itävaara, M. Biodegradation of lignin in a compost environnement: areview. *Bioressource Technology.* (2000) ; vol. 72,n°2, p.169-183.
- Thompson, R, Q. Peroxidase-basecolorimetric of l-ascorbic acid. *anal chem.* (1987) ; vol. 59, p.119-1121.

V

- Velikova, V., Pinelli, P., Loreto, F. Consequences of inhibition of isoprene synthesis in *Phragmitesaustralis* leaves exposed to elevated temperatures. *Agriculture, Ecosystems & Environment.* (2005) ; vol. 106, p.209-217.
- Varela, E., Martinez, A, T., Martinez, M, J. Southern blot screening for lignin peroxidase and aryl-alcohol oxidasegenesin30fungal species.*J. Biotechnol.* (2000) ; vol. 83, p.245-251..

- Valli, K., Wariishi, H., Gold, M, H. Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. *Biochemistry*. (1990) ; vol. 29, p.8535-8539.
- Veld, F., Van Rantwijk, k, F., Sheldon, R, A. Improving the catalytic performance of peroxidase in organic synthesis. *TRIENDS BIOTECHNOL.* (2001) ; vol. 19, p.73-80.

W

- Williams, S, T., Locci, R., West, M. Detection and identification of novel *actinomycetes*. *Microbiology*. (1993) ;vol. 144, p.653-656.
- Wang, Y, H., Yang, B., Ren, J., Dong, M, L., Liang, D., and Xu, A, L. Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochem.* (2005) ; vol. 40,n°3-4, p.1161-1166.
- Welinder. (1992). Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinuscinereus*, *Coprinusmacrorrhizus* and *Arthromyces ramosus*. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. Vol. 1120, p.248-256.

Y

- Yonetani, T.,Ohnishi, T. Cytochrome c peroxidase, a mitochondrial enzyme of yeast. *J. Bioi. Chem.* (1966) ; vol. 241, p.2983-2984.
- Yemenicio, ğ, lu, A., Özkan, M., Cemer, ğ,lu, B. Partial purification and thermal characterization of peroxidase from okra (*Hibiscus esculentum*). *Journal of Agriculture Food Chemistry*. (1998) ;vol. 46, p.4158-4163.
- Ye, X, Y., Nag. Isolation of a novel peroxidase from French bean legumes and first demonstration of antifungal activity of a non-milk peroxidase. *Lifsci.* (2002) ; vol. 71, n°14. P.80-1667.

Z

- Zheng, B., Li, J., Liu, C., Li, B., Yuan, H and Yang, J. Identification and molecular characterization of a novel DyP-Type peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa* PKE117. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (2012) ; vol. 166,n°3, p.774-785.
- Zamocky, M., Janecek, S., Koller, F. Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. *Gene*. (2000) ; vol. 256, p.169-182.

Annexes

Annexe 1 : matériel utilisé et leur marques

- Balance SHIMADZU UX620H
- Bain mari GFL
- Bain mari sous agitation MEMMERT
- pH mètre HANNA instruments
- Etuve NUVE incubator EN 055
- Centrifuge HETTICH zentrifugen
- Spectrophotomètre SHIMADZU UV mini-1240
- Vortex VELP SCIENTIFIKA
- Autoclave ADVANTAGE-LAB Model AL02-12
- Plaque agitatrice VELP scientifica
- Centrifuge à froid CENTURION SCIENTIFIC K3 SERIES
- Fourre pasteur HERAEUS

Annexe 2 : milieu de culture

Milieu solide

Préparation d'un milieu de culture R2A modifier et additionner de gaïacol qui permet la croissance des actinomycètes selon la composition suivante :

- Extrait de levure1g
- Peptone1g
- Casamino acide remplacé par le Tryptone.....1g
- Glucose1g
- Amidon soluble1g
- Tartrates de sodium remplace par le tartrate de sodium
de potassium tétra hydrate0,6g
- Dipotasium phosphate hypta hydrate K_2HPO_4 0, 6g
- Agar.....17g
- Eau distillée1L
- pH7 et 9
- Gaïacol.....0,066 ml / 150 ml

Milieu Liquide

Préparation d'un milieu de culture qui permet la croissance des actinomycètes selon la composition suivante :

- Extrait de levure1g
- Peptone.....1g
- Casamino acide remplacer par le Tryptonne1g
- Glucose.....1g
- Amidon soluble.....1g
- Tartrates de sodium remplace par le tartrate de sodium
de potassium tétra hydrate0, 6g
- Dipotasium phosphate hypta hydrate K_2HPO_4 0,6g
- Eau distillée1L
- pH7 / 9
- Gaïacol.....0,066 ml / 150 ml

