

50376
1994
197

N° d'ordre : 1326

50376
1994
197

T H E S E D E D O C T O R A T

d e

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Option : Microbiologie

présentée par

Khadija KHATTABI DARI

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

ACTIVITES CATABOLIQUES DE STREPTOMYCES SP SUR DES
PREPARATIONS D'ACIDES HUMIQUES NATURELS OU DE SYNTHESE

Soutenue le jeudi 7 juillet 1994, devant la Commission d'Examen :

Président : Professeur R. TAILLIEZ, Université de Lille I

Rapporteurs : Professeur N. TRUFFAUT, Université de Compiègne
Professeur P. VASSEUR, Université de Metz

Examineurs : Professeur R. BLONDEAU, Université de Lille I
Professeur S. BOUQUELET, Université de Lille I
Docteur J. DEBETTE, Université de Lille I

Je dédie cette Thèse

A mes parents, en témoignage de ma reconnaissance pour
tous les sacrifices qu'ils ont consentis
pour moi

A mon mari, d'avoir été très patient

A ma famille

R E M E R C I E M E N T S

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Microbiologie, dirigé par Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ à l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Je remercie vivement M. le Professeur R. TAILLIEZ de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Microbiologie. Il me fait un grand honneur en acceptant de présider le Jury de cette Thèse.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance la plus sincère à M. le Professeur R. BLONDEAU. Il m'a guidée tout au long de ce travail et a suivi de très près sa progression. Je ne saurai assez le remercier.

Toute ma gratitude va aussi à Mlle le Professeur P. VASSEUR de l'Université de Metz (Centre des Sciences de l'Environnement) ainsi qu'à Mme le Professeur N. TRUFFAUT de l'Université de Technologie de Compiègne (Laboratoire de Génétique Microbienne) qui ont accepté avec une extrême gentillesse la lourde tâche d'être Rapporteurs de ce travail, malgré leur peu de disponibilité. Je leur suis très reconnaissante et je leur exprime mes vifs remerciements.

Je remercie de même pour sa participation à ce Jury Mlle J. DEBETTE, Maître de Conférences à l'IUT de Biologie appliquée et dont les qualités de chercheur et d'enseignante sont telles que j'éprouve une grande admiration envers elle.

Mes remerciements vont également à M. le Professeur S. BOUQUELET de l'Université de Lille pour l'intérêt qu'il témoigne pour mon travail en acceptant de faire partie du Jury de cette Thèse.

L'essentiel de la dactylographie de ce Mémoire a été mené à bien par Mme M. DELECOURT. Je la remercie vivement pour la gentillesse et la disponibilité dont elle a fait preuve à mon égard.

J'exprime mes vifs remerciements à tous mes Collègues, à l'ensemble du Personnel du Laboratoire de Microbiologie et tout particulièrement à M. Max BECHET pour leur aide et leur sympathie.

Un merci tout particulier à mes parents, à Abdelkrim, mon mari, à mes soeurs, à Malika et à mes frères pour leur soutien moral constant qui m'a encouragée tout au long de ces années.

R E S U M E

Une collection de Streptomyces capables de décolorer des acides humiques a été isolée et caractérisée par des méthodes biochimiques et microbiologiques. Six souches présentant des phénotypes distincts et des réponses régulières sur les acides humiques en milieu liquide ont été sélectionnées pour aborder des analyses plus approfondies. Les modalités de la biodégradation ont été étudiées en présence d'acides humiques naturels ou de composés de synthèse radioactifs obtenus par réaction de Maillard. Les résultats ont montré que l'activité catabolique, localisée à la surface des cellules bactériennes, est dépendante de la présence d'une source de carbone annexe assimilable, et stimuable par la présence de l'oxygène. L'activité peroxydasique des extraits acellulaires, mise en évidence avec le tétraméthyl-1,4-phénylène diamine, a permis de distinguer deux groupes parmi les souches, en fonction du poids moléculaire de leur peroxydase majeure qui a été purifiée. Les activités catalase et superoxyde dismutase ont également fait l'objet d'analyses mais ne semblent pas en relation avec les phénomènes précédents. Enfin, une approche génétique a été entreprise pour essayer de comprendre l'origine de l'instabilité des souches qui, dans les conditions expérimentales employées, présentent parfois une variabilité importante de leur réponse catabolique.

T A B L E D E S M A T I E R E S

- o o o -

I N T R O D U C T I O N

I. -	LES COMPOSES HUMIQUES DU SOL	10
	<u>L'humus et le cycle biologique du carbone</u>	11
	<u>Le concept de l'humus</u>	13
	<u>Composition et structure des composés humiques</u>	14
	<u>Acides humiques de synthèse : les mélanoidines</u>	17
	<u>La biorésistance des composés humiques</u>	17
	<u>Le problème du turn-over de l'humus</u>	19
II. -	GENERALITES SUR LES <u>STREPTOMYCES</u>	22
	<u>Morphologie et cycle biologique des Streptomyces</u>	23
	<u>Problèmes posés par l'identification des Actinomycètes</u>	24
	<u>Streptomyces, source d'antibiotiques</u>	26
	<u>Particularité du génome des Streptomyces</u>	28

P A R T I E I - I S O L E M E N T E T C A R A C T E R I S A T I O N D ' U N E C O L L E C T I O N D E S O U C H E S B A C T E R I E N N E S D E C O L O R A N T L E S A C I D E S H U M I Q U E S

I. -	INTRODUCTION	30
II. -	MATERIELS ET METHODES	30
A. -	<u>Isolement des souches</u>	30
B. -	<u>Entretien et conservation des souches</u>	31
	1 - Milieu utilisé pour l'entretien	31

2 - Milieu utilisé pour la conservation	31
3 - Lyophilisation	31
C. - <u>Préparations des inoculums</u>	31
D. - <u>Etude de la composition chimique des parois bactériennes</u>	32
E. - <u>Utilisation de différentes sources de carbone</u>	32
F. - <u>Recherche des activités enzymatiques</u>	32
G. - <u>Résistance aux antibiotiques</u>	33
H. - <u>Mise en évidence de la production de sidérophores</u>	33
III. - RESULTATS	34
A. - <u>Souches isolées</u>	34
B. - <u>Caractérisation des souches isolées</u>	36
1 - Examen morphologique	36
2 - Recherche de la forme isomérique de l'acide diaminopimélique	36
3 - Utilisation des sucres	39
4 - Activités enzymatiques	41
5 - Résistance aux antibiotiques	41
IV. - DISCUSSION	44
 P A R T I E II - ANALYSE DE L'ACTIVITE CATABOLIQUE DES SOUCHES	
I. - INTRODUCTION	46
II. - MATERIELS ET METHODES	46

A. - <u>Extraction et purification des acides humiques utilisés</u>	46
1 - Extraction à partir d'un échantillon de sol	46
2 - Purification d'un produit commercialisé	47
B. - <u>Synthèse des mélanoidines</u>	47
C. - <u>Milieux de cultures</u>	48
D. - <u>Modalités d'incubation</u>	49
E. - <u>Appréciation du pouvoir catabolique des souches</u>	49
III. - RESULTATS	51
A. - <u>Mise au point de la technique de culture</u>	51
1 - Résultats donnés par les différents milieux	51
a) <u>Résultats obtenus avec le milieu K</u>	51
b) <u>Résultats obtenus avec le milieu P</u>	53
c) <u>Résultats obtenus avec le milieu Tr</u>	53
2 - Choix des souches et du milieu	53
3 - Influence de la nature de l'inoculum	58
B. - <u>Résultats de biodégradation</u>	62
1 - Cas des acides humiques naturels	62
2 - Cas des mélanoidines	62
3 - Résultats obtenus avec le Bleu Brillant de Rémazol .	67

VI. - DISCUSSION

PARTIE III - ANALYSE DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE DES SOUCHES

I. - INTRODUCTION	71
II. - MATERIELS ET METHODES	71

A. - <u>Activité peroxydasique</u>	71
1 - Obtention des extraits acellulaires	71
2 - Dosages enzymatiques	72
B. - <u>Purification des peroxydases et électrophorèse</u>	73
1 - Purification des peroxydases	73
2 - Analyse électrophorétique	73
a) <u>En conditions non dénaturantes</u>	73
b) <u>En conditions dénaturantes</u>	75
C. - <u>Recherche de l'activité catalase et superoxyde</u> <u>dismutase (SOD)</u>	76
1 - Préparation des extraits acellulaires et membranaires	76
2 - Dosage de la catalase et la SOD	76
III. - RESULTATS	77
A. - <u>Dosage de l'activité peroxydasique</u>	77
1 - Mise au point de la technique	77
a) <u>Comparaison entre les différentes</u> <u>techniques de désintégration de cellules</u>	77
b) <u>Comparaison entre les pH, les substrats</u> <u>et les tampons utilisés</u>	78
2 - <u>Activité peroxydasique</u>	78
a) <u>A partir des extraits acellulaires bruts</u>	78
b) <u>A partir des extraits purifiés par</u> <u>précipitation avec le sulfate d'ammonium</u>	82
c) <u>Effet de la composition du milieu sur</u> <u>l'activité peroxydasique</u>	83
d) <u>Recherche de l'activité peroxydasique</u> <u>Mn-dépendante</u>	84
B. - <u>Analyse électrophorétique des extraits</u>	84
C. - <u>Purification des peroxydases majeures</u>	87

D. - <u>Analyse électrophorétique des peroxydases purifiées</u>	87
E. - <u>Résultats de la mise en évidence de la catalase et la SOD</u>	91
1 - La catalase	91
2 - La SOD	91
VI. - DISCUSSION	96
P A R T I E I V - ANALYSE DE L'ORIGINE DE L'INSTABILITE DES SOUCHES	
I. - INTRODUCTION	99
II. - MATERIELS ET METHODES	99
A. - <u>La recherche de mutants</u>	99
B. - <u>Protocole d'extraction de l'ADN total</u>	100
C. - <u>Protocole d'extraction de plasmides par lyse alcaline</u>	101
D. - <u>Purification de l'ADN plasmidique</u>	102
1 - Purification par gradient de chlorure de césium (CsCl)	102
2 - Purification par gradient de saccharose discontinu	102
E. - <u>Enzymes de restriction utilisées pour l'analyse de l'ADN</u> .	103
F. - <u>Electrophorèse horizontale</u>	104
III. - RESULTATS	105
A. - <u>Caractérisation des mutants</u>	105
B. - <u>Analyse de l'ADN des mutants</u>	108

IV. - DISCUSSION	108
CONCLUSION GENERALE	113
BIBLIOGRAPHIE	115

I. - LES COMPOSES HUMIQUES DU SOL

L'humus est un composé organique riche en carbone, de couleur brune, amorphe et à structure polymérique. Il est différent des autres composés organiques du sol ; polysaccharides, polypeptides, lignines, qui sont moins hétérogènes et qui représentent ses principaux précurseurs. Pendant l'étape d'humification, les réactions qui vont conduire à la formation des substances humiques sont très complexes et aussi bien d'origine enzymatique, nécessitant souvent la présence de nombreux microorganismes, que d'origine chimique, nécessitant alors la présence d'un milieu favorable. Dans la nature, par suite d'une association avec les différents cations ou avec les silicates, cet humus se présente généralement sous forme organo-minérale.

Il a souvent été considéré comme un facteur d'enrichissement des sols, permettant une croissance plus luxuriante des plantes. Les fonctions agronomiques de l'humus, qui sont actuellement assez bien connues, concernent en effet :

- l'amélioration de la structure granulométrique du sol : l'association avec les colloïdes, en augmentant l'aération, favorise en effet la croissance des plantes ;
- l'amélioration de la capacité de rétention de l'eau ;
- la rétention de petites molécules nutritives par un mécanisme d'échange cationique, de façon à faciliter et à régulariser leur utilisation par les plantes ;
- la rétention de certains ions, comme l'ammonium, évitant ainsi leur perte par lessivage ;
- la solubilisation d'ions métalliques de façon à les rendre échangeables ;
- l'augmentation de la capacité tampon des sols ;
- l'augmentation de la température des sols, grâce à une meilleure utilisation des radiations solaires.

Ces composés humiques se rencontrent également dans les eaux douces et marines, au sein desquelles ils permettent la solubilisation et le transport des métaux ainsi que la fixation et le transport de nombreux produits organiques de synthèse chimique tels que les pesticides.

L'humus et le cycle biologique du carbone

On sait que l'atmosphère contient environ 720 milliards de tonnes de carbone, essentiellement sous forme de CO_2 (LAMBERT 1987). Chaque année, 150 milliards de tonnes de ce carbone sont assimilés, et convertis en carbone organique que l'on retrouve essentiellement dans les plantes, grâce à la photosynthèse (WHITTAKER et LIKENS 1973, STEPHENS et HEICKEL 1975). Ce carbone végétal peut ensuite se retrouver sous forme de biomolécules d'origine animale. L'ensemble de ce carbone organique des organismes vivants des sols représente environ 500 milliards de tonnes (BOHN 1976, STUIVER 1978) et le carbone organique ne participant plus à l'entretien de la vie représenterait quant à lui dans les sols, 3 000 milliards de tonnes (BOHN 1976). Une partie de ce carbone est rapidement recyclée en donnant du CO_2 par le processus de la respiration (Animaux, Végétaux et microorganismes) et par le processus de la minéralisation microbienne. Une autre partie, située principalement dans des polymères difficilement dégradables, échappe à ce recyclage et peut se retrouver sous forme d'humus, de lignites, kérogènes ou hydrocarbures, selon les modalités de sa réorganisation. D'après CIAVATTA et GOVI (1993), le carbone humique du sol représenterait environ 50 % du carbone total de la matière organique, c'est-à-dire au moins 1 500 milliards de tonnes, donc plusieurs fois la totalité du carbone organique vivant. Il retourne obligatoirement à l'état de CO_2 après un certain temps de séjour dans le sol, selon un mécanisme complexe qui n'est pas encore totalement élucidé. D'après certaines théories (NISSENBAUM et KAPLAN 1972, WELTE 1973), il pourrait aussi être à l'origine de gisements d'hydrocarbures par suite de sa transformation en kérogène imprégnant des roches sédimentaires. Les différentes étapes de ce cycle sont schématisées dans la figure 1 qui précise, en outre, que le CO_2 atmosphérique peut être soustrait du cycle en formant des carbonates que l'on retrouve sous forme de calcites et dolomites. On sait enfin que la teneur en CO_2 de l'atmosphère augmente continuellement à cause des activités humaines (combustion de réserves fossiles, déforestation et expansion de l'agriculture intensive qui accélère notamment la minéralisation

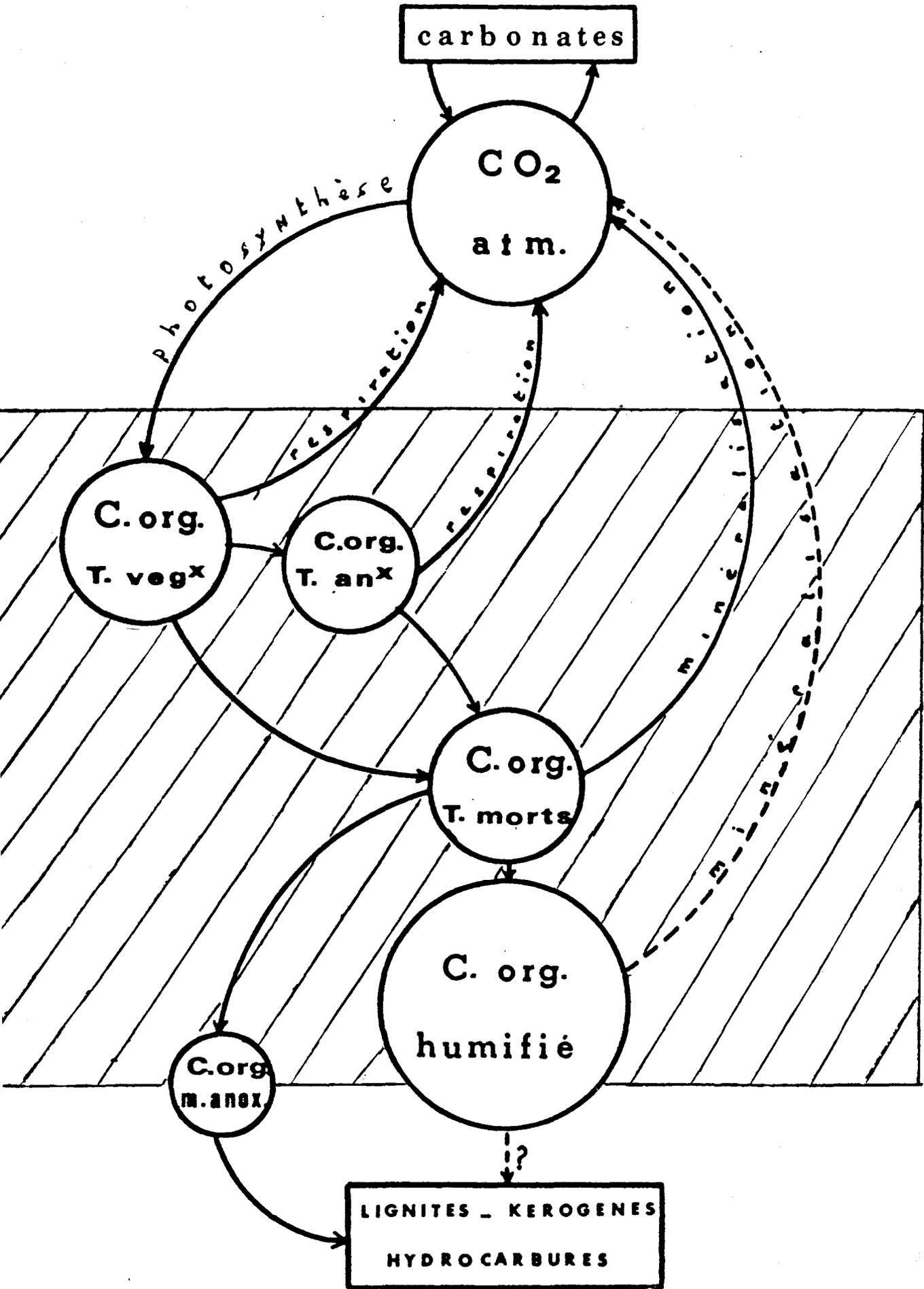


Figure 1 - Le cycle du carbone

des réserves du carbone humique). Ce CO_2 peut être absorbé par les eaux océaniques, mais cette compensation ne représenterait que la moitié de son excédent total (HOUGHTON et coll. 1983).

Le concept de l'humus

C'est WALLERIUS en 1761 qui a peut-être été le premier à avoir remarqué le rôle important de la matière organique des sols pour la rétention des molécules d'eau et des éléments nutritifs. ACHARD (1786) a pu ensuite libérer ce composé noir et amorphe en acidifiant une solution alcaline de tourbe mais ce n'est qu'en 1804 que le terme d'humus a été proposé par DE SAUSSURE pour caractériser la fraction organique noirâtre des couches superficielles des sols. Un demi-siècle après, BERZELIUS (1861) introduit une première classification en distinguant :

- les acides humiques caractérisés par leur solubilité en milieu alcalin ;
- les acides créniques et apocréniques capables de former des complexes avec les métaux ;
- l'humine, composé organique inerte, non soluble dans les solutions alcalines.

HOPPE-SEYLER (1889) distingue ensuite une quatrième fraction : l'acide hymatomélanique, proche des acides humiques mais soluble dans l'alcool. ODEN (1914-1919) réfuta plus tard l'existence des fractions créniques et apocréniques en proposant de leur substituer l'acide fulvique.

Actuellement, la classification des composés humiques repose sur la distinction de trois fractions :

- la fraction extractible par les alcalis et soluble à pH acide : les acides fulviques ;
- la fraction extractible par les alcalis mais précipitable à pH acide : les acides humiques ;
- la fraction non extractible par les alcalis : l'humine.

Les acides fulviques correspondent à des molécules de poids moléculaire relativement faible, généralement inférieur à 10 000, alors que les acides humiques présentent une plus grande polydispersion avec des molécules de poids moléculaire pouvant être supérieur à 100 000. Il n'est évidemment pas possible d'estimer la taille des molécules d'humine.

Dans les sols, la fraction des acides humiques est toujours plus importante que la fraction fulvique. Par contre, dans les eaux c'est la fraction fulvique qui est prédominante. Celle-ci est généralement récupérée en utilisant des résines hydrophobes qui retiennent sélectivement ces molécules par adsorption.

Composition et structure des composés humiques

Les analyses prouvent toujours la prédominance de deux éléments, le carbone et l'oxygène, qui représentent 85 à 90 % du poids sec des substances humiques. Les acides humiques sont cependant plus riches en carbone que les acides fulviques (50 à 55 % pour les acides humiques, 40 à 48 % pour les acides fulviques). Par contre, la concentration des autres éléments est pratiquement identique : 4 à 6 % d'hydrogène, 2 à 6 % d'azote, 0,5 à 2 % de soufre et de phosphore. Une proportion appréciable du carbone se trouve impliquée dans les groupements carboxyliques, responsables du caractère acide de ces composés. Les acides fulviques sont pourtant plus riches en carboxyle que les acides humiques (5 à 10 mmole/g pour les premiers, 2 à 6 mmole/g pour les seconds). Des atomes de carbone sont également impliqués dans des groupements cétoniques ou quinoniques, qui représentent 2 à 4 mmole/g de produit sec et qui sont en partie à l'origine de la coloration brunâtre des extraits.

Etant donné qu'aucune technique ne permet de dissocier les constituants des substances humiques sans les dénaturer, ce sont les analyses par RMN du carbone 13 qui donnent actuellement les renseignements les plus complets sur leur structure. Les spectres obtenus (Fig. 2) montrent l'existence de quatre formes principales de carbone : le carbone paraffinique, le carbone des sucres, le carbone aromatique et le carbone carboxylique. L'estimation quantitative prouve, en particulier, l'importance du carbone aromatique dans les fractions d'acides humiques terrestres qui représentent 20 à 45 % du carbone total. Certains motifs structuraux peuvent être identifiés : des éléments de nature cellulosique ou hémicellulosique ainsi que des chaînes polyméthylène $(CH_2)_n$.

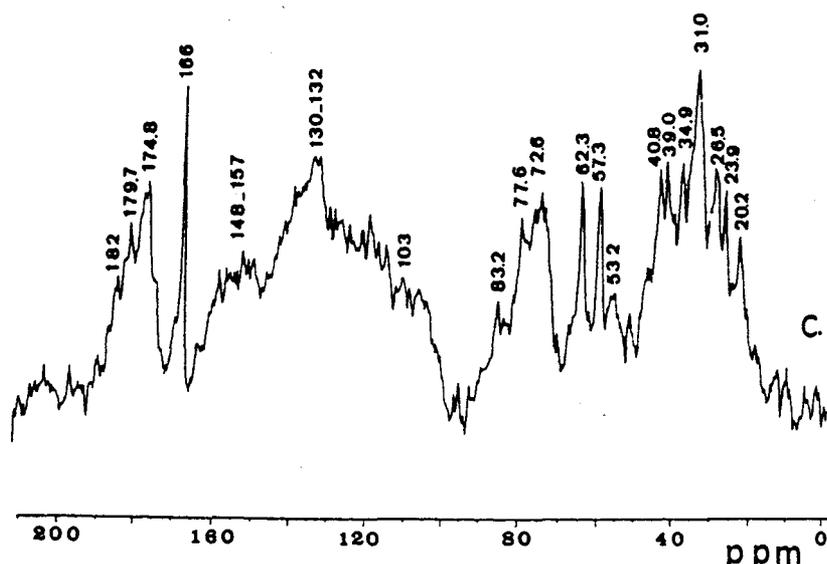


Figure 2 - Spectre RMN du ^{13}C d'un acide humique forestier

Certains de ces éléments peuvent être libérés par des hydrolyses chimiques et sont identifiables sous forme de sucres simples, d'acides uroniques ainsi que d'acides aminés, acides gras et certains composés phénoliques. La concentration en sucres ou acides aminés peut atteindre 5 à 10 % du poids sec des acides humiques et parfois plus pour les acides fulviques, mais il est difficile d'estimer la proportion de ces éléments susceptibles de se trouver sous forme polymérisée. Des procédés de dégradation attaquent plus efficacement ces macromolécules et ont permis d'identifier la présence de nombreuses structures benzène-carboxylique (di à hexacarboxylique) et acide phénolique (tri ou pentacarboxylique plus particulièrement) (SCHNITZER et KHAN 1972).

En intégrant les résultats donnés par les différentes analyses chimiques, des architectures moléculaires ont été proposées. L'une des premières a été présentée par FUCHS en 1930 mais ce modèle, de nature trop polycondensée, a ensuite été abandonné. HAWORTH, en 1971, a envisagé une nouvelle architecture moléculaire applicable surtout aux acides humiques et comportant une partie centrale très aromatique et plus ou moins condensée : "le nucleus", sur laquelle sont fixés des éléments tels que des hydrates de carbone, acides aminés, alcanes, etc... (ces éléments périphériques constituent les composés libérés lors des hydrolyses). Le "nucleus" serait constitué d'un réseau relativement compact et tridimensionnel formé d'unités benzène-carboxyliques,

phénoliques, quinoniques. La surface de ces macromolécules comportant d'une part des groupes : CH, CH₂, CH₃ et, d'autre part, des groupes OH et COOH, posséderait ainsi de nombreux sites hydrophobes et hydrophiles disposés chimériquement. Cette configuration permet d'expliquer la coexistence sur une même molécule de fonctions tensioactives et de mouillabilité.

Plus récemment, STEVENSON (1982) a essayé de concilier toutes les indications récentes en imaginant un modèle qui est représenté dans la figure 3. Dans ce modèle où les structures aromatiques restent prépondérantes et portent la plupart des groupes carboxyles, leur position a été confirmée plus tard avec les analyses spectroscopiques (PRESTON et SCHNITZER 1984). Les hydrates de carbone et les acides aminés sont également présents. La formule approximative de ce motif sans sucre et peptide est la suivante : C₆₁H₃₃O₂₉N₂ (avec un poids moléculaire de 1257). SCHULTEN et coll. (1991, 1992) ont enfin proposé dernièrement un modèle comportant une architecture à structure spongieuse constituée d'alkylbenzènes, alkyl-naphtalènes et alkylphénanthrènes.

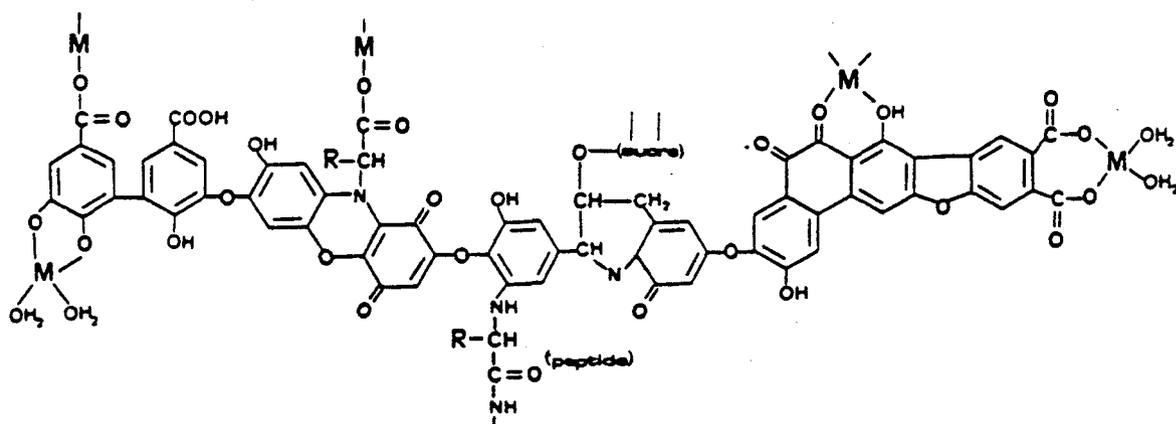


Figure 3 - Modèle de STEVENSON (1982)

Acides humiques de synthèse : les mélanoidines

Ce sont des polymères synthétisés par réaction de Maillard en présence de sucres réducteurs et d'acides aminés. Cette réaction peut être obtenue à des températures peu élevées (inférieures à 20°C) mais le rendement est plus important lorsque la température est comprise entre 50 et 100°C.

Les réactions qui conduisent à la production de ces mélanoidines sont très complexes et seules les premières étapes sont connues : elles initient la formation de N-glucoside, des réarrangements d'Amadori puis la décomposition de ces derniers. La polymérisation met en jeu des composés intermédiaires très instables, des réactions répétées de déshydratation et de condensation aboutissant à des structures très complexes à partir desquelles on a pu identifier essentiellement des dérivés pyrole et furane. Le produit de ces réactions complexes présente une coloration noirâtre qui peut être quantifiée par son absorbance entre 350 et 420 nm.

Certains auteurs ont suggéré des unités structurales compatibles avec les caractéristiques des mélanoidines. Il s'agit, par exemple, des modèles proposés par RUBINSZTAIN et coll. en 1984 comportant essentiellement des structures de type furane.

Les analogies entre ces mélanoidines et les acides humiques concernent essentiellement la composition élémentaire, la structure mise en évidence par la spectroscopie de RMN du carbone 13 (Fig. 4) et la résistance aux hydrolyses chimiques et aux dégradations biologiques. Ces analogies, d'abord mentionnées par MAILLARD lui-même en 1911, ont été plus récemment remarquées par BENZING-PURDIE et coll. (1983), MAL' et coll. (1983), RUBINSZTAIN et coll. (1984) et HAYAS (1986).

La biorésistance des composés humiques

Depuis un certain temps déjà, les analyses de datation au moyen du carbone 14 ont prouvé que les composés humiques étaient très stables dans les sols : les temps de résidence moyens obtenus étant de l'ordre de plusieurs siècles (TAMM et OSTLUND 1960, MARTEL et PAUL 1974, JENKINSON et RAYMER 1977). Cette stabilité peut s'expliquer par certaines propriétés de ces composés ou par des caractéristiques structurales :

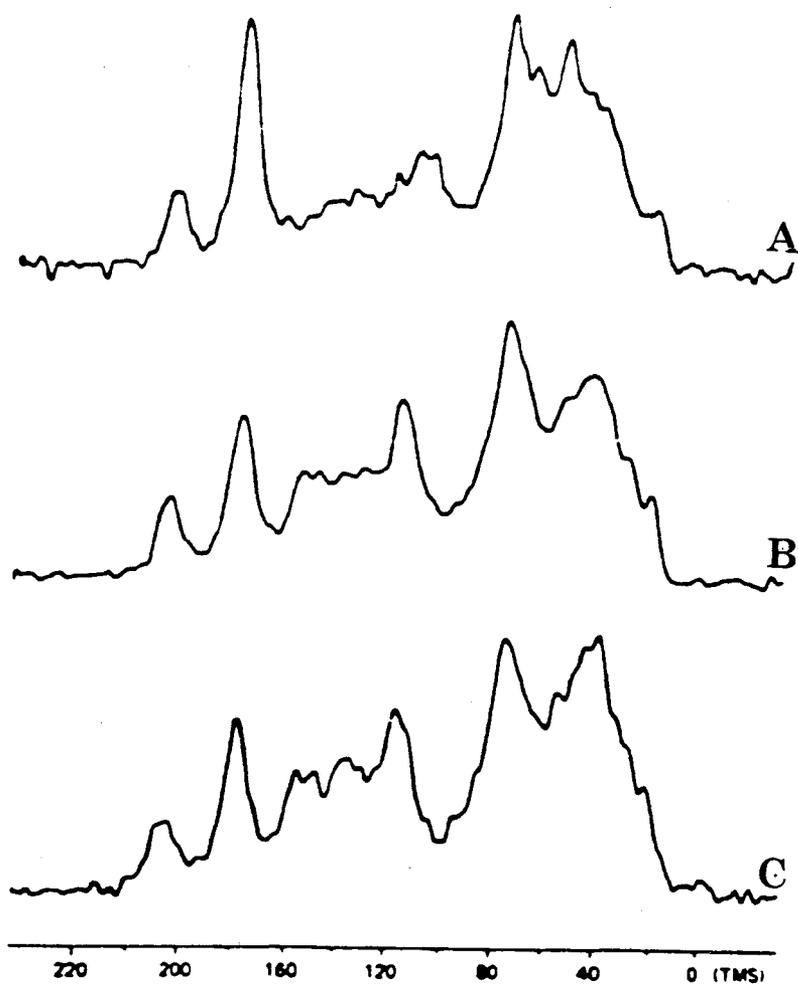


Figure 4 - Spectre RMN du carbone 13 obtenu avec la mélanoidine synthétisée à différentes températures : 22, 68 et 100°C à partir d'une solution molaire de D-xylose et de glycolle (BENZING-PURDIE et coll. 1983).



- les associations avec les substances minérales du sol ;
- la diversité des motifs constitutifs de leur architecture ;
- la présence de structures atypiques ou de liaisons atypiques ;
- la non-reproductibilité des liaisons entre les motifs ;
- l'inaccessibilité de ces liaisons aux enzymes extracellulaires.

Cette organisation architecturale est due en grande partie aux modalités de formation des composés humiques : l'humification est, en effet, un processus complexe impliquant la dégradation des précurseurs mais aussi des processus de synthèse. La première étape concerne cette désorganisation des précurseurs : lignines, tannins, hémicelluloses, qui libèrent leurs entités chimiques. Ces entités vont ensuite s'associer avec d'autres molécules plus simples (acides aminés, petits peptides, monosaccharides, phénols, ...), essentiellement excrétées par les plantes et les microorganismes. Ces associations peuvent résulter d'une action enzymatique mais également d'une réaction purement chimique (auto-oxydation ou autres réactions catalysées par des cations). A ce stade, certains facteurs du milieu (pH, potentiel d'oxydo-réduction, ...) interviennent souvent pour favoriser ces réactions. Au fur et à mesure que ces processus de synthèses ou de condensations se réalisent, les molécules deviennent de plus en plus compactes et plus stables thermodynamiquement. L'étape finale de la maturation implique probablement la fixation des colloïdes minéraux, alcanes, acides gras, qui augmente la cohésion des macromolécules.

Le problème du turn-over de l'humus

Si ces composés humiques présentent une très grande stabilité, ils ne s'accumulent cependant pas indéfiniment au niveau de la biosphère et peuvent être recyclés en redonnant le CO₂ atmosphérique dont ils sont issus. Ce processus correspond donc à une minéralisation. Compte-tenu de la taille des molécules, si celle-ci est d'origine biologique, elle implique probablement l'intervention d'un processus enzymatique ne se réalisant pas à l'intérieur des micro-organismes. Les premiers résultats relatifs à cette biodégradation des composés humiques impliquaient certains champignons capables d'utiliser ces substrats comme seule source de carbone (BURGES et LATTE 1960, MATHUR et PAUL 1967, MATHUR 1969) ou des bactéries (ZAYED et coll. 1974, DE HAAN 1977, RIFAI et BERTRU 1980). Les modalités précises de

cette biodégradation n'ayant cependant jamais pu être définies, il était possible d'interpréter différemment ces résultats en les imputant à une purification insuffisante des extraits humiques incorporés au milieu de culture. Cette supposition a été étayée par des expériences réalisées dans notre Laboratoire (BLONDEAU 1988, KONTCHOU et BLONDEAU 1990) : la sélection d'une communauté de bactéries obtenue par la méthode d'adaptation sur des milieux ne contenant que des acides humiques comme source de carbone a montré, en effet, que les modifications subies par ces composés purifiés n'affectaient que des éléments labiles situés à la périphérie des molécules. Une diminution de l'ordre de 10 à 15 % des hydrates de carbone, par exemple, a été notée, mais elle ne représente finalement qu'une perte en poids de 1 à 5 %, sans diminution mesurable de la taille des molécules. Ces modifications mineures s'accompagnaient d'une petite augmentation des groupements carboxyliques indépendamment de la nature (acides fulvique ou humique) ou de l'origine de l'humus utilisé, de ses modalités d'extractions ou encore des modalités d'incubation (aérobiose ou anaérobiose en présence de nitrates). Des conclusions identiques ont également été publiées par MURZAKOV et coll. (1989).

Une véritable minéralisation des acides humiques a été mise en évidence avec un champignon basidiomycète connu pour son activité ligninolytique : Phanerochaete chrysosporium (HAIDER et MARTIN 1988, BLONDEAU 1989). Les premiers auteurs ont utilisé des acides humiques marqués au carbone 14 provenant d'un sol contenant comme précurseur la lignine radioactive. La souche de Phanerochaete est d'abord mise en incubation dans un milieu contenant du glucose comme source de carbone, ensuite, la culture reçoit l'humus marqué et c'est pendant cette seconde période d'incubation que la libération de $^{14}\text{CO}_2$ permet de prouver le processus de minéralisation. Le deuxième auteur démontre la biodégradation de ces acides humiques par leur décoloration mais leur minéralisation ne peut être mise en évidence dans ce cas car le glucose du milieu de culture libère lui-même du CO_2 . Celle-ci est mise en évidence indirectement à partir d'un composé de synthèse obtenu par auto-oxydation en présence d'un sucre marqué au carbone 14 et d'un acide aminé. Ce composé produit par réaction de Maillard présente toutes les propriétés des acides humiques naturels. Comme cette minéralisation peut être initiée avec des filtrats de culture, elle est donc l'oeuvre de facteurs enzymatiques extracellulaires. Des travaux plus récents, réalisés avec un

autre champignon basidiomycète : Trametes versicolor (DEHORTER et BLONDEAU 1992, 1993) ont permis de prouver que cette activité extracellulaire était due à la présence de peroxydases et plus particulièrement d'une peroxydase Mn-dépendante. L'activité de biodégradation due à ces champignons ne coïncide pas avec leur croissance et semble dépendre du métabolisme secondaire. Elle est optimum à pH acide comme la plupart des activités fongiques. Enfin, lorsque le milieu de culture ne contient que les acides humiques comme source de carbone, aucune activité n'est décelable après l'inoculation des souches.

Dans la nature, il est assez improbable que les champignons soient les principaux acteurs du turn-over de l'humus car le pH qui permet leur minéralisation en laboratoire correspond peu aux conditions naturelles. Ce pH acide favorise plutôt l'humification et lorsque l'humus commence à se stabiliser, les valeurs de pH augmentent d'autant plus, qu'en général, les molécules humiques s'accumulent dans des zones plus profondes du sol. C'est dans cette optique qu'une souche bactérienne possédant également une activité ligninolytique extracellulaire (RAMACHANDRA et coll. 1987, RAMACHANDRA et coll. 1988) : Streptomyces viridosporus, a été expérimentée en laboratoire (KONTCHOU et BLONDEAU 1992). Dans un milieu de culture à pH neutre, additionné de glucose, cette bactérie est capable de décolorer les acides humiques ou de minéraliser des mélanoidines, mais les filtrats de ces cultures, contrairement aux champignons, ne donnent aucune réaction sur les molécules humiques, ce qui suggère la participation d'enzymes associées avec les structures périphériques des cellules.