Solution tampon phosphate à 100 mM

- K_2HPO_40,871g/50ml
- KH_2PO_40,6804g /50ml
- pH.....7

Pour préparer une solution tampon phosphate a 100mM on a pesé 0.871g de K_2HPO_4 et on la dessous dans 50ml d'eaux distille ensuite on a pesé également 0,6804g de KH_2PO_4 dans 50mld'eaux distille. Ajustement le ph à 7 ont mélangeant les 2 solutions

Solution gaïacol a 20 mM

- Gaïacol.....0.125g/50ml

Préparation de H_2O_2 a 50 mM

- H_2O_20,085g/50ml

Préparation Solution NaOH a 5M

- NaOH10g/50ml

Annexe 3

Tableau IV : Mesure de la croissance des sept isolats.

R ₂ A7		R ₂ A9	
Nom des isolats	Absorbance	Nom des souches	Absorbance
E2.4.1.10-2	2,054	E ₂ .5.1.10 ⁻²	1,904
E1.4.1.10-5	1,589	E ₁ .10.1.10 ⁻¹	2,285
E2.6.1.10-2	1,929	E ₁ .1.1.10 ⁻⁷	1,822
E1.2.10-1	1,791		

Tableau V: Résultat de l'activité à 470 nm sur milieu R2A7

Nom des isolats	Absorbance	Absorbance	Absorbance
	2 minutes	4 minutes	6 minutes
E ₂ .4.1.10 ⁻²	0,05	0,084	0,011
E ₁ .4.1.10 ⁻⁵	0	0	0,008
E ₁ .2.10 ⁻¹	0,078	0	0
E ₂ .6.1.10 ⁻²	0	0,032	0,051

Tableau VI: Résultat de l'activité à 470 nm sur milieu R2A9

Nom des isolats	Absorbance 2minute	Absorbance 4minute	Absorbance 6minute
E2.5.1.10-2	0,14	0,06	0
E ₁ .10.1.10 ⁻¹	0	0,007	0,025
E ₁ .1.1.10 ⁻⁷	0	0,008	0,002

Tableau VIII : Croissance des isolats après 7,9 et 11 jour d'incubation.

R ₂ A7				R ₂ A9			
Nom des isolats	7 jours	9jours	11jours	Nom des souches	7jours	9jours	11jours
E2.6.1.10-2	1,768	1,754	1,69	E2.5.1.10-2	1,917	1,599	1,671
E2.4.1.10-2	1,563	1,37	1,333				

Résumé

L'analyse de 3 échantillons de sol provenant de la région d'Akbou sur milieu de culture R2A modifié et additionné de gaïacol, a permis l'isolement de 174 isolats dont 21 isolats d'*actinomycètes*. Leur sélection est basée sur leur aspect morphologique et la coloration des colonies sur milieu d'isolement.

L'activité perxydasique des 21 isolats est identifiée par l'oxydation du substrat à savoir le gaïacol avec H_2O_2 permettant ainsi la sélection de 7 souches d'*actinomycètes*.

Les tests de suivi d'activités peroxydasique réalisé sur les sept isolats on permit la sélection de 3 souches d'*actinomycètes* productrices potentielles de peroxydases.

L'activité optimale des 3 isolats est déterminée par une cinétique de croissance et d'activité peroxydasique à 7, 9 et 11 jours et leurs valeurs sont les suivantes :

L'isolat $E_{2.6.1.10^{-2}}$: 0,172 U/ ml, l'isolat $E_{2.4.1.10^{-2}}$: 0,222 U/ ml et l'isolat $E_{2.5.1.10^{-2}}$: 0,15 U/ ml.

Mots-clés : Actinomycète, gaïacol, peroxydase, activité peroxydasique

Abstract

The analysis of 3 soil samples from the Akbou region in modified R2A culture medium supplemented with guaiacol, allowed the isolation of 174 strains including 21 strains of actinomycetes. Their selection is based on their morphological aspect and the coloring of the colonies on isolation medium.

The peroxidase activity of the 21 isolates is measured by the substrate oxidations, namely guaiacol with H_2O_2 wich, allow the selection of 7 actinomycetes.

The peroxidase activitys, monitoring tests is carried out on theseven isolate wich allowed the selection of 3 potential actinomycetes isolates producing peroxidase.

The optimal activity of the 3 isolates is determined by the time course of growth and peroxidase activity. The values are $E_{2.6.1.10^{-2}}$: 0.172 U / ml, $E_{2.4.1.10^{-2}}$: 0.222 U / ml and $E_{2.5.1.10^{-2}}$: 0.15 U / ml.

Keywords: Actinomycete, guaiacol, peroxidase, peroxidase activity