Ces résultats ont donc été obtenus avec une souche de collection qui avait fait l'objet de recherches approfondies dans le domaine des peroxydases, mais pour avoir une idée plus précise de l'activité des Streptomyces dans le turn-over des substances humiques, il était souhaitable d'élargir cette expérimentation en essayant d'isoler des souches capables de dégrader ces substrats et d'analyser leurs propriétés cataboliques. Il était également intéressant de savoir si cette activité de biodégradation des acides humiques pouvait être de nature extracellulaire pour certaines souches, ce qui permettrait une analyse beaucoup plus aisée des facteurs responsables de la biodégradation.

II. - GENERALITES SUR LES STREPTOMYCES

Les Streptomyces sont des bactéries à Gram positif, caractéristiques de la microflore des sols. Ils font partie des Actinomycètes qui représentent un des groupes de bactéries les plus importants (LOCCI 1984, GOODFELLOW et coll. 1988). Ils prolifèrent en formant des mycéliums, morphologie qui rappelle évidemment celle des champignons, mais ils conservent toutes les propriétés caractéristiques des procaryotes. Il existe des genres apparentés mis en évidence par l'analyse de l'ARN ribosomal 16S, qui recouvrent tous les intermédiaires sur le plan morphologique entre les cellules isolées (genre Corynebacterium), les cellules à caractère pléiomorphe (genre Arthrobacter), les cellules irrégulières souvent en forme de massue avec des initiations de forme ramifiée (genre Mycobacterium), et le mycélium bien développé des Actinomycètes. Un certain nombre d'espèces pathogènes pour l'Homme ou les Animaux est connu : les Nocardia, par exemple, sont des agents infectieux opportunistes occasionnant des nocardioses et des mycétoses. Généralement, les Actinomycètes non parasites sont des organismes aérobies capables de proliférer sur des milieux simples car ils sont dotés de potentialités cataboliques très étendues. On leur prête d'ailleurs, actuellement, une attention grandissante dans le but de les utiliser pour éliminer les polluants des sols.

La fréquence des Actinomycètes les plus souvent rencontrés dans les sols est indiquée dans le tableau 1 qui provient d'une étude portant sur la microflore de 16 sols différents d'après LECHEVALIER et LECHEVALIER (1967).

Tableau 1 - Les actinomycètes des sols

Genres	Pourcentages
<u>Streptomyces</u>	95,34
<u>Nocardia</u>	1,98
<u>Micromonospora</u>	1,40
<u>Thermomonospora</u>	0,22
<u>Actinoplanes</u>	0,20
<u>Microbispora</u>	0,18
<u>Mycobacterium</u>	0,14
<u>Streptosporangium</u>	0,10
<u>Actinomadura</u>	0,10
<u>Micropolyspora</u>	0,10
<u>Pseudonocardia</u>	0,06
<u>Microellobosporia</u>	0,04

Morphologie et cycle biologique des Streptomyces

La morphologie des Actinomycètes a peu retenu l'attention jusque 1940, date à laquelle l'existence de différentes formes fructifiantes en culture statique a été montrée par l'équipe d'ERIKSON. Ces études morphologiques ont ensuite été abordées par WAKSMAN (1950, 1959) ainsi que par TRESNER et coll. (1967) et le caractère mycélien des Streptomyces a été essentiellement analysé en 1974 par WILLIAMS et coll. Les caractéristiques morphologiques découlant des incubations en milieu liquide agité ont été étudiées par LAWTON et coll. en 1989. Différentes formes de "pellets" (= boulettes) ont été observées : des "pellets" d'aspect duveté ou hérissé, des "pellets" oblongs, des flocons, des regroupements plans hydrophobes, des agrégats de mycélium dispersé, de mycélium fragmenté ou de différentes combinaisons de ces formes.

Le cycle biologique des Streptomyces est plus facilement observable sur les milieux nutritifs solidifiés à pH neutre (Fig. 5, CHATER et MERRICK 1979).

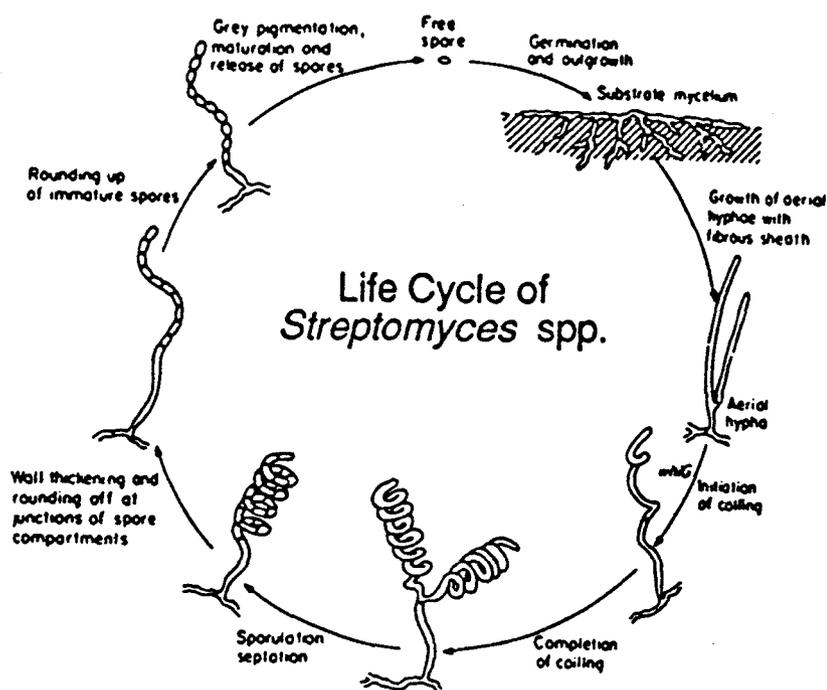


Figure 5 - Cycle biologique d'un Streptomyces

En effet, ces bactéries aérobies strictes prolifèrent dans les sols lorsque le pH est neutre ou alcalin et lorsque la teneur en eau est faible. Sur ces milieux, elles forment d'abord des mycéliums végétatifs plus ou moins dichotomisés qui permettent une colonisation très efficace des composés organiques polymérisés ou condensés de grande taille. Ce sont des chimioorganotrophes qui vont le plus souvent utiliser une source d'azote minéral (KUTZNER 1981). Les facteurs de croissance sont rarement exigés. Lorsque une carence en élément nutritif apparaît, des filaments aériens se forment et vont ensuite donner des arthrospores par septation de leur partie terminale. Ces arthrospores sont également appelées conidies (ou spores) et conduisent à l'individualisation de cellules ne contenant qu'une seule copie du chromosome bactérien alors que les filaments végétatifs sont généralement pourvus de plusieurs copies. Cette septation s'accompagne souvent de la synthèse de différents pigments donnant une coloration spécifique aux spores. Cette différenciation, qui est souvent obtenue après quelques jours de culture au laboratoire, présente des analogies avec les champignons (KALAKOUTSKII et AGRE 1976, LOCCI et SHARPLES 1984). Dans la nature, la sporulation apparaît après une croissance primaire de durée très variable mais qui peut parfois être très brève.

Problèmes posés par l'identification des Actinomycètes

Selon les modalités de croissance et la façon de fructifier, on peut distinguer quatre groupes parmi les Actinomycètes :

- 1 - les Actinomycètes caractérisés par des cellules se divisant sur plusieurs plans - exemple : Dermatophilus, Frankia ;
- 2 - ceux qui forment des sporanges - exemple : Streptosporangium, Dactylosporangium ;
- 3 - ceux qui sont dépourvus de sporange et forment des spores disposées en chaînes souvent plus ou moins torsadées - exemple : Streptomyces ;
- 4 - ceux qui produisent des spores isolées ou groupées - exemple : Thermomonospora, Micromonospora.

La forme des sporanges, des spores ainsi que la présence de pigments sont des critères souvent utilisés pour déterminer les espèces, en plus des tests physiologiques et biochimiques (température et pH optimums, sources carbonée et azotée utilisables, composés organiques hydrolysables). Pour le genre Streptomyces, 139 espèces sont actuellement répertoriées dans le "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" volume 4, année 1989, avec au sein de la plupart des espèces de nombreux variants. Ces Streptomyces sont faciles à identifier grâce à la présence de la forme LL de l'acide 2,6-diaminopimélique, constituant majeur de leur paroi (Tab. 2).

Toutes les parois contiennent de l'alanine, de l'acide glutamique, de la glucosamine et de l'acide muramique (LECHEVALIER et LECHEVALIER 1970, 1980). Les constituants chimiques majeurs de la paroi sont : I = LL-diaminopimélique et glycine ; II = méso-diaminopimélique et glycine ; III = méso-diaminopimélique ; IV = méso-diaminopimélique, arabinose et galactose.

Tableau 2 - Répartition des principaux Actinomycètes en fonction des constituants majeurs de leur paroi

Groupes	Composition chimique de la paroi
Actinoplanètes	II
Maduromycètes	III
Micropolysporas	IV
Multilocular sporangia	III
Nocardioforms	IV
Streptomycètes	I
Thermomonosporas	III

La classification des espèces au sein du groupe des Actinomycètes a également bénéficié des résultats obtenus en appliquant les critères de l'analyse numérique (SNEATH 1978, WILLIAMS et coll. 1983a-b, LANGHAM et coll. 1989).

Streptomyces, source d'antibiotiques

Les Streptomyces sont des producteurs importants d'enzymes extracellulaires, d'acides organiques et d'antibiotiques. Avec la production de plus de 60 % des antibiotiques connus, c'est surtout cette propriété qui les caractérise et les différencie des autres Actinomycètes (Tab. 3).

Tableau 3 - Nombre d'antibiotiques différents isolés à partir des principaux genres d'Actinomycètes d'après BERDY (1974, 1980, 1984)

Genres	Quantités totales d'antibiotiques découverts		
	en 1974	en 1980	en 1984
<u>Streptomyces</u>	1930	2784	3513
<u>Micromonospora</u>	41	129	270
<u>Nocardia</u>	45	74	107
<u>Actinoplanes</u>	6	40	95
<u>Streptoverticillium</u>	19	41	64
<u>Actinomadura</u>	2	16	51
<u>Saccharopolyspora</u>	0	4	33
<u>Streptosporangium</u>	7	20	26
<u>Actinosynnema</u>	0		25
<u>Dactylosporangium</u>	0	4	19

Le premier antibiotique synthétisé par Streptomyces griseus a été mis en évidence par WAKSMAN - il s'agit de la streptomycine. Les autres antibiotiques actuellement commercialisés sont indiqués dans le tableau 4.

La production de ces substances antibiotiques est généralement considérée comme une défense potentielle contre des germes concurrents. Leur signification précise pose cependant actuellement quelques interrogations :

Tableau 4 - Les principaux antibiotiques synthétisés par les Streptomyces

Famille	Antibiotique produit	Souche productrice	Observation
Tétracyclines	Tétracycline	<u>S. aureofaciens</u>	inhibiteur de la traduction
Aminoglycosides	Streptomycine	<u>S. griseus</u>	inhibiteur de la traduction
	Spectinomycine	<u>Streptomyces</u> spp	inhibiteur de la traduction (large spectre sur les Gram-négatifs)
	Néomycine	<u>S. fradiae</u>	inhibiteur de la traduction (en se fixant à la 30 S)
Macrolides	Erythromycine	<u>S. erythreus</u>	inhibiteur de la traduction
	Clindamycine	<u>S. lincolnensis</u>	
	Chloramphénicol	<u>S. venezuelae</u>	inhibiteur de la traduction (inhibe la formation de liaisons peptidiques)
Polyènes	Nystatine	<u>S. noursei</u>	inhibition des fonctions membranaires (agit sur les champignons et levures)

- pour la plupart des scientifiques, les antibiotiques dériveraient bien d'un métabolisme secondaire, dans le but de neutraliser des espèces rivales. Celles-ci, pour se défendre, ont ensuite réussi à développer des facteurs de résistance qui, à leur tour, auraient conduit les Streptomyces à modifier la structure initiale de leurs antibiotiques et ainsi de suite, ce qui permet d'expliquer la complexité actuelle et la diversité de leurs structures ;
- pour un certain nombre de chercheurs dont DAVIES (1990), les antibiotiques que nous identifions actuellement sont au contraire des reliques d'un métabolisme primaire et archaïque, au niveau duquel ils jouaient probablement le rôle des protéines ribosomales actuelles. Ils se seraient quand même maintenus au cours de l'évolution, mais en déviant de leur fonction primitive.

Particularité du génome des Streptomyces

Le chromosome des Streptomyces est caractérisé par son importance : 5×10^3 à 7×10^3 kilobases, c'est-à-dire 1,5 à 2 fois le chromosome d'E. coli. Il est également caractérisé par sa stabilité biochimique avec un pourcentage en G + C compris entre 70 à 75 %, ce qui constitue un avantage sélectif pour ces bactéries. Des séquences d'ADN répétitives sont identifiables et représentent habituellement 4 à 10 % de l'ADN total. Le génome des Streptomyces comprend, comme chez les autres bactéries, des plasmides circulaires ou linéaires de taille parfois importante (jusqu'à 500 kilobases) et certains de ces plasmides ont été mis en cause dans des réarrangements génomiques responsables de l'instabilité particulière chez certaines souches de Streptomyces. La plupart de ces réarrangements, qui concernent des délétions ou des amplifications, affectent plus fréquemment le chromosome et conduisent à des anomalies dans le processus de différenciation, la production des antibiotiques ou la synthèse des pigments (CULLUM et coll. 1986, BIRCH et coll. 1990).

Ce Mémoire, relatif à l'étude au Laboratoire de la biodégradation des acides humiques, comporte 4 parties.

La première partie est consacrée aux modalités d'isolement de Streptomyces capables de dégrader les acides humiques et à leur caractérisation microbiologique.

Les modalités d'appréciation de leurs activités cataboliques et leur aptitude à produire des peroxydases sont présentées respectivement dans la seconde et la troisième partie.

Le dernier chapitre est une approche génétique destinée à essayer d'expliquer les raisons de l'instabilité catabolique des souches.

P R E M I E R E P A R T I E

ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE COLLECTION DE
SOUCHES BACTERIENNES DECOLORANT LES ACIDES HUMIQUES

I. - INTRODUCTION

Des expériences, menées au Laboratoire, ont montré que Streptomyces viridosporus ATCC 39115 était capable de décolorer les acides humiques naturels et de minéraliser les mélanoidines utilisées en tant qu'acides humiques de synthèse. A l'aide de cette bactérie, un milieu sélectif a été mis au point de façon à isoler, à partir d'un certain nombre d'échantillons de sol, de nouvelles souches actives sur les acides humiques. Cette activité est caractérisée par l'apparition d'une auréole de décoloration autour des colonies développées sur ce milieu gélosé.

A partir de la collection de souches bactériennes ainsi récupérées, un certain nombre de tests a été effectué pour essayer d'une part de les identifier et, d'autre part, de les comparer avec la souche de collection S. viridosporus.

II. - MATERIELS ET METHODES

A. - Isolement des souches

Les souches ont été isolées sur un milieu gélosé dont la composition par litre est la suivante : $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g ; KCl : 1,71 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,05 g ; NH_4Cl : 0,2 g ; $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g ; CaCO_3 : 0,02 g ; extrait de levure : 0,01 g ; cycloheximide : 0,05 g ; agar : 15 g ; acide humique : 0,05 g ; glucose : 1 g ; pH : 7,2.

Les sels minéraux et l'acide humique sont stérilisés séparément par autoclavage à 120°C pendant 20 min. La cycloheximide, le glucose et l'extrait de levure sont stérilisés par filtration.

Des dilutions sériées d'un certain nombre d'échantillons de terre ou de terreau ont été étalées sur ce milieu réparti en boîtes de Pétri. Après incubation à 30°C, pendant environ une semaine, les colonies présentant une auréole de décoloration ont été retenues. Les souches issues de ces colonies sont désignées par des lettres et des chiffres (la lettre se rapporte au prélèvement, le chiffre au numéro de la souche). Seules les souches donnant des résultats reproductibles sur ce milieu gélosé ont été conservées.

B. - Entretien et conservation des souches

1 - Milieu utilisé pour l'entretien

Les souches sont ensemencées sur milieu gélosé incliné contenant : extrait de malt : 10 g ; extrait de levure : 4 g ; agar : 12 g ; glucose : 4 g ; eau : 1 000 ml à pH 7,2.

2 - Milieu utilisé pour la conservation

Ce milieu réparti en tubes contient du Tween 80 (0,001 %, V/V) et du glycérol (20 %). Il est stérilisé par autoclavage. Les bactéries sont directement suspendues dans ce milieu et immédiatement conservées au congélateur (- 25°C).

3 - Lyophilisation

Les spores, récupérées dans une solution de lait écrémé à 10 %, sont lyophilisées en ampoule selon la technique décrite par HOPWOOD et coll. (1985) avec un lyophilisateur Usifroid de type MS.P.32/4.

C. - Préparation des inoculums

Pour faciliter la régularité des inoculations et dans certains cas éviter les autoapports dans nos milieux de culture, les bactéries sont couramment ensemencées au préalable dans des milieux de culture liquide, de même composition que le milieu d'entretien, et réparties en tubes de 25/200 contenant quelques tiges de verre. Après ensemencement, ces tubes sont disposés en position inclinée pour faciliter la prolifération des mycéliums et stimuler la phase de sporulation par le biais de l'augmentation de la surface de contact avec l'oxygène de l'air. Après 2 à 4 semaines d'incubation à 35°C, les mycéliums aériens sont récoltés dans de l'eau stérile et après agitation en présence de billes de verre (diamètre 3 mm), les suspensions de spores sont utilisées soit dans cet état, soit après filtration sur laine de verre qui retiendra les débris mycéliens.

D. - Etude de la composition chimique des parois bactériennes

Les bactéries sont d'abord cultivées pendant sept jours dans le milieu de culture dont la composition en sels a été indiquée plus haut et contenant en plus 5 g/l de glucose. Après cette période d'incubation, elles sont mises en contact avec du formol (concentration finale 1 %) pendant 24 h et sont ensuite centrifugées à 15 000 g pendant 20 min. Le culot est lavé une première fois avec de l'eau distillée, puis il est repris avec de l'éthanol, filtré sur fibre de verre (Whatman GF/C) et placé à l'étuve à 100°C pendant 24 h. Trois mg de poids sec sont ensuite traités avec 1 ml d'acide chlorhydrique-6N pendant 18 h à 100°C. Après évaporation au bain-marie bouillant, on récupère avec 1 ml d'eau et le même traitement est réalisé une seconde fois. Le résidu est finalement repris avec 0,3 ml d'eau. L'analyse des constituants de ces résidus est effectuée par chromatographie en couche mince de cellulose sur feuille plastique (Merck, Réf. 5577) (STANECK et ROBERTS 1974) en présence d'un témoin : l'acide diaminopimélique sous ses différentes formes isomériques (Sigma, Réf. D1377).

Le solvant employé pour le développement comprend le mélange suivant : méthanol : 80 ; eau distillée : 26 ; HCl 6N : 4 ; pyridine : 10 V/V. Après migration du solvant (environ 5 h) et séchage des feuilles, la révélation s'effectue par vaporisation de ninhydrine (solution à 0,2 % dans l'acétone) et séjour à l'étuve (100°C pendant 3 min).

E. - Utilisation de différentes sources de carbone

La composition du milieu minéral est la suivante : $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: 2 g ; KH_2PO_4 : 0,6 g ; K_2HPO_4 : 0,4 g ; $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g ; CaCl_2 : 0,1 g ; $\text{MnSO}_4,4\text{H}_2\text{O}$: 5 mg ; H_2O : 1 000 ml à pH 7,2. Le saccharose, le cellobiose, le rhamnose ou le mannitol sont incorporés dans ce milieu après stérilisation à raison d'une concentration finale de 5 g/l (l'utilisation du glucose dans cet essai sert de témoin de croissance). Après ensemencement, les cultures sont placées en agitation à 30°C.

F. - Recherche des activités enzymatiques

La production de lipases est mise en évidence en utilisant le milieu minéral précédent, additionné d'extrait de levure : 1 g/l, de Tween 80 : 10 g/l et

d'agar : 15 g/l. Ce milieu est réparti en boîtes de Pétri qui sont ensemencées en surface. La présence d'un halo sous les colonies après incubation indique une réaction positive.

La production d'amylase est recherchée de la même façon sur milieu gélosé contenant 20 g/l d'amylase. Après incubation, l'enzyme est mise en évidence par le lugol.

L'activité protéolytique est décelée sur le même milieu contenant de la gélatine à 50 g/l.

La production de cellulases est recherchée soit en incorporant la cellulose azure dans le milieu de base selon la technique en double couche de PLANT et coll. (1988), soit en incorporant la carboxyméthyl-cellulose (Sigma C-8758 low viscosity).

G. - Résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques utilisés sont : la néomycine (50 µg/ml), la rifampicine (50 µg/ml), la pénicilline G (10 µg/ml) et l'oléandomycine (50 µg/ml, 100, 150 et 200 µg/ml). Après stérilisation sur membrane, ils sont incorporés dans le milieu de base liquide qui contient en outre du glucose à la concentration de 2,5 g/l. L'incubation se réalise à 30°C avec agitation.

H. - Mise en évidence de la production de sidérophores

Cette analyse a été entreprise dans un but de comparaison de souches apparemment très proches.

Les bactéries, dans ce cas, sont cultivées dans des flacons débarrassés de toute trace de fer par lavage à l'acide nitrique à 10 %.

Le milieu de culture employé est celui de MULLER et RAYMOND (1984). La solution de départ, contenant les sels minéraux, est d'abord passée sur une colonne Chelex 100 (Biorad) pour éliminer le fer et, après ajustement du pH à 7,2, les ions divalents sont ajoutés. Le milieu est réparti dans des flacons plasma à raison de 100 ml/flacon et autoclavé. Avant l'inoculation, on ajoute

le chlorure de calcium (concentration finale : 100 mg/l), le glucose (concentration finale : 2,5 g/l) et l'extrait de levure (50 mg/l).

Après incubation à 30°C avec agitation, les sidérophores contenus dans les filtrats de culture sont dosés avec le réactif de SCHWYN et NEILANDS (1987). Ce réactif contient le chrome azurol S qui donne une coloration bleue en présence de fer mais se décolore en présence d'un chélateur plus compétitif.

Les dosages sont réalisés en suivant la cinétique de décoloration au spectrophotomètre à 630 nm. Les résultats sont exprimés en nmole de desferal (deferoxamine B, Ciba-Geigy) grâce à l'emploi d'une gamme étalon.

Le fractionnement de ces sidérophores est obtenu en passant les filtrats de culture amenés à pH 5,5 sur une colonne d'amberlite XAD8 (polymères estéracryliques, Merck). Les sidérophores retenus sur cette résine par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes sont élués avec le méthanol. Les autres, retenus grâce à la capacité d'échange ionique faible de cette résine, sont libérés avec une solution de soude de 0,1 N. Les sidérophores non retenus sur la résine XAD8 sont séparés en deux fractions selon leur solubilité ou la non solubilité dans le méthanol.

La nature des sidérophores récupérés est essentiellement déterminée par HPLC en employant une colonne nucléosil C18 (Alltech) (diamètre : 4,6 mm ; longueur : 150 mm) utilisée en phase inverse. L'éluant est l'acide phosphorique 0,1 % + acétonitrile 20 %. La détection est réalisée à 220 nm pour les formes "déferri" et à 435 nm pour les formes "ferri". Ces formes "ferri" sont obtenues en ajoutant du FeCl_3 aux solutions de sidérophores.

III. - RESULTATS

A. - Souches isolées

Les 16 souches isolées à partir des différents échantillons de sols sont indiquées dans le tableau 5. Ces souches proviennent généralement d'échantillons de sols différents, et aucune relation ne peut être établie avec

Tableau 5 - Résultats des isolements

Origine des échantillons de terre	Nombre total de bactéries (10^5 /g de terre)	Nombre total d'Actinomycètes (10^5 /g de terre)	Nomenclature des souches retenues
A : Terreau (forêt Phalempin)	38	18	A12, A14
B : Terreau (forêt Phalempin)	145	37	B6, B7
C : Terre de pelouse (Villeneuve d'Ascq)	19	8	C3
M : Terre de jardin (Marcq-en-Baroeul)	75	30	M3
P : Terre cultivée (Péronne)	61	15	P1
R : Terre cultivée (Roncq)	11	4	R5
S : Terre de jardin (Villeneuve d'Ascq)	9	2	S2
E : Terre de forêt (Ecosse)	156	35	E6, E7
L : Terre de forêt (Longuyon)	16	6	O
BP: Terre de forêt (Briey) prélèvement profond = 30 cm	66	30	O
BS: Terreau (Briey)	44	3	O
V : Terre de vigne (Massif Central)	65	13	O
SB: Terreau (Massif Central)	19	7	SB1, SB3, SB4
X : Terreau (forêt Phalempin)	ND	ND	X3, X4

l'importance relative des Actinomycètes présents (les numérations donnent une densité comprise entre 2×10^5 et 37×10^5 par g selon les sols).

Dans un premier temps, le milieu d'entretien des souches, dont la composition a été mentionnée précédemment, a été solidifié soit avec 12 g d'agar soit avec 18 g/l. L'utilisation simultanée de ces deux types de milieux pour les inoculations nous a conduit à choisir de préférence le milieu le plus faiblement gélosé.

De même, des essais de culture réalisés avec des spores provenant de souches incubées pendant des temps différents : 5, 15, 25, 35 et 45 jours, ont montré que l'optimum était obtenu avec des cultures âgées de 15 à 25 jours.

L'ensemble des souches mentionnées ci-dessus ont conservé leur pouvoir de décoloration des acides humiques sur milieu gélosé lorsqu'elles sont à nouveau inoculées sur ces mêmes milieux après vérification de leur pureté. La figure 6 présente à titre d'exemple les auréoles de décoloration données par l'une de ces souches. En effet, un certain nombre de souches sélectionnées dans un premier temps à partir d'échantillons de terre ont été abandonnées par suite de la perte de cette activité.

B. - Caractérisation des souches isolées

1 - Examen morphologique

Sur frottis, après coloration de Gram, toutes les souches de notre collection donnent une réaction Gram positif et présentent un aspect filamenteux avec des dichotomisations. A l'extrémité de certains filaments, des spores sphériques disposées en alignements ou isolées sont parfois observables.

2 - Recherche de la forme isomérique de l'acide diamino-pimélique

L'étude des acides aminés de la paroi par chromatographie sur couche mince a mis en évidence, chez toutes les souches, la présence de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique, isomère caractéristique des Streptomyces. La figure 7 illustre les résultats donnés par quelques unes de ces souches.

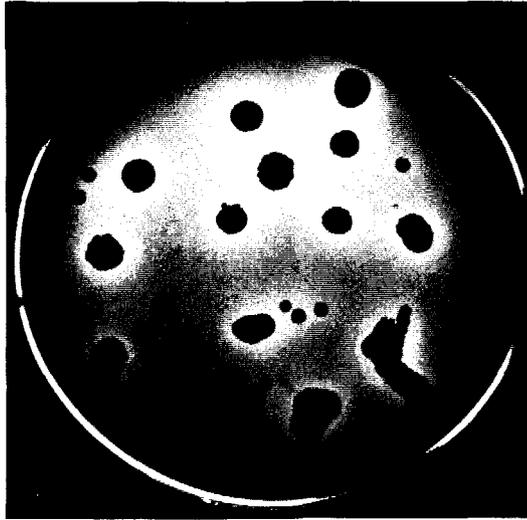


Figure 6 - Auréoles de décoloration obtenues avec la souche X3 inoculée sur gélose contenant des acides humiques.



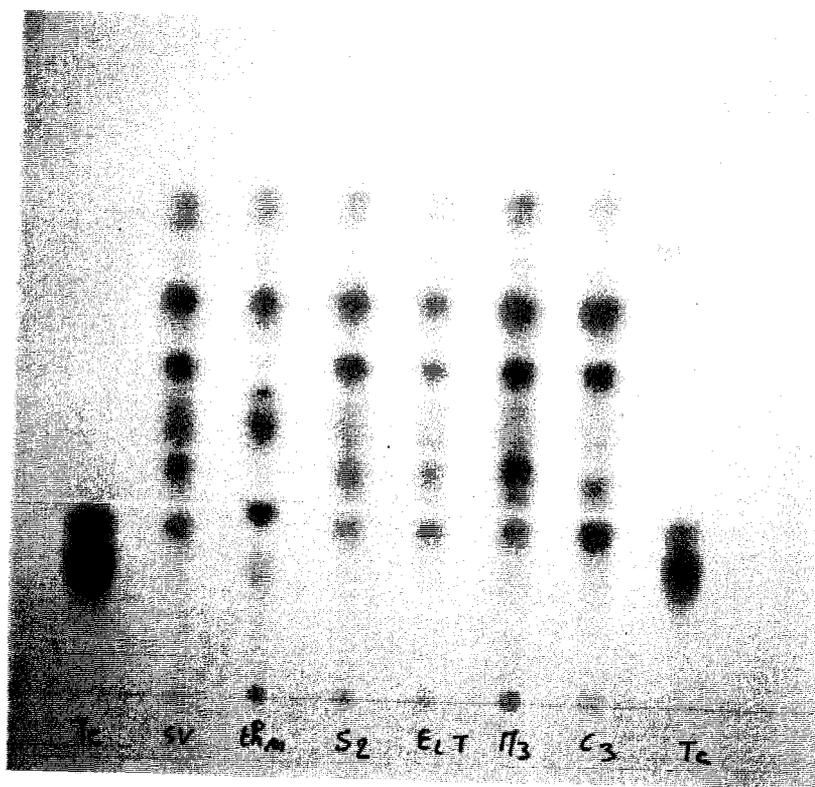


Figure 7 - Séparation des isomères de l'ADP

Te : isomères D et L de l'ADP commercial
 SV : Streptomyces viridosporus ATCC 39115 Isomère L
 Thm : Thermomonospora mesophila DSM 43048 Isomère D

3 - Utilisation des sucres

Compte-tenu de la composition du milieu qui a permis leur isolement, les souches sont bien sûr capables d'utiliser le glucose comme seule source de carbone. La croissance est également possible en présence de cellobiose. En ce qui concerne le saccharose, le rhamnose et le mannitol, les résultats diffèrent selon les souches (Tab. 6).

Tableau 6 - Utilisation des sucres par les souches de notre collection.

	Utilisation du cellobiose	Utilisation du saccharose	Utilisation du rhamnose	Utilisation du mannitol
SV	+	+	+	+
S2	+	-	+	+
C3	+	-	-	-
R5	+	-	+	+
E6	+	-	+	+
P1	+	+	-	-
B6	+	+	-	+
B7	+	+	-	-
E7	+	-	+	+
A12	+	+	-	-
A14	+	-	-	-
M3	+	-	+	+
SB1	+	-	+	-
SB3	+	-	-	-
SB4	+	-	-	-
X3	+	+	+	+
X4	+	+	+	+

Tableau 7 - Activités enzymatiques des souches de notre collection

	Production d'amylase	Production de cellulase		Production de gélatinase	Production de lipase
		substrat = cellulose	substrat = CM cellulose		
SV	+	-	+	+	-
S2	+	-	-	+	+
C3	+	-	-	+	-
R5	+	-	+	+	-
E6	+	-	+	+	+
P1	+	-	+	-	-
B6	+	-	-	+	-
B7	+	-	-	+	-
E7	+	-	+	+	+
A12	+	-	-	+	-
A14	+	-	-	+	-
M3	+	-	+	+	+
SB1	+	-	-	+	+
SB3	+	-	-	+	-
SB4	+	-	-	+	+
X3	+	-	+	+	-
X4	+	-	+	+	-

4 - Activités enzymatiques

Les résultats sont indiqués dans le tableau 7. Dans nos conditions expérimentales, on constate que toutes les souches produisent une amylase et une gélatinase à l'exception de la souche P1 qui n'est pas protéolytique. Peu de souches produisent une lipase et, en ce qui concerne l'activité cellulosique, on constate que la cellulose cristalline n'est pas hydrolysée mais que certaines souches peuvent synthétiser des endoglucanases capables d'attaquer la carboxyméthyl-cellulose.

5 - Résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques que nous avons utilisés ont été choisis d'après les informations du Bergey's Manual (1989) relatives à l'identification des Streptomyces. Les résultats obtenus (Tab. 8) montrent que pratiquement toutes les souches sont sensibles à la rifampicine et à la néomycine.

Tableau 8 - Résistance des souches de notre collection aux antibiotiques

	Pénicilline (10 µg/ml)	Rifampicine (50 µg/ml)	Néomycine (50 µg/ml)	Oléandomycine (100 µg/ml)
SV	+	-	-	+
S2	+	-	-	-
C3	+	-	-	-
R5	+	+	-	-
F6	+	-	-	-
P1	+	-	-	-
B6	-	-	-	-
B7	+	-	-	-
E7	+	-	-	-
A12	-	-	-	-
A14	-	-	-	-
M3	-	-	-	-
SB1	-	-	-	-
SB3	-	-	-	-
SB4	+	-	-	-
X3	+	-	-	+
X4	+	-	-	+

L'analyse des propriétés des différentes souches de Streptomyces montre une parenté très étroite entre les souches X3, X4 et S. viridosporus. Des recherches, actuellement menées au Laboratoire, ayant montré que S. viridosporus possédait la particularité de ne produire que deux sidérophores de nature différente : la deferoxamine B (sidérophore majeur) et la deferoxamine E, nous avons voulu savoir si les souches X3 et X4 secrétaient les mêmes sidérophores. Etant donné que X3 et X4 proviennent d'un même échantillon de terre et qu'elles présentent les mêmes aspects sur les différents milieux de culture, les analyses n'ont été réalisées que sur l'une des souches : X3.

Lorsque le filtrat de culture de X3, carencé en fer, est traité sur la résine XAD8, toute l'activité chélatrice du fer est retenue sur cette résine, comme pour S. viridosporus.

L'élution successive par le méthanol et la soude permet ensuite de fractionner les sidérophores et le tableau 9 montre que les activités récupérées sont très voisines dans chacun des extraits lorsqu'elles sont exprimées en pourcentage (les valeurs absolues étant fonction de la durée d'incubation et du poids sec des cellules).

Les résultats donnés par analyse en HPLC sont rigoureusement identiques pour les souches X3 et S. viridosporus :

- le sidérophore de l'extrait élué par le méthanol, sous forme "déferri", donne un pic qui sort après 14 min, et sous forme "ferri" après 3,9 min. Ce sidérophore correspond à la deferoxamine E. En incorporant le sidérophore témoin dans l'extrait méthanolique de X3, l'analyse en HPLC conduit toujours à l'enregistrement d'un seul pic. Ce sidérophore est cyclique, non chargé et d'autres analyses chromatographiques sur couche mince de cellulose ou de silice prouvent l'identité de ce chélateur ;
- le sidérophore de l'extrait élué par la soude, sous forme "déferri" donne un pic qui sort après 4 min, et sous forme "ferri" un pic après 1,8 min. Ce sidérophore correspond à la deferoxamine B qui est un sidérophore linéaire et chargé. L'incorporation d'un échantillon témoin comme précédemment conduit toujours à l'enregistrement d'un seul pic. Dans ce cas,

Tableau 9 - Comparaison de la teneur en sidérophores produits par la souche X3 par rapport à S. viridosporus

<u>S. viridosporus</u>		X3	
Activité chélatrice XAD ₈ ⁺		Activité chélatrice XAD ₈ ⁺	
éluée par le MeOH	éluée par NaOH	éluée par le MeOH	éluée par NaOH
1,73 μ mole eq. desféral/ml (15,26 %)	9,60 μ mole eq. desféral/ml (84,73 %)	0,16 μ mole eq. desféral/ml (9,81 %)	1,47 μ mole eq. desféral/ml (90,18 %)

l'identité de ce sidérophore a également été confirmée par chromatographie sur plaque et électrophorèse.

La structure de ces deux sidérophores est représentée dans la figure 8.

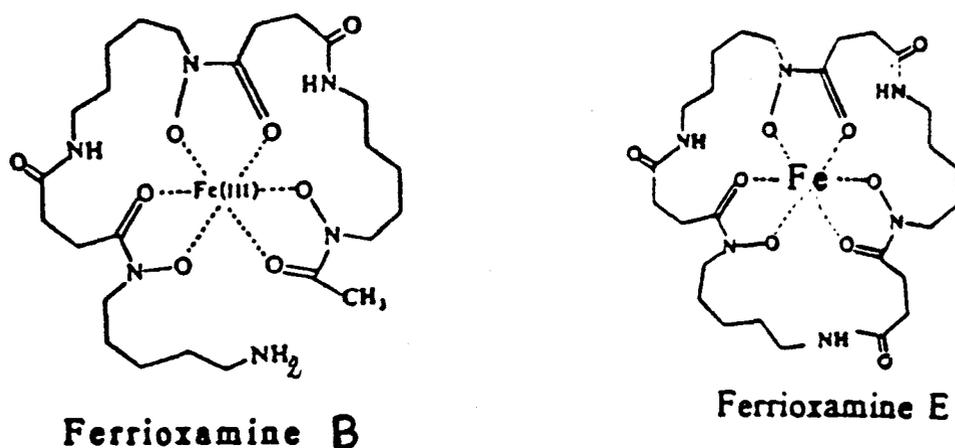


Figure 8 - Structure des ferrioxamines B et E.

IV. - DISCUSSION

C'est essentiellement par la présence de la forme LL de l'acide diaminopimélique de la paroi des souches de notre collection que l'identification des Streptomyces a pu être réalisée. Les résultats des autres tests ne permettent cependant pas de déterminer des noms d'espèces correspondant à chacune des souches. Les indications données par le Bergey's Manual (1989) ne sont généralement pas suffisantes pour aboutir à ces identifications. Les tests de résistance aux quatre antibiotiques : pénicilline G, rifampicine, néomycine et oléandomycine, ont été pourtant employés en tenant compte des indications relevées dans ce Bergey's Manual. Peu d'espèces répertoriées sont d'ailleurs sensibles aux trois derniers antibiotiques mais celles-ci possèdent des phénotypes différents de nos souches. D'autre part, les résultats de l'analyse numérique obtenus par LANGHAM et coll. (1989) ne nous ont pas aidés plus. GOODFELLOW et coll. (1987) soulignent toutes ces difficultés posées par l'identification de ces bactéries. S. viridosporus, que nous avons employé comme souche de référence, illustre

bien cet aspect : cette souche qui était considérée en tant qu'espèce dans la huitième édition du Bergey's (1974) n'est plus répertoriée en tant qu'espèce dans la neuvième édition (1989), mais comme espèce synonyme de S. chromofuscus.

La technique de sélection utilisée pour isoler nos souches ne permet pas d'obtenir une collection très importante car, en général, avec les échantillons de terre, il n'y a guère qu'une colonie sur plusieurs milliers qui est susceptible de présenter une activité sur les acides humiques incorporés dans le milieu gélosé de sélection. La majorité des échantillons expérimentés a cependant permis d'isoler des souches et l'une d'entre elles (X3) peut être considérée comme l'équivalent "sauvage" de S. viridosporus ATCC 39115 employée comme souche de référence. Cette souche a été isolée d'un sol de l'Etat d'Idaho aux Etats-Unis (SINDEN 1979).

Les deux sidérophores différents que nous avons caractérisés à partir de la souche X3, et qui se retrouvent pratiquement dans les mêmes proportions que chez S. viridosporus, représentent un critère à valeur discriminative. En effet, d'autres espèces de Streptomyces étudiées au Laboratoire dans cette même optique (qui est la production de sidérophores, S. pilosus, S. lividans, S. coelicolor, S. ambofaciens par exemple) produisent des sidérophores plus nombreux et plus diversifiés.

Dans un certain nombre de cas, plusieurs souches proviennent d'un même échantillon de sol. En ce qui concerne B6 et B7 d'une part, SB1, SB3, SB4 d'autre part, elles sont distinctes puisque deux à trois caractères les différencient. Par contre, pour A12 et A14 ; X3 et X4, il est possible qu'elles correspondent à une même espèce.

DEUXIEME PARTIE

ANALYSE DE L'ACTIVITE CATABOLIQUE DES SOUCHES

I. - INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu précédemment, le mécanisme de la biodégradation des composés humiques est important à comprendre compte-tenu de son impact dans le cycle du carbone et pour la valeur agronomique des sols cultivés. Avec un milieu de culture contenant du glucose et un pH compatible avec les conditions naturelles de minéralisation, il a été possible d'obtenir leur biodégradation en Laboratoire avec Streptomyces viridosporus (KONTCHOU et BLONDEAU 1992). D'autres Streptomyces, isolés en 1992 par MURATA et coll., ont également pu, en Laboratoire, décolorer des mélanoidines synthétisées par réaction de Maillard. Avec notre collection bactérienne, nous avons étudié la dégradation des acides humiques en mesurant la diminution de l'absorbance à 350 nm des milieux de culture. La minéralisation des mélanoidines marquées est mise en évidence par la production de CO₂ ou par la perte de radioactivité mesurée après incubation des souches.

La première partie des résultats de ce chapitre ne mentionne pas l'utilisation de la souche X3 étant donné que celle-ci n'a été isolée que dans un deuxième temps (2 années après la première série d'isollements).

II. - MATERIELS ET METHODES

A. - Extraction et purification des acides humiques utilisés

1 - Extraction à partir d'un échantillon de sol

La terre utilisée a été prélevée en dessous de la litière d'un sol forestier (jusqu'à 10 cm de profondeur). Elle est stabilisée au Laboratoire pendant 2 à 3 jours à température ambiante, puis séchée à l'air libre, homogénéisée et tamisée sur mailles de 1 mm avant d'être conservée à l'état sec. A partir de cette terre, après broyage au mortier, une première extraction est réalisée avec une solution de soude 0,1 N à raison de 10 g de terre pour 100 ml de solution dans un récipient porté en agitation pendant trois heures sous atmosphère d'azote. Après centrifugation à 2 500 g pendant 15 min, puis 9 000 g pendant 15 min, on récupère le surnageant. A partir du culot, une seconde extraction est effectuée dans les mêmes conditions avec une

solution de soude 0,1 N. Les deux surnageants sont mélangés et acidifiés avec de l'acide chlorhydrique 1 N de façon à amener le pH à 1. Après un repos de 24 h, le flocculat d'acides humiques est récupéré par centrifugation (2 500 g, 10 min), resolubilisé avec une solution de soude (0,1 N) et à nouveau reprécipité (pH à 1 avec HCl N), resolubilisé et traité en ultracentrifugation (40 000 g pendant 30 min), ce qui permet d'éliminer notamment les silicates. Les acides humiques sont finalement dialysés en employant des tubes de cellulose régénérée de type Spectra por 6 (Spectrum Medical Industries, Inc.) dont le seuil de coupure correspond à un poids moléculaire de 1 000. La dialyse se poursuit pendant plusieurs jours en présence d'eau distillée régulièrement renouvelée. La solution est ensuite purifiée par passage sur une résine échangeuse de cations (Amberlite IR120, forme H⁺), elle est enfin concentrée sous vide et lyophilisée. La poudre obtenue est conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité.

2 - Purification d'un produit commercialisé

Un acide humique est commercialisé par la firme Aldrich, mais il n'est pas facilement soluble dans l'eau et sa teneur en cendres est élevée. Il est donc nécessaire de le purifier avant son utilisation. Pour cela, il est tout d'abord solubilisé dans NaOH 0,1 N et agité comme précédemment pendant 2 heures (en absence d'oxygène). Il est ensuite précipité à pH 1 avec HCl, récupéré par centrifugation (2 500 g) après un repos de 24 heures ; le culot est alors resolubilisé avec de la soude 0,1 N, dilué dans de l'eau distillée et placé en agitation pendant 1 heure. Les acides humiques sont ensuite précipités avec HCl à 2 reprises et récupérés par centrifugation. Après neutralisation, ils sont dialysés et lyophilisés comme précédemment.

B. - Synthèse des mélanoidines

Les mélanoidines sont préparées par réaction de Maillard à 70°C, pendant une durée de 7 jours, à partir d'un mélange de glucose (1 M) et de glycolle (1 M) dans un tampon phosphate 0,5 M à pH 7 selon la technique proposée par HEDGES (1978) et BLONDEAU (1989). Les polymères obtenus sont dialysés et conservés à l'état lyophilisé comme précédemment. Pour synthétiser une mélanoidine marquée au carbone 14, on utilise dans les mêmes conditions du glucose marqué uniformément (CEA - activité spécifique 10 GBq/m mole)

ajouté au mélange réactionnel de façon à avoir une concentration finale correspondant à 185 KBq/ml. L'activité spécifique de cette mélanoidine est de 1,96 KBq/mg.

C. - Milieux de cultures

Le premier milieu utilisé est celui qui est proposé par ADHI et coll. (1988). Ce milieu contient, en particulier, des sels minéraux et une quantité relativement élevée d'extrait de levure (6 g/l), le pH est amené à 7,1. Les autres milieux ont été mis au point au Laboratoire. Ils contiennent les éléments suivants par litre :

Solution de métaux : pour 100 ml : $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 200 mg ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 300 mg ; H_3BO_3 , 400 mg ; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 200 mg ; $CuCl_2 \cdot 6H_2O$, 50 mg ; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 200 mg ; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 300 mg.

0,1 ml de cette solution est incorporée dans un litre de milieu.

Sels minéraux : pour 1 litre : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mg ; $CaCl_2$, 55 mg ; $FeSO_4$, 10 mg ; NH_4NO_3 , 200 mg.

Glucose : 2,5 g par litre.

Acides humiques : 0,25 à 0,5 g par litre.

Mélanoidines : 0,10 ou 0,25 g par litre.

L'un d'entre eux n'est pas tamponné (le milieu K) ; il contient en plus KH_2PO_4 : 0,3 mM et KCl : 100 mM (pH 7,5).

Les deux autres sont légèrement tamponnés :

- le premier milieu P avec KH_2PO_4/Na_2HPO_4 : 20 mM. Il reçoit en plus du NaCl 0,2 g par litre (pH 6,5) ;

- le second milieu Tr avec Tris-HCl 20 mM. Il reçoit en plus du KH_2PO_4 : 0,3 mM (pH 7,5).

Ces milieux sont répartis dans des bouteilles à plasma de 500 ml à raison d'un volume final de 50 ml. Les solutions de glucose, de sulfate de fer et d'acides humiques sont stérilisées par filtration sur membrane. MgSO_4 et CaCl_2 sont stérilisés séparément à l'autoclave.

D. - Modalités d'incubation

Les milieux sont inoculés à partir d'une suspension de spores préparée comme décrit dans la première partie. Les flacons de cultures sont toujours incubés à l'obscurité dans une pièce à 35°C, soit sans agitation, ce qui favorise la sporulation, soit avec agitation orbitale mais dans ce cas l'agitation commence après une incubation statique de 24 heures. Quand l'incubation se fait avec enrichissement en oxygène, les flacons sont d'abord incubés sous air pendant 16 heures, puis ils sont obturés par des bouchons de caoutchouc stériles et purgés stérilement pendant 2 min chaque jour avec de l'oxygène pur pendant toute la durée de l'incubation.

E. - Appréciation du pouvoir catabolique des souches

La plupart du temps, cette activité est simplement décelée en mesurant la décoloration des milieux à la longueur d'onde de 350 nm (cette longueur d'onde permet d'apprécier plus facilement les variations de la concentration en acides humiques des solutions). Des cultures non inoculées et incubées de la même façon servent de témoins. Les résultats obtenus peuvent être corrigés en tenant compte de l'adsorption des acides humiques sur les cellules, adsorption que l'on peut assez souvent observer dans ces milieux liquides et qui est plus ou moins intense selon la nature des souches et les conditions de cultures. L'évaluation de ces molécules adsorbées est difficile à réaliser étant donné l'absence d'éléments spécifiques permettant de les identifier. Pour réaliser l'extraction de ces acides humiques adsorbés, nous avons donc utilisé la seule technique possible : l'élution par une solution de soude (les détergents ne permettent pas de libérer ces molécules). La soude a été employée à la concentration de 0,2 M qui permet une solubilisation assez rapide des molécules humiques sans provoquer leur auto-oxydation ni la destruction des

cellules bactériennes. Les cellules issues des cultures sont donc mises en contact avec cette solution de soude pendant une nuit à température ambiante. La solution est alors récupérée par filtration, neutralisée et amenée à un volume identique à celui de la culture initiale de façon à ce que sa densité optique (toujours mesurée à 350 nm) puisse être ajoutée aux valeurs de DO relevées après l'incubation. Cette valeur corrigée peut être déduite de la densité optique obtenue avec les flacons témoins non ensemencés de façon à calculer le pourcentage de décoloration dû à l'activité de la bactérie.

La minéralisation des mélanoidines est mise en évidence en incorporant la mélanoidine marquée, stérilisée par filtration, dans des cultures bactériennes à raison d'une concentration finale de 0,1 g/l. 2 ml d'une solution de potasse, incorporés dans un petit récipient disposé à l'intérieur du flacon de culture hermétiquement fermé permet le piégeage du CO₂ après 4 heures d'incubation à 35°C, sous agitation orbitale. La quantité de ¹⁴CO₂ piégée est estimée en scintillation liquide. Les témoins sont constitués par des flacons de culture non inoculés.

La proportion de mélanoidines dégradée pendant toute la durée d'incubation des souches, est déterminée en cultivant les bactéries pendant une période de 6 jours en présence de 0,1 g/l de mélanoidines marquées. Le milieu de culture de chacun des flacons est alors filtré sur membrane en fibre de verre (Whatman GF/C), le volume du filtrat récupéré est mesuré et la radioactivité est comptée en scintillation liquide. Les filtres avec les cellules bactériennes récupérées sont introduits dans leurs flacons de départ respectifs et traités avec un scintillateur hydrolysant les cellules (Fluorosol, National Diagnostics). Après digestion, la radioactivité est calculée séparément pour le lysat cellulaire et le filtre en ajoutant le scintillateur Lumagel (Lumac Systems) qui permet d'améliorer le rendement de la scintillation. Les résultats sont corrigés par la technique des standards internes et exprimés en pourcentage de la radioactivité relevée avant incubation à partir des milieux de culture.

La proportion de mélanoidines dégradée peut être déterminée d'une autre façon. Après avoir inoculé et incubé les milieux comme précédemment, les cellules sont centrifugées à 4 000 g pendant 15 min et le culot est lavé 2 fois avec une solution de NaOH 0,01 N. Les surnageants et la solution de lavage sont mélangés et le volume est mesuré. Les cellules sont alors traitées avec

5 ml d'acide sulfurique concentré pendant 16 heures et les lysats obtenus sont amenés à un volume de 50 ml avec une solution de soude 0,1 N. La radioactivité des différentes solutions est mesurée par comptage en scintillation liquide et les résultats sont finalement exprimés en pourcentage comme précédemment.

En plus des acides humiques et mélanoidines, un autre substrat a été expérimenté : il s'agit du Bleu Brillant de Remazol qui a été utilisé par PASTI et CRAWFORD (1991) pour mettre en évidence des activités peroxydasiques susceptibles de dégrader les lignocelluloses.

III. - RESULTATS

A. - Mise au point de la technique de culture

1 - Résultats donnés par les différents milieux

Des premiers essais de culture ont été menés avec le milieu proposé par ADHI et coll. (1988) contenant de l'extrait de levure. Toutes les souches prolifèrent dans ce milieu mais comme il s'est par la suite avéré que la présence d'azote organique ou de facteurs de croissance n'était pas indispensable, ce milieu a été remplacé par d'autres formules totalement synthétiques. Les cultures sont incubées à 35°C avec ou sans agitation et les résultats sont habituellement relevés après une période de 7 jours d'incubation.

a) Résultats obtenus avec le milieu K

Il s'agit d'un milieu non tamponné contenant une quantité relativement élevée en sels. La croissance est relativement faible et, pour un certain nombre de souches, la croissance en culture agitée n'apparaît qu'après plusieurs jours d'incubation. Parallèlement, la décoloration des acides humiques est faible (Tab. 10).

Tableau 10 - Culture en présence du milieu K avec acides humiques naturels
(concentration 0,5 g/l)

Souches	Cultures agitées		Cultures non agitées	
	Croissance	Décoloration en %	Croissance	Décoloration en %
SV	+	15	+	5
C3	+	7	+	6
S2	+	5	+	9
B6	+	20	+	9
P1	+	19	+	6
R5	+	0	+	0
E6	+	10	+	0
B7	+	8	+	5
E7	-	0	+	3
A12	+	12	+	19
A14	+	19	+	26
M3	-	0	+	5
SB1	+	9	+	16
SB3	+	9	+	15
SB4	+	15	+	21

Le nombre de + est proportionnel à la croissance des bactéries.

DO du flacon témoin non inoculé : 0,76.

b) Résultats obtenus avec le milieu P

Dans le tableau 11 sont présentés les résultats donnés par le milieu P tamponné à pH 6,5 en présence d'acides humiques naturels ou de synthèse. Dans ce tableau, la croissance des souches en milieu non agité n'est pas mentionnée puisque celle-ci est approximativement identique dans tous les cas. En culture agitée, la croissance est par contre très différente selon les souches et les réponses données en présence d'acides humiques naturels ne correspondent pas forcément avec celles qui sont obtenues en présence de mélanoidines (cas de B7 et A14, par exemple). On peut noter que la fructification apparaît en milieu liquide avec la majorité des souches et ceci dès le troisième jour d'incubation.

Le tableau 12 exprime quantitativement l'importance de la décoloration des acides humiques incorporés dans ce milieu ainsi que l'importance de l'adsorption des acides humiques (déterminée à partir de la DO des molécules récupérées par le traitement avec NaOH 0,2 N).

c) Résultats obtenus avec le milieu Tr

La décoloration obtenue avec ce milieu est relativement importante pour un certain nombre de souches (Tab. 13). A noter cependant que pour certaines d'entre elles qui ont bien proliféré, aucune réaction sur les acides humiques n'est détectable (par exemple : souches S2, R5 et E7).

2 - Choix des souches et du milieu

A partir de ces résultats, nous avons sélectionné sept souches destinées aux analyses ultérieures ; il s'agit de P1, B6, B7, A14, SB1, SB3, SB4. Ces souches donnent une prolifération plus élevée dans les différents milieux et une dégradation importante des acides humiques avec une faible adsorption sur le mycélium. La souche A12 n'a pas été retenue car elle présente les mêmes caractéristiques taxonomiques que A14.

En ce qui concerne le choix du milieu, K et Tr ont été abandonnés en fonction des résultats indiqués dans les tableaux précédents.

Tableau 11 - Cultures en présence du milieu P avec acides humiques naturels ou de synthèse

Souches	Cultures agitées				Cultures non agitées	
	avec acides humiques		avec mélanoidines		avec acides humiques	
	croissance	adsorption	croissance	adsorption	fructification	adsorption
SV	++	+	+	-	+	+
C3	++	-	++	-	+	+
S2	+	-	+	-	-	-
B6	+	+	+	+	+	+
P1	++	-	+	-	+	+
R5	++	-	++	-	+	-
E6	+	-	+	-	+	+
B7	+	-	+	+	+	+
E7	++	-	-	-	+	-
A12	+	-	-	+	+	+
A14	+	-	-	+	+	+
M3	+	-	+	-	+	+
SB1	+	-	+	+	+	+
SB3	+	+	+	+	-	+
SB4	+	+	+	+	-	+

Le nombre de + est proportionnel à la croissance (en cultures agitées), à l'importance des fructifications (en cultures non agitées) ou au degré d'adsorption des molécules humiques sur les bactéries.

Tableau 12 - Activité minéralisatrice des souches sur les acides humiques incorporés dans le milieu P

Souches	Cultures agitées			Cultures non agitées		
	Décoloration en %	Adsorption en %	Décoloration corrigée en %	Décoloration en %	Adsorption en %	Décoloration corrigée en %
SV	39	9	30	30	11	19
C3	6	-	6	26	ND	ND
S2	13	-	13	14	-	14
B6	10	2	8	15	10	5
P1	0	-	0	16	1	15
R5	0	-	0	8	-	8
E6	0	-	0	1	ND	ND
B7	39	15	24	52	28	24
E7	0	-	0	3	-	3
A12	0	-	0	57	26	31
A14	7	-	7	55	29	26
M3	4	-	4	21	13	8
SB1	0	-	0	53	26	27
SB3	0	-	0	39	25	14
SB4	6	ND	ND	14	9	5

ND = non déterminé.

Tableau 13 - Culture en présence du milieu Tr avec acides humiques naturels

Souches	Cultures agitées				Cultures non agitées			
	Croissance	Décoloration en %	Adsorption en %	Décoloration corrigée en %	Croissance	Décoloration en %	Adsorption en %	Décoloration corrigée en %
SV	++	13	7	6	++	20	6	14
C3	+	0	-	0	+	7	-	7
S2	+	0	-	0	++	0	-	0
B6	+	7	2	5	++	14	5	9
P1	-	0	-	0	++	0	-	0
R5	+	0	-	0	+	2	-	2
E6	+	6	ND	ND	+	2	-	2
B7	+	5	5	0	++	49	29	20
E7	+	0	-	0	+	0	-	0
A12	+	59	44	15	+	27	16	11
A14	+	65	41	24	+	23	10	13
M3	+	18	ND	ND	+	3	-	3
SB1	+	46	38	8	++	27	19	8
SB3	+	34	19	15	++	75	37	38
SB4	-	0	-	0	++	49	30	19

Le nombre de + est proportionnel à la croissance des bactéries.

ND = non déterminé.

Cependant, avec le milieu P 20 mM retenu, nous avons voulu voir si un pH un peu plus élevé (pH 8,0) n'était pas préférable. Les résultats obtenus (Tab. 14) montrent que ce n'était pas le cas pour la plupart des souches.

Nous avons aussi expérimenté un pH plus bas (6,0) mais il donne une croissance faible.

En outre, nous avons essayé d'incorporer dans ce milieu le Tween à 1 g/l mais sans résultat intéressant. De même, en augmentant la concentration en NaCl dans le milieu P (5 g/l au lieu de 0,2 g/l), on obtient une production de pigments dans le milieu, risquant de fausser les résultats.

Tableau 14 - Décoloration des acides humiques obtenus en utilisant le milieu P (20 mM) à pH 7 ou à pH 8

Souches	Décoloration en %	
	pH 7	pH 8
P1	13,00 ± 2,64	19,00 ± 1,00
B6	11,00 ± 1,00	12,00 ± 1,00
B7	52,00 ± 2,00	24,22 ± 1,52
A14	38,00 ± 2,00	22,00 ± 2,00
SB1	51,00 ± 2,64	18,00 ± 2,00
SB3	56,66 ± 2,08	18,33 ± 1,52
SB4	38,33 ± 1,52	4,33 ± 2,08

Pour la suite du travail, le nombre de souches a encore été réduit ; B6 et SB1 ont en effet été éliminées : la première à cause de sa faible activité, la seconde parce qu'elle est très proche de SB3. Avec ces souches, les modalités de stérilisation des acides humiques ont été examinées et les résultats obtenus (Tab. 15) montrent l'utilité de la stérilisation par filtration.

Tableau 15 - Décoloration du milieu en utilisant un acide humique (concentration 0,25 g/l) stérilisé par filtration ou par autoclavage (110°C pendant 30 min).

Souches	Décoloration en pourcentage	
	AH autoclavé	AH filtré
P1	9,00 ± 1,00	13,00 ± 2,64
B7	48,00 ± 2,00	52,00 ± 2,00
A14	38,33 ± 2,08	38,00 ± 2,00
SB3	22,33 ± 2,08	56,66 ± 2,08
SB4	4,66 ± 1,52	38,33 ± 1,52

DO du flacon témoin non inoculé contenant l'acide humique stérilisé par autoclavage : 0,36.

DO du flacon témoin non inoculé contenant l'acide humique stérilisé par filtration : 0,33.

Signalant que dans ce tableau 15, le faible résultat obtenu avec l'échantillon autoclavé et la souche SB4 est dû à la très faible prolifération de cette dernière.

Compte-tenu de l'ensemble de ces résultats, toutes les expériences qui suivent ont par conséquent été réalisées avec le milieu phosphate 20 mM à pH 7 et incorporation d'AH stérilisé par filtration.

3 - Influence de la nature de l'inoculum

Comme nous l'avons noté précédemment, l'ensemencement des milieux liquides se fait à partir de spores âgées de 2 à 4 semaines. Nous avons aussi essayé d'ensemencer ces milieux avec des cellules végétatives âgées de 24 heures. Nous n'avons obtenu des résultats satisfaisants qu'avec la souche B7 (Tab. 16, Fig. 9 et 10).

Tableau 16 - Résultats obtenus avec des inoculations réalisées avec des cellules végétatives ou des spores de la souche B7

		Décoloration en %	Poids sec avec AH (en mg)	Poids sec sans AH (en mg)
48 h de croissance	spore	14,95 ± 1,40	8,7 ± 1,5	6,3 ± 0,6
	cellule	17,37 ± 2,82	7,7 ± 1,5	5,7 ± 0,6
72 h de croissance	spore	26,15 ± 5,01	9,7 ± 1,5	7,3 ± 0,6
	cellule	28,74 ± 0,57	8,0 ± 1,0	6,3 ± 0,6
96 h de croissance	spore	52,14 ± 0,94	16,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0
	cellule	37,93 ± 3,22	15,0 ± 1,0	12,0 ± 1,0
120 h de croissance	spore	45,54 ± 8,13	15,0 ± 1,0	13,0 ± 0,0
	cellule	42,40 ± 7,40	15,0 ± 1,0	12,0 ± 0,0
168 h de croissance	spore	49,59 ± 5,01	15,7 ± 0,6	12,7 ± 0,6
	cellule	37,33 ± 0,19	15,3 ± 0,6	13,0 ± 0,0
216 h de croissance	spore	56,51 ± 3,83	13,7 ± 0,6	13,0 ± 0,0
	cellule	49,31 ± 7,10	13,7 ± 0,6	12,3 ± 0,6
384 h de croissance	spore	56,59 ± 6,96	13,0 ± 0,0	12,3 ± 0,6
	cellule	56,48 ± 0,47	13,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0

Les résultats sont la moyenne ± écart-type de trois répliques.

On n'améliore donc pas la technique en utilisant une suspension de cellules, plus difficile à réaliser qu'une suspension de spores.

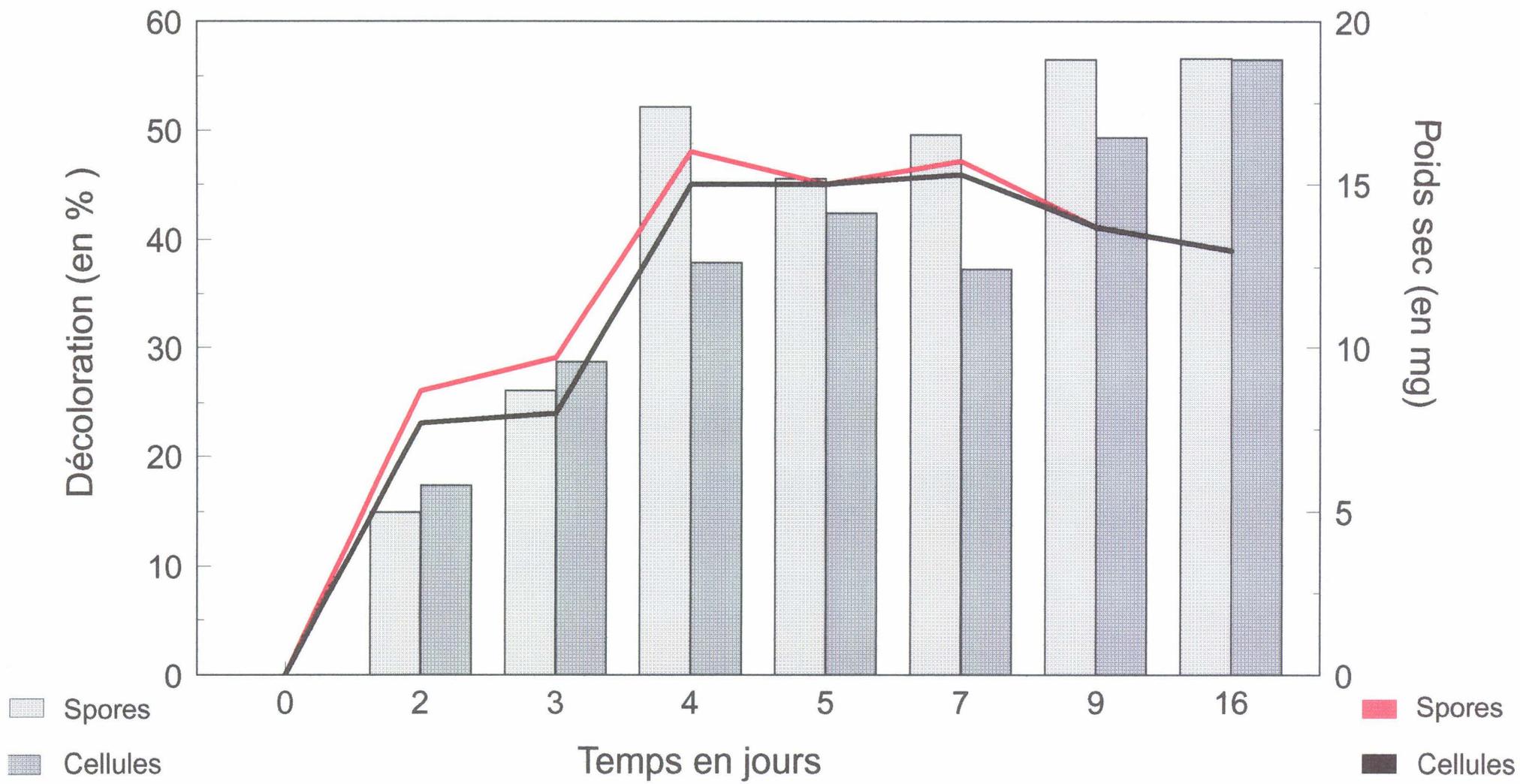


Figure 9 - Représentation graphique des résultats indiqués dans le tableau 16



% de décoloration /mg de poids sec

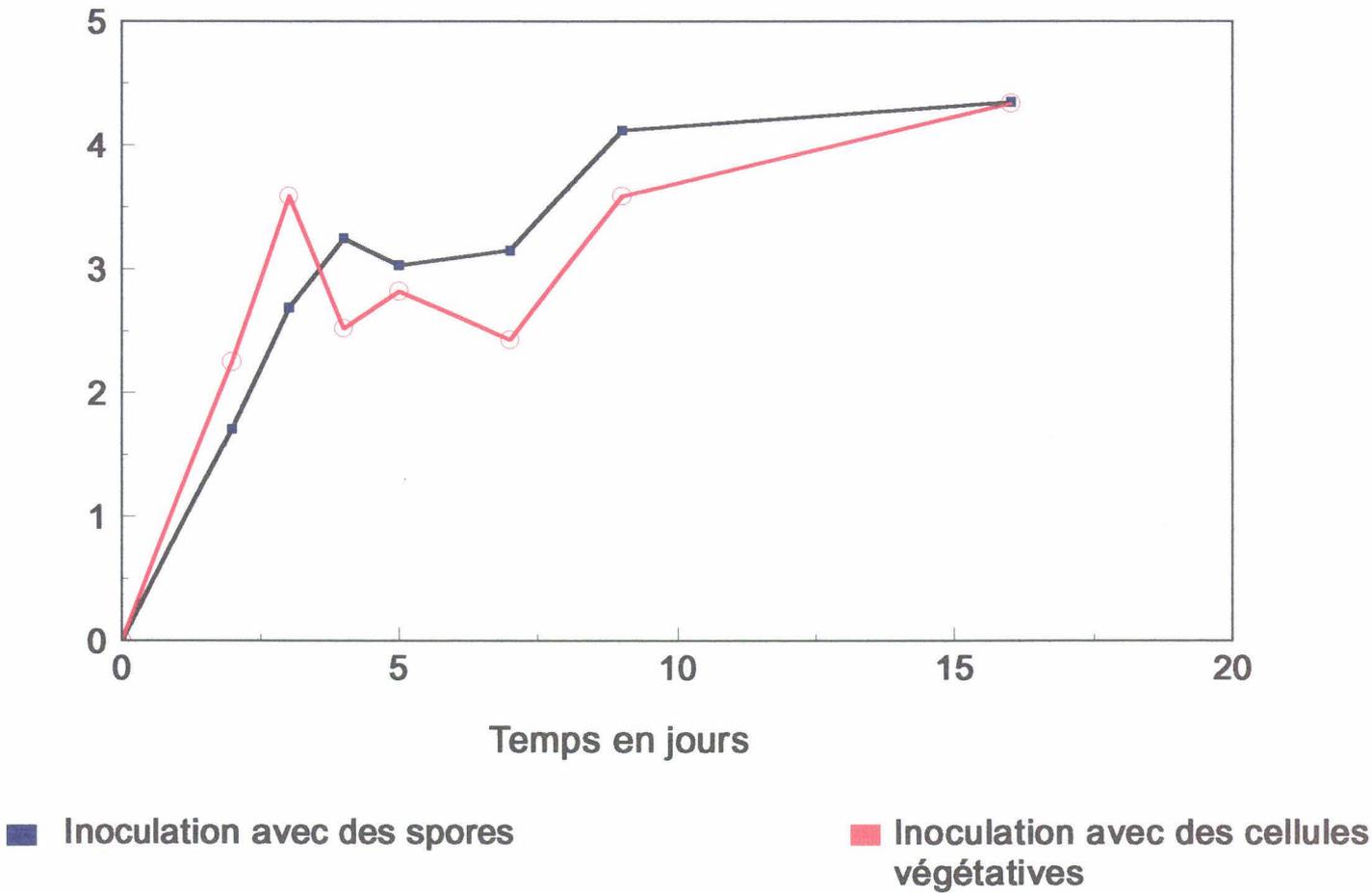


Figure 10 - Activité décoloratrice exprimée par mg de poids sec à partir des résultats indiqués dans le tableau 16

B. - Résultats de biodégradation

1 - Cas des acides humiques naturels

L'activité des souches sélectionnées sur les acides humiques après 6 jours d'incubation est indiquée dans le tableau 17 (qui comprend la souche X3 isolée postérieurement aux autres).

D'après ce tableau, on voit que les résultats obtenus après incubation sous air sont variables puisque les pertes en acides humiques des milieux conduisent à une décoloration comprise entre 31 % et 74 %. L'adsorption des acides humiques sur les cellules bactériennes est en partie responsable de cette décoloration et il est nécessaire d'en tenir compte pour calculer les valeurs de décoloration susceptibles de représenter véritablement la biodégradation de ces acides humiques. La capacité d'adsorption des cellules varie selon les souches et il est important de remarquer qu'elle n'est pas toujours en relation avec leur croissance. On peut ainsi constater qu'au cours de l'expérience, la souche B7 s'est signalée par une adsorption importante des acides humiques (responsable de 27,75 % de la décoloration du milieu de culture) alors que c'est elle qui produit la biomasse la plus faible (14,3 mg en poids sec par flacon).

Lorsque l'incubation est réalisée sous oxygène, la décoloration des milieux contenant les acides humiques est en général un peu plus importante que sous air, sauf pour la souche SB4. Les résultats relatifs à ce type d'incubation (Tab. 17) ne mentionnent pas les corrections imputables aux phénomènes d'adsorption cellulaire car, dans ce cas, les molécules d'acides humiques semblent être beaucoup plus étroitement associées avec les enveloppes périphériques des cellules, empêchant leur élution totale par la solution de soude.

2 - Cas des mélanoidines

Les résultats sont indiqués dans le tableau 18 pour les mélanoidines non marquées, et dans les tableaux 19 et 20 pour les molécules radioactives. Ici encore, l'association intime entre le substrat et les composants périphériques des cellules ne permet pas d'apprécier l'importance de l'adsorption.

Tableau 17 - Influence de l'oxygène sur la biodégradation des AH par les souches sélectionnées

Souches	Incubation sous air			Incubation sous oxygène	
	décoloration du milieu en %	résultats corrigés en % (a)	poids secs des bactéries en mg/flacon	décoloration du milieu en %	poids secs des bactéries en mg/flacon
P1	31,09 ± 2,20	12,72	13,5 ± 2,5	37,45 ± 1,20	31,60 ± 1,2
B7	74,65 ± 1,10	46,90	14,3 ± 1,1	69,91 ± 1,00	26,66 ± 0,6
A14	36,00 ± 1,60	22,08	27,5 ± 3,5	40,55 ± 2,20	24,00 ± 1,0
SB3	33,77 ± 1,20	17,98	19,5 ± 0,5	36,42 ± 1,60	25,66 ± 3,1
SB4	39,75 ± 2,10	23,63	25,5 ± 2,5	16,51 ± 0,88	22,00 ± 1,0
X3	55,95 ± 0,85	32,15	39,0 ± 5,0	58,50 ± 1,50	32,00 ± 0,5

Les résultats correspondent à une moyenne ± l'écart type de 3 répliques.

(a) Ces résultats sont obtenus en déduisant des valeurs précédentes la décoloration due aux acides humiques adsorbés à la surface des cellules bactériennes.

Tableau 18 - Influence de l'oxygène sur la dégradation des mélanoidines par les souches sélectionnées (concentration du substrat : 0,1 g/l)

Souches	Incubation sous air		Incubation sous O ₂	
	Décoloration du milieu en %	Poids secs des bactéries en mg/flacon	Décoloration du milieu en %	Poids secs des bactéries en mg/flacon
P1	10,0 ± 3,0	17,5 ± 1,5	23,3 ± 1,1	16,0 ± 1,0
B7	75,1 ± 2,0	12,5 ± 0,5	58,0 ± 2,5	12,5 ± 0,5
A14	25,8 ± 1,6	25,6 ± 0,6	51,1 ± 1,1	24,7 ± 1,1
SB3	54,1 ± 3,7	24,5 ± 1,5	55,0 ± 2,1	20,0 ± 3,0
SB4	0	24,3 ± 1,1	8,9 ± 0,7	18,3 ± 1,5
X3	46,3 ± 3,7	31,0 ± 1,5	59,3 ± 0,5	31,0 ± 0,5

Les résultats correspondent à une moyenne ± écart-type de 3 répliques. DO du flacon témoin non inoculé contenant la mélanoidine : 0,26.

En ce qui concerne les mélanoidines radioactives, nous avons utilisé, dans un premier temps, de l'acide sulfurique concentré pour solubiliser les cellules bactériennes afin d'évaluer leur radioactivité (Tab. 19). (Nous avons vérifié au préalable que cet acide sulfurique n'entraînait aucune décarboxylation de ces mélanoidines marquées).

L'expérience précédente a par la suite été reprise en employant un scintillateur qui permet de solubiliser les cellules. L'incubation a été faite comme précédemment sous air ou sous oxygène pendant 6 jours d'incubation (Tab. 20).

A partir des flacons témoins, non inoculés, et incubés dans les mêmes conditions, 98,41 % de la radioactivité initiale a été récupérée sous air et 97,95 % sous oxygène.

Grâce à ce marquage du substrat, la rétention des molécules sur les cellules bactériennes peut être estimée (molécules simplement adsorbées ou ayant

Tableau 19 - Résultats de la minéralisation des mélanoidines marquées par les souches

Souches	Radioactivité au temps 0 en cpm	Radioactivité après 7 jours de croissance en cpm	Radioactivité des cellules en cpm	Radioactivité totale récupérée		
				en cpm	en %	
P1	air	384024	273347	4455	277802	72,3 ± 2,3
	O ₂	368616	268491	6127	274618	74,5 ± 2,5
B7	air	254376	117609	46212	163821	64,5 ± 1,5
	O ₂	266376	183747	43207	226954	84,9 ± 3,2
A14	air	286989	225900	52479	278379	93,0 ± 0,0
	O ₂	296352	191201	52144	243345	82,1 ± 2,5
SB3	air	282720	232495	10644	243139	86,0 ± 0,5
	O ₂	292048	238822	19640	255709	88,5 ± 2,5
SB4	air	275376	213484	42175	255659	92,8 ± 2,7
	O ₂	283032	259299	11704	271003	95,7 ± 1,7

Les résultats correspondent à une moyenne ± l'écart type de 3 répliques.

Tableau 20 - Résultats de la minéralisation des mélanoidines marquées par les souches

Souches et conditions d'incubation		Pourcentage de décoloration	Radioactivité récupérée dans les filtrats de culture en %	Radioactivité associée aux cellules en % (a)	Radioactivité totale récupérée en %
P1	air	26,0 ± 0,8	46,14	44,53	90,67 ± 1,15
	O ₂	30,3 ± 2,8	49,05	36,73	85,78 ± 3,40
B7	air	40,0 ± 6,6	37,73	50,80	88,53 ± 2,18
	O ₂	54,3 ± 4,9	32,76	44,59	77,35 ± 3,20
A14	air	53,5 ± 3,5	29,28	55,47	84,75 ± 1,47
	O ₂	66,3 ± 0,5	23,91	54,34	78,25 ± 2,80
SB3	air	28,5 ± 0,5	51,20	35,30	86,50 ± 0,68
	O ₂	54,0 ± 3,0	34,59	45,84	80,43 ± 2,29
SB4	air	46,6 ± 4,7	32,37	55,20	87,57 ± 1,68
	O ₂	51,6 ± 2,3	30,98	56,33	87,31 ± 1,69
X3	air	46,3 ± 3,7	32,51	51,74	84,25 ± 1,62
	O ₂	59,3 ± 0,5	28,15	51,91	80,06 ± 1,00

(a) : dans ces résultats, la radioactivité provenant des filtres a été additionnée à celle des cellules. Les résultats correspondent à une moyenne ± l'écart type de 3 répliques.

pénétrées à l'intérieur même des cellules). Ces résultats prouvent que l'oxygène peut avoir un effet positif sur la biodégradation des polymères.

Les expériences destinées à mesurer la minéralisation de la mélanoidine par piégeage du $^{14}\text{CO}_2$ ne sont cependant pas utilisables pour la comparaison des souches. Certains flacons expérimentaux ont donné des résultats compris entre 500 et 1 300 dpm selon les souches (avec environ 200 dpm pour les flacons témoins non inoculés), mais les répliques provenant d'une même souche ne fournissent pas de résultats homogènes. Il est possible que cette irrégularité de la réponse bactérienne soit due à une inhibition des enzymes, provoquée par l'adsorption trop brutale et probablement excessive des molécules de mélanoidine.

En effet, cette mélanoidine n'est pas apportée au temps 0 mais après croissance des bactéries. Si cette incorporation était réalisée au temps 0, comme on veut piéger le CO_2 produit, il faudra mener les cultures dans des flacons hermétiquement fermés et cela provoquerait alors très rapidement une anaérobiose par suite de la consommation de l'oxygène, donc une absence d'activité catabolique. D'autre part, l'agitation des flacons est indispensable pour homogénéiser la mélanoidine dans le milieu et initier une réaction rapide sur ce substrat apporté.

3 - Résultats obtenus avec le Bleu Brillant de Rémazol

Les essais de décoloration du Bleu Brillant de Rémazol ont été réalisés en milieu gélosé ou en milieu liquide à la concentration finale de 100 mg par litre.

En milieu gélosé, des auréoles de décoloration sont visibles avec la souche B7 et X3 mais certaines, comme A14, prolifèrent peu.

En milieu liquide, aucune souche ne peut proliférer avec cette concentration, le Bleu Brillant de Rémazol étant inhibiteur. Avec 50 mg/l, X3, par exemple, a donné $53,5 \pm 0,5$ % de décoloration (lecture à 592 nm - 3 répliques) et un poids sec de 26 mg/flacon (flacon de culture contenant 50 ml de milieu auxquels on ajoute 150 mg/l d'extrait de levure. Incubation à 35°C pendant 6 jours).

IV. - DISCUSSION

Toutes nos souches sont capables de proliférer dans un milieu de culture synthétique, ce qui peut faciliter l'isolement éventuel d'enzymes excrétées par les bactéries. Ce résultat n'était pas assuré au départ puisque le milieu de culture gélosé, qui a permis l'isolement des souches à partir d'échantillons de sol, contenait l'extrait de levure. Le glucose est par contre indispensable comme source de carbone et ne peut pas être remplacé par les acides humiques.

Pour la mise au point de ces milieux de culture, nous avons pris soin d'incorporer tous les éléments susceptibles d'être nécessaires à la croissance ou au métabolisme des Streptomyces et à une concentration suffisamment élevée de façon à ce qu'aucun de ceux-ci ne deviennent déficient pour la production des facteurs enzymatiques nécessaires à l'attaque de l'humus.

La minéralisation des acides humiques est plus importante en présence d'un milieu tamponné qui, par ailleurs, favorise la croissance. La concentration de certains de ces éléments, en particulier le phosphate (KENDRICK et ENSIGN 1983) et le calcium (DAZA et coll. 1989, NATZUME et coll. 1989), conditionne également la phase de sporulation des Streptomyces avec la production des différents métabolites secondaires associés avec cette différenciation.

Nous avons signalé que les souches de Streptomyces sélectionnées avaient parfois tendance à perdre leur activité de décoloration sur les milieux gélosés et que les résultats obtenus sur milieu liquide n'étaient pas toujours très réguliers. Certaines colonies, présentant une auréole très nette de décoloration sur le milieu de sélection, ont d'ailleurs perdu cette aptitude dès le premier repiquage. Avec S. viridosporus, une variabilité dans les réponses des cultures a également été notée à plusieurs reprises. Ces problèmes sont probablement une des conséquences de l'exceptionnelle plasticité du génome des Streptomyces. Ce phénomène bien connu (BIRCH et coll. 1990, LEBLOND et coll. 1990) a été mis en évidence pour nos souches en isolant de nombreux mutants instables caractérisés par leur incapacité de sporuler et de croître normalement sur milieu minéral glucosé. Cet aspect de l'instabilité du génome sera envisagé à nouveau dans la dernière partie de ce Mémoire.

Lorsque les souches sont incubées en présence d'acides humiques, on constate, pour celles qui sont les plus actives, que la décoloration survient dès les premiers jours d'incubation. Ceci tend à supposer que ce phénomène de biodégradation est en relation avec la croissance primaire des bactéries. McCARTHY (1987) a également mis en relation le mécanisme de la dégradation de la lignine par les Actinomycètes avec leur croissance alors que l'activité ligninolytique des Champignons basidiomycètes (ex. : Phanerochaete chrysosporium), tout comme leur activité sur les acides humiques, est caractéristique du métabolisme secondaire (McCARTHY 1987, BLONDEAU 1989).

Bien que l'origine extracellulaire de l'activité bactérienne semblait évidente sur le milieu de sélection, il n'a jamais été possible de reproduire cette activité décolorante à partir des filtrats de culture en milieu liquide.

Ce type d'incubation, qui est toujours accompagné d'une adsorption importante des molécules humiques sur les bactéries, suggère que l'activité catabolique se situe à la surface des cellules.

En absence du glucose, nos Streptomyces sont incapables de proliférer dans le milieu de culture contenant les acides humiques. Pourtant, quelques auteurs signalent l'utilisation possible de ces acides comme seule source de carbone par des Streptomyces (KHANDELWAL et GAUR 1980, MONIB et coll. 1981, HAYAKAWA et NONOMURA 1987) mais il s'agit de résultats qui ont été obtenus avec des fractions humiques dont la pureté n'était pas contrôlée, de sorte que le carbone dégradé par les bactéries peut être constitué de fractions organiques en cours d'humification et peu résistantes à la biodégradation. MURATA et coll. ont montré, en 1992, que S. weriaensis était capable de décolorer les mélanoidines mais, dans ce cas, la présence d'une source annexe de carbone assimilable était absolument indispensable.

La stimulation de l'activité microbienne sur les acides humiques ou mélanoidines par l'oxygène n'est pas exceptionnelle. Plusieurs auteurs (KIRK et FENN 1982, REID et SEIFERT 1982) ont signalé notamment une accélération de la dégradation de la lignine par les champignons de la pourriture blanche en présence d'une atmosphère enrichie en oxygène.

Depuis plusieurs années, des résultats ont également montré que ces Streptomyces sont capables de minéraliser toute une gamme de composés biorésistants. GOODFELLOW et coll. (1988) citent, par exemple, la lignine qui peut être utilisée comme seule source de carbone par Streptomyces badius (l'activité est cependant plus élevée en présence d'une source annexe de carbone et d'azote) (BARDER et CRAWFORD 1981). D'autres espèces de Streptomyces sont capables d'utiliser la sulfonate de lignine comme seule source de carbone (HARAGUCHI et MOROHOSHI 1976). Notons aussi que S. parvullus et S. plicatus dégradent le polyuréthane polyester (POMMER et LORENZ 1986) mais l'utilisation précise de ce substrat comme source de carbone par ces bactéries n'a pas été prouvée. La croissance des Actinomycètes n'a pas été observée sur le polyuréthane par PANKHURST et coll. (1972). Les Streptomyces sont aussi capables de décolorer des colorants (PASTI et CRAWFORD 1991) tels que le Bleu Brillant R de Rémozol (RBBR), le sulfonate de polyvinylamine anthroquinone (colorant bleu, polyB-411) et le sulfonate de polyvinylamine anthropyronne (colorant rouge polyR 478). La présence de lignocellulose dans le milieu de culture augmente l'activité bactérienne.

TROISIEME PARTIE

ANALYSE DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE DES SOUCHES

I. - INTRODUCTION

Nous avons vu que des peroxydases extracellulaires pouvaient être à l'origine de l'attaque des acides humiques par des champignons basidiomycètes. Chez les Streptomyces, ce phénomène n'est pas extracellulaire puisque les filtrats de culture sont inactifs, mais il est possible de suggérer une action enzymatique à la périphérie des cellules, sans nécessiter la pénétration des molécules humiques, phénomène en principe difficilement concevable. D'autre part, les résultats précédents ont montré que la dégradation des acides humiques naturels ou de synthèse était généralement stimulée par une incubation des bactéries sous atmosphère d'O₂. Pour essayer de comprendre un peu mieux l'origine de cette activité catabolique, nous avons essayé de mesurer l'activité peroxydasique intracellulaire des Streptomyces et également l'activité de deux autres enzymes qui peuvent être en relation soit avec la teneur en O₂ des milieux, soit avec l'activité des peroxydases : il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase. La SOD représente un moyen de défense cellulaire contre la toxicité excessive en cas de suroxygénation des milieux, mais elle peut également être source de substrat pour les peroxydases (réaction produite : $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$). Cet H₂O₂, d'origine respiratoire, est de toute façon décomposable par les catalases (réaction produite : $H_2O_2 \longrightarrow H_2O + 1/2 O_2$).

II. - MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. - Activité peroxydasique

1 - Obtention des extraits acellulaires

Trois techniques de désintégration cellulaire ont été testées. Les bactéries utilisées ont été cultivées dans des flacons plasma contenant 50 ml de milieu P 20 mM, pH 7 (avec 50 mg/l d'extrait de levure pour éviter leur adsorption sur le verre). Lorsqu'elles sont arrivées en fin de phase de croissance, elles sont récupérées par filtration sur tamis en nylon et rincées plusieurs fois avec une solution tampon de succinate de sodium 50 mM (pH 5). Après remise en suspension dans 5 ml de ce tampon, elles sont soit :

- traitées aux ultrasons pendant 10 min à 0°C (Branson Sonifer B30),
- broyées dans un mortier à froid après congélation à l'azote liquide,
- lysées par deux passages pendant environ 10 min en presse de French à 110 psig.

Les débris cellulaires et les bactéries non lysées sont éliminés par centrifugation à 50 000 g pendant 30 min de façon à obtenir un extrait acellulaire brut.

2 - Dosages enzymatiques

Plusieurs substrats ont été employés dans un premier temps pour mesurer les activités peroxydasiques, et ces essais ont été réalisés en présence de tampons de nature différente et de pH différents afin de déterminer les conditions qui permettent d'assurer la stabilité des substrats. Le tampon succinate de sodium 50 mM à pH : 5,4 ; 5,0 ; 5,5 et 6,0 a été utilisé en présence du substrat N,N,N',N'-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine (Sigma) 1 mM (la réaction est suivie à 610 nm). Le substrat diméthyl phényl diamine (Sigma) 1 mM a été testé avec ce même tampon succinate de sodium 50 mM à pH 5,0 et 6,0 ou encore avec le tampon Tris-HCl pH 8 (la réaction est suivie à 515 nm). Le 2,6-diméthoxyphénol (Sigma) 1 mM a été essayé avec le tampon succinate de sodium 50 mM pH 5,0, le tampon Tris-HCl pH 7,2 et 8,0 ou le tampon phosphate 50 mM pH 6 et pH 7 (la réaction est suivie à 470 nm). Avec ce dernier substrat, qui permet de doser l'activité Mn peroxydasique dans les extraits acellulaires et dans les culots de centrifugation, le Mn est incorporé à la concentration 0,1 mM. D'autres substrats ont été testés :

- le 2,4-dichlorophénol (Sigma) 1 mM avec du tampon succinate de Na pH 5,5 100 mM contenant le 4-aminoantipyrine 1 mM (la réaction est suivie à 510 nm) ;
- la L3-4-dihydroxyphényl alanine (Sigma) 1 mM avec le tampon phosphate 100 mM pH 7 (la réaction est suivie à 470 nm) ;
- la 3-3'-diaminobenzidine (Sigma) 1 mM avec le tampon phosphate 50 mM pH 7 (la réaction est suivie à 480 nm).

Les dosages enzymatiques sont effectués en présence ou non d' H_2O_2 0,1 mM. Le dosage des protéines totales est réalisé par la méthode de LOWRY et coll. (1951). Les témoins contiennent des extraits dénaturés par chauffage.

Pour ces dosages et notamment avec le N,N,N',N' tétraméthyl phénylène diamine, une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzymes nécessaire pour obtenir une augmentation d'absorbance de 1 unité par minute.

B. - Purification des peroxydases et électrophorèse

1 - Purification des peroxydases

Les peroxydases sont purifiées par précipitation avec le sulfate d'ammonium (MLIKI et ZIMMERMAN 1992). Ce sulfate d'ammonium est d'abord incorporé dans l'extrait brut de façon à obtenir 30 % de saturation. Après une nuit à 0°C et centrifugation (15 000 g pendant 20 min), le surnageant est amené à 80 % de saturation et laissé 24 h à 0°C. Après nouvelle centrifugation à 50 000 g pendant 30 min, les protéines sont suspendues dans 2 ml de tampon acétate de Na 20 mM pH 5,4 et dialysées contre le même tampon pendant une nuit. La première purification est obtenue avec une colonne (1,8 x 12 cm) échangeuse d'anions MonoQ (Pharmacia) équilibrée avec le tampon précédent et éluée en utilisant un gradient continu de NaCl (0,1 M à 0,6 M). Les fractions présentant une activité peroxydasique sont retenues, dialysées contre le tampon acétate de sodium 20 mM pH 5,4 pour éliminer le NaCl, puis concentrées en évaporation rotative avant d'être déposées sur une colonne (1,4 x 90 cm) d'Ultragel AC A44 (IBF) équilibrée et éluée avec le tampon acétate de sodium 100 mM pH 5,4. Les fractions donnant une réaction positive avec le tétraméthyl phénylène diamine sont concentrées et dialysées pour l'analyse en électrophorèse.

2 - Analyse électrophorétique

a) En conditions non dénaturantes

L'analyse des protéines, résultant de la précipitation au sulfate d'ammonium ou du fractionnement sur les gels, est réalisée sur un support de polyacrylamide. Ce support est préparé à partir de 2 gels de concentrations différentes en acrylamide, de façon à obtenir un gradient.

Composition des gels

	Gel le plus concentré	Gel le moins concentré
Solution A (30 g acrylamide + 0,8 g bis-acrylamide dans 100 ml d'eau : filtration sur Whatman n°1 et conservation à l'obscurité)	8,0 ml	4,0 ml
Tampon Tris-HCl pH 8,8 (36,3 g de Tris dans 48 ml d'eau amené à pH 8,8 avec HCl N et complété à 100 ml avec de l'eau)	2,5 ml	2,5 ml
Solution B (persulfate d'ammonium à 1,5 % dans l'eau préparée juste avant l'emploi)	1,0 ml	0,8 ml
Glycérol	5,0 ml	0,0 ml
H₂O	3,5 ml	12,5 ml
Temed	12,0 µl	12,0 µl

Le mélange des deux solutions est effectué progressivement grâce à un système à double réservoir et une pompe péristaltique. Il s'écoule entre les deux plaques en verre disposées verticalement et séparées par des espaceurs de 1,5 mm d'épaisseur. Le gel de séparation ainsi obtenu est formé d'un gradient linéaire d'acrylamide (de 6 % à 12 %). Il se polymérise pendant 1 nuit.

Le gel de concentration contient 3,5 ml de la solution A, 5 ml de tampon Tris-HCl pH 6,8 (6 g de Tris dans 40 ml d'eau amené à pH 6,8 avec HCl N, puis complété à 100 ml avec de l'eau), 2,5 ml d'une solution de riboflavine (0,004 % conservée à 4°C à l'obscurité), 9 ml d'H₂O et 15 µl de Temed.

Avant de couler ce gel, un peigne est placé entre les 2 plaques de verre afin de réaliser les logettes destinées aux dépôts des échantillons. Le peigne est enlevé après polymérisation complète du gel.

Les échantillons sont déposés à l'aide d'une seringue Hamilton à raison de 60 μ l par puits. Ils contiennent du bleu de bromophénol (solution à 10 mg/ml dans du saccharose à 20 %) à raison de 25 μ l ajouté à 100 μ l d'extrait à analyser.

Le tampon d'élution contient 3 g de Tris et 14,3 g de glycine pour 1 000 ml d'eau (pH 8,3).

La migration se déroule à température ambiante pendant 5 h (150 Volts pendant 30 min, puis 200 Volts).

Les enzymes sont révélées en baignant les gels obtenus dans un tampon succinate de Na 50 mM pH 5 contenant le tétraméthyl phénylène diamine (4 mM) et H_2O_2 (0,4 mM).

b) En conditions dénaturantes

Les gels sont préparés comme ci-dessus mais ils contiennent en plus 1 % d'une solution de SDS à 10 %. Les échantillons (60 μ l par puits toujours) sont mélangés avec un tampon (25 μ l de tampon pour 100 μ l d'échantillon) qui comprend : H_2O (3 ml), tampon Tris-HCl pH 6,8 (1 ml), glycérol (1,6 ml), SDS à 10 % (1,6 ml), β -mercaptoéthanol (0,4 ml) et du bleu de bromophénol (0,4 ml d'une solution à 0,5 % dans H_2O). Ce mélange tampon avec l'extrait protéique est placé au bain marie à 95°C pendant 4 min. Pour estimer le poids moléculaire des protéines séparées dans ces conditions électrophorétiques, une gamme témoin de protéines à PM connu (Sigma) est utilisée. Elle comprend : lysozyme (PM : 14 300), β -lactoglobuline (PM : 18 400), trypsinogène (PM : 24 000), pepsine (PM : 34 700), albumine d'oeuf (PM : 45 000), albumine bovine (PM : 66 000). Ces protéines sont déposées à raison de 10 à 15 μ g par puits.

Pour ces gels obtenus en conditions dénaturantes, les enzymes ne sont plus identifiables par leur activité spécifique, mais par coloration dans une solution de bleu de Coomassie à 0,1 % préparée dans un mélange de méthanol/acide acétique/eau (50/10/40). La décoloration du gel est effectuée ensuite avec un mélange méthanol/acide acétique/eau (25/10/65).

C. - Recherche de l'activité catalase et superoxyde dismutase (SOD)

1 - Préparation des extraits acellulaires et membranaires

Les flacons de culture sont incubés sous air ou sous oxygène. Les cellules, récupérées sur filtre de nylon, sont reprises ici dans 5 ml de tampon phosphate pH 8,5 0 mM pour le dosage de l'activité SOD et dans un tampon phosphate pH 6,5 pour le dosage de l'activité catalase. Pour l'obtention des extraits acellulaires, les cellules sont soniquées pendant 9 min, puis centrifugées à 30 000 g pendant 30 min à 4°C. En ce qui concerne la préparation des suspensions membranaires et des extraits cytoplasmiques destinés au dosage de l'activité SOD, la technique de HALL et coll. (1987) a été utilisée avec quelques modifications. Les cellules soniquées sont tout d'abord centrifugées à 5 000 g pendant 10 min pour enlever les débris cellulaires et les cellules non cassées, puis à 20 000 g pendant 30 min pour éliminer le culot contenant les parois. Une ultracentrifugation à 105 000 g pendant 90 min permet ensuite de sédimenter les membranes qui sont solubilisées dans le tampon phosphate pH 8,0.

2 - Dosage de la catalase et la SOD

L'activité catalase est détectée qualitativement en déposant, sans agitation, 2 à 3 gouttes d'eau oxygénée (H_2O_2) à 30 % dans un tube contenant l'extrait.

L'oxygène libéré lors de l'incorporation de l' H_2O_2 peut être mesuré avec une électrode à oxygène.

Une autre méthode de dosage consiste à mesurer la décomposition de H_2O_2 au spectrophotomètre à 240 nm (méthode de CLARA et KNOWLES 1984). Cette H_2O_2 est utilisée à une concentration de 17 mM. Une unité d'activité enzymatique correspond à une μ mole de H_2O_2 décomposée par minute (coefficient d'extinction pour H_2O_2 : 43,6 M/cm à 25°C).

Les protéines totales des extraits sont déterminées à chaque fois par la méthode de LOWRY et coll. (1951).

Le dosage de la SOD est réalisé en présence de NBT (Nitro-Blue Tetrazolium) dont la réduction est obtenue par le superoxyde O_2^- généré par le système xanthine-xanthine oxydase. Dans un volume de 5 ml final, on utilise 0,5 ml d'extrait, du tampon phosphate 50 mM pH 8, EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique) 0,1 mM, NBT (Sigma) 0,1 mM, xanthine (Sigma) 0,05 mM et la xanthine oxydase (Sigma) 20 μ g/ml.

Le taux de réduction du NBT est mesuré à 560 nm après une heure d'incubation à 37°C, une unité de SOD est habituellement définie comme la quantité d'enzymes nécessaire pour inhiber la réduction du NBT de 50 %. Dans notre cas, nous avons préféré utiliser une courbe étalon préparée à partir d'un échantillon purifié de SOD (Sigma).

III. - RESULTATS

A. - Dosage de l'activité péroxydasique

1 - Mise au point de la technique

a) Comparaison entre les différentes techniques de désintégration de cellules

A partir d'un même échantillon séparé en trois fractions identiques, chacune des fractions est soumise à une technique de désintégration cellulaire. Un dosage de protéines est ensuite effectué à partir des extraits acellulaires pour quantifier l'efficacité des traitements. Ce dosage de protéines a donné :

- 1,16 mg/ml pour l'extrait issu du broyage avec l' N_2 liquide,
- 1,7 mg/ml pour l'extrait traité avec la presse de French,
- 1,8 mg/ml pour l'extrait traité aux ultrasons.

Nous obtenons donc la même quantité de protéines/ml d'extrait dans les deux derniers cas et pour des raisons de commodité, c'est la technique de sonification qui a été finalement retenue.

b) Comparaison entre les pH, les substrats et les tampons utilisés

Parmi les différents tampons et substrats testés, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le tampon succinate 50 mM à pH 5 et le N,N,N',N'-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine comme substrat.

Avec le 2,4-dichlorophénol, le 2,6-diméthoxyphénol, la L-3,4-dihydroxyphenylalanine, la 3,3'-diaminobenzidine et le diméthylphényl diamine, de très faibles activités enzymatiques ont été enregistrées dans les différentes conditions expérimentales testées.

2 - **Activité peroxydasique**

a) A partir des extraits acellulaires bruts

Les premiers résultats de dosages proviennent d'extraits issus d'une centrifugation à 30 000 g des cellules cassées. Le tableau 21 et la figure 11 permettent de comparer les activités enzymatiques obtenues après 48 h et 72 h de culture des souches. L'incubation est réalisée soit en atmosphère ordinaire (20 % d'oxygène), soit sous atmosphère d'oxygène pur. Enfin, ces dosages de peroxydases sont effectués avec ou sans incorporation d'H₂O₂.

Pour les souches B7, A14, SB3 et X3, l'activité peroxydasique est plus élevée après 72 h de croissance par rapport à 48 h de croissance. Donc, pour ces souches, l'activité peroxydasique évolue encore entre 48 h et 72 h de croissance ce qui n'est pas le cas pour P1, SV et SB4. De même, l'incubation sous oxygène stimule la production de peroxydases chez A14, X3 et ce n'est pas le cas pour B7, SB3, P1 et SB4. Pour ce qui est de l'incorporation d'H₂O₂, l'activité des souches est soit la même (cas de X3, SV), soit plus élevée (cas de B7, A14, SB3, P1 et SB4). Pour la souche P1, l'activité est faible.

Dans le tableau 22 sont présentées les activités enzymatiques, toujours exprimées en 10⁻³ U/mg de protéines, des extraits acellulaires provenant de cultures incubées pendant 72 h sous oxygène après centrifugation à 50 000 g. Les valeurs indiquées entre parenthèses correspondent aux dosages réalisés sans incorporation d'H₂O₂.

Tableau 21 - Comparaison de l'activité peroxydasique en fonction du temps d'incubation, des conditions d'incubation et de l'addition d'H₂O₂

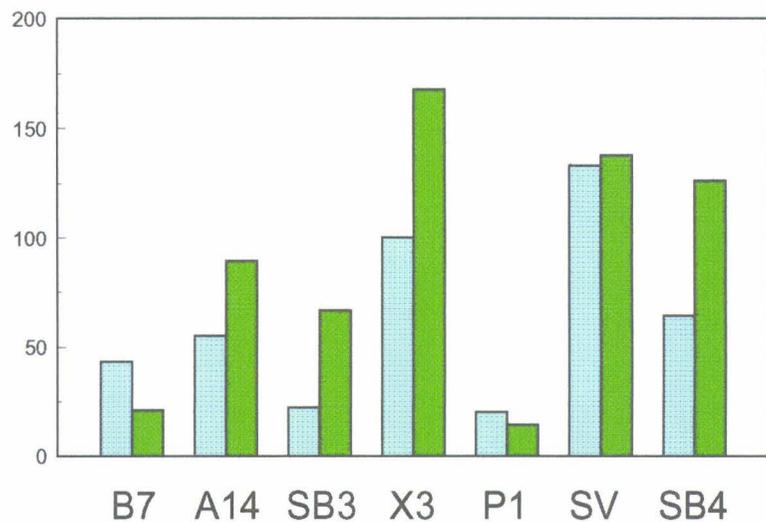
		B7		A14		SB3	
		air	O ₂	air	O ₂	air	O ₂
sans H ₂ O ₂	48 h de croissance	43,6 ± 2,0	21,2 ± 0,6	55,3 ± 1,7	89,5 ± 2,6	22,5 ± 1,5	66,7 ± 2,2
	72 h de croissance	41,5 ± 0,6	19,1 ± 1,4	52,1 ± 1,3	169,0 ± 3,5	171,6 ± 2,4	117,2 ± 3,0
avec H ₂ O ₂	48 h de croissance	112,2 ± 3,2	43,3 ± 1,5	144,1 ± 3,3	113,2 ± 1,0	55,3 ± 1,3	73,5 ± 0,8
	72 h de croissance	123,7 ± 4,2	46,1 ± 0,5	158,7 ± 0,9	187,9 ± 2,2	235,2 ± 2,1	119,7 ± 0,9

Les résultats sont exprimés en 10⁻³ U/mg de protéines.

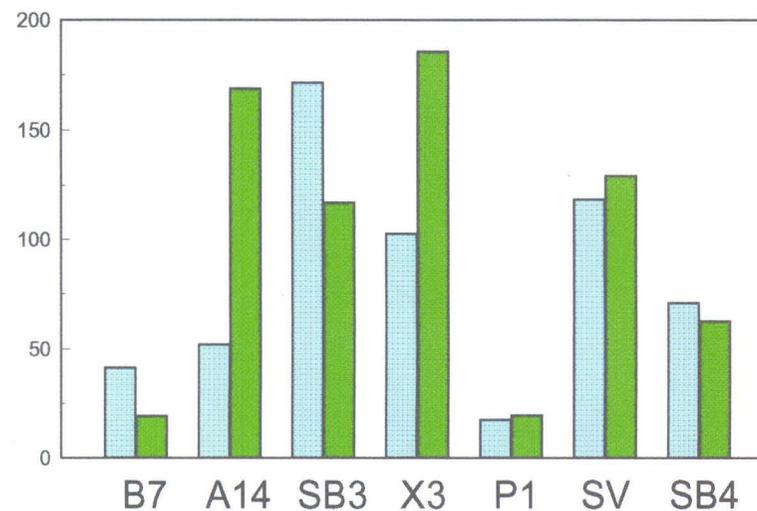
(± écart type pour 3 répliques)

X3		P1		SV		SB4	
air	O ₂	air	O ₂	air	O ₂	air	O ₂
100,5 ± 4,5	167,8 ± 3,0	20,3 ± 1,6	14,4 ± 0,9	133,4 ± 3,5	138,2 ± 2,0	64,5 ± 1,5	126,6 ± 1,5
102,6 ± 5,2	185,5 ± 0,5	17,3 ± 0,5	19,5 ± 1,0	118,5 ± 1,0	129,5 ± 1,4	70,8 ± 1,6	62,7 ± 0,6
104,3 ± 0,6	165,7 ± 1,5	74,3 ± 1,0	15,9 ± 0,3	133,3 ± 2,5	138,0 ± 2,0	157,2 ± 2,5	138,1 ± 3,5
107,8 ± 1,2	188,9 ± 2,2	32,0 ± 3,0	19,1 ± 1,7	117,2 ± 1,2	129,0 ± 0,9	117,3 ± 3,0	61,1 ± 2,5

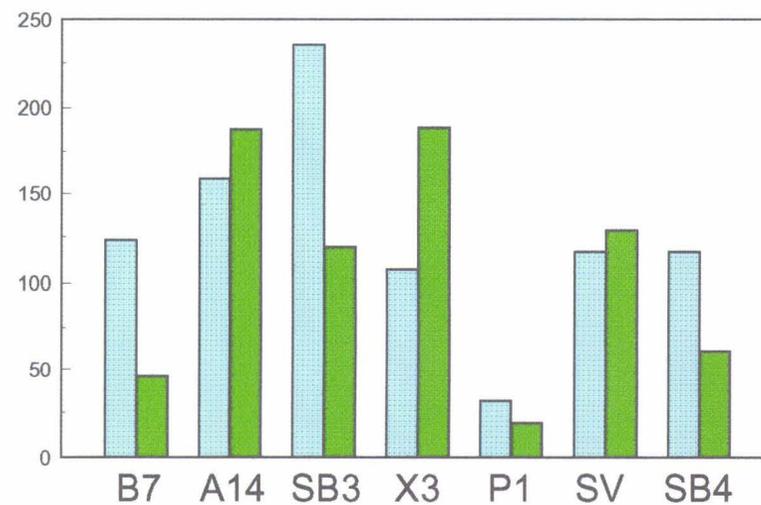
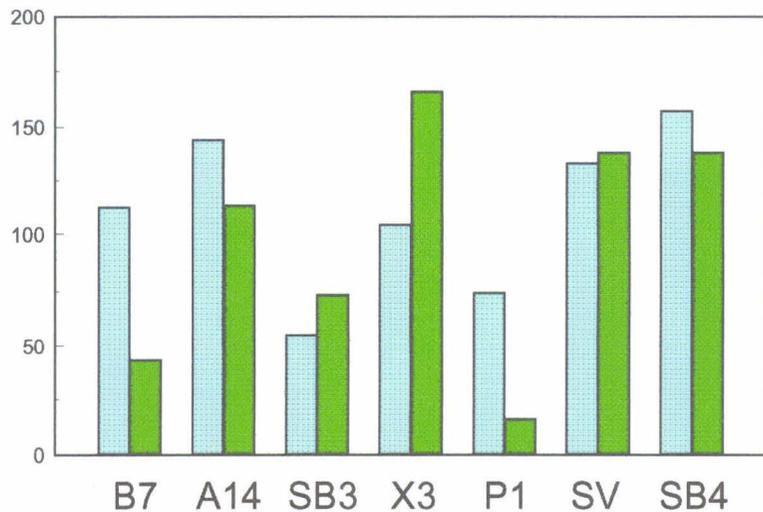
48h d'incubation



72h d'incubation



Dosage sans H₂O₂



Dosage avec H₂O₂

Air
Oxygène

Figure 11 - Diagramme relatifs aux résultats indiqués dans le tableau 21
(10⁻³ U / mg de protéines)



Tableau 22 - Activité enzymatique des extraits acellulaires en 10^{-3} U/mg de protéines obtenues après une centrifugation réalisée à 50 000 g

Souches	Activité enzymatique
P1	72,68 \pm 0,5 (69,80 \pm 0,9)
B7	239,99 \pm 8,3 (111,33 \pm 3,1)
A14	201,61 \pm 12,6 (164,55 \pm 9,0)
SB3	240,64 \pm 5,7 (136,72 \pm 7,3)
SB4	549,42 \pm 6,2 (518,17 \pm 2,8)
X3	316,84 \pm 9,3 (311,87 \pm 5,3)

Les résultats sont la moyenne \pm écart type de 3 répliques.

Les souches les plus actives d'après les deux tableaux sont A14, SB3, X3 et SB4. Dans le 2ème tableau, les activités sont plus élevées par rapport au premier car les protéines totales sont moins concentrées.

b) A partir des extraits purifiés par précipitation avec le sulfate d'ammonium

Ces dosages ne sont pas réalisables directement car le sulfate d'ammonium interfère dans la réaction. Ainsi, avec 5 % de sulfate d'ammonium dans l'extrait acellulaire de la souche P1 par exemple, on ne retrouve plus que 45,5 % de l'activité enzymatique. Avec 10 %, l'erreur est encore plus élevée (33,5 % de l'activité retrouvée). La dialyse des extraits est donc indispensable.

Les activités enzymatiques obtenues avec ces extraits traités par le sulfate d'ammonium et dialysés sont indiquées dans le tableau 23.

Tableau 23 - Activité enzymatique de quelques extraits traités par le sulfate d'ammonium et dialysés (en 10^{-3} U/mg de protéines)

Souches	Activité peroxydasique
P1	83,22 \pm 0,65 (0)
A14	207,14 \pm 7,14 (0)
SB4	530,00 \pm 2,00 (0)
X3	320,62 \pm 8,13 (0)

Les chiffres entre parenthèses concernent les résultats obtenus sans incorporation d' H_2O_2 .

Nous avons vu précédemment que l'activité enzymatique était en général peu influencée par l'apport d'hydrogène peroxyde. Cette activité est pourtant bien de nature peroxydasique (et non oxydasique) car lorsque ces extraits bruts sont purifiés au sulfate d'ammonium et dialysés, la réaction enzymatique devient totalement dépendante de la présence de ce second substrat. La présence d'un donneur d'électrons ou d'un système producteur d'hydrogène peroxyde dans les extraits bruts peut expliquer ces résultats.

c) Effet de la composition du milieu sur l'activité peroxydasique

Cette expérience a été réalisée avec deux souches : X3 et A14. Elles sont cultivées soit dans le milieu minéral glucosé habituel, soit dans un milieu riche (avec 1 % d'extrait de malt, 0,4 % d'extrait de levure et 0,4 % de glucose) (Tab. 24).

Les dosages (effectués en présence d'un apport d'hydrogène peroxyde) prouvent donc que l'activité peroxydasique est environ 2 fois plus élevée lorsque les bactéries proviennent du milieu pauvre.

Tableau 24 - Activité enzymatique (10^{-3} U/mg de protéines) d'extraits acellulaires provenant de cultures réalisées en milieu minéral glucosé (1) ou en milieu riche (2)

Souches	Durée d'incubation	Milieu 1	Milieu 2
X3	48 h	270,21 \pm 6,8	160,10 \pm 3,50
	72 h	272,20 \pm 1,7	138,80 \pm 0,96
A14	72 h	197,68 \pm 2,1	84,52 \pm 1,90

Ces résultats correspondent à une moyenne \pm écart type de 3 répliques.

d) Recherche de l'activité peroxydasique Mn dépendante

Les extraits acellulaires n'ont donné aucune activité peroxydasique Mn dépendante. Nous avons alors essayé de rechercher cette activité dans les culots cellulaires. Ces résultats n'étant pas quantifiables, nous les avons indiqués dans le tableau 25 sous forme de signes (+ ou -).

Une activité peroxydasique Mn dépendante peut donc être détectée mais elle serait associée aux cellules restées intactes ou aux enveloppes des cellules.

B. - Analyse électrophorétique des extraits

Les électrophorèses sans SDS ont été menées avec les extraits acellulaires non purifiés ou traités avec le sulfate d'ammonium provenant de cultures incubées sous air ou sous oxygène (ces derniers donnent souvent des résultats plus nets). La révélation s'effectue en présence d' H_2O_2 ou sans H_2O_2 , mais dans ce second cas les bandes obtenues sur les gels après révélation sont plus fines. Pour chaque extrait, on voit apparaître plusieurs bandes colorées (3 à 5 bandes) mais l'une d'elles est toujours beaucoup plus marquée (Fig. 12). Cette peroxydase majeure migre de façon différente selon les souches : son Rf est de 0,62 pour X3, P1 et S. viridosporus et de 0,53 pour les autres souches.

Tableau 25 - Activité peroxydasique Mn dépendante dans les culots cellulaires après 48 h et 72 h de croissance

Souches et conditions d'incubation		48 h de croissance Activité	72 h de croissance Activité
P1	air	+	+
	O ₂	-	-
B7	air	+	+
	O ₂	-	-
A14	air	+	+
	O ₂	-	-
SB3	air	±	±
	O ₂	±	-
SB4	air	+	-
	O ₂	±	-
X3	air	±	±
	O ₂	±	±

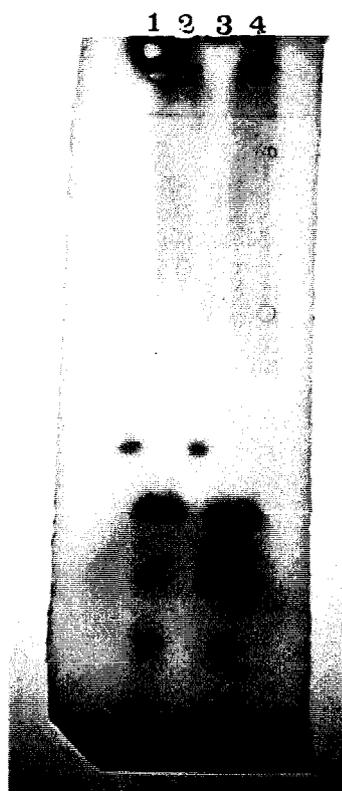


Figure 12 - Bandes obtenues après révélation avec le TMPD comme substrat à partir d'extraits purifiés au sulfate d'ammonium

C. - Purification des peroxydases majeures

La peroxydase majeure de deux souches représentatives : X3 et SB4 a été purifiée.

Les extraits traités au sulfate d'ammonium après dialyse et concentration sont d'abord fractionnés sur la colonne échangeuse d'anions monoQ. A partir de chacune des fractions (2 ml) obtenues, la teneur en protéines est déterminée (absorbance à 280 nm) ainsi que l'activité peroxydasique (avec le N,N,N',N'-tétraméthyl phénylène diamine).

Les résultats (Fig. 13A et Fig. 14A) montrent que l'activité peroxydasique se situe essentiellement dans les fractions 13 à 16 dans le cas de SB4 (avec une réponse positive également dans les fractions 9 et 11) et dans les fractions 9 à 13 dans le cas de X3 (avec les fractions 19 et 22 également positives).

Les fractions contenant l'activité la plus élevée des souches X3 et SB4 sont récoltées, concentrées, dialysées puis déposées sur la colonne d'Ultrogel. A partir des fractions de 4 ml récupérées, les protéines totales et les peroxydases sont à nouveau recherchées. La peroxydase majeure de SB4 est récupérée dans les fractions 11 à 14 (Fig. 13B) (ces fractions représentent 71 % de l'activité peroxydasique totale, le reste se répartissant dans les deux autres pics) ; celle de X3 dans les fractions 21 à 24 (Fig. 14B) (qui représentent 61 % de l'activité peroxydasique totale).

D. - Analyse électrophorétique des peroxydases purifiées

Les fractions correspondant à la peroxydase majeure de chaque souche sont récupérées, concentrées, dialysées et préparées pour l'électrophorèse normale ou avec SDS.

Pour la souche X3, cette peroxydase donne une bande visible avec un RF de 0,81 (Fig. 15). Le poids moléculaire, déterminé grâce aux marqueurs, peut être estimé à $39,2 \times 10^3$ Da.

Pour la souche SB4, sa peroxydase majeure migre en donnant un RF de 0,65 et son poids moléculaire a été estimé à $61,6 \times 10^3$ Da.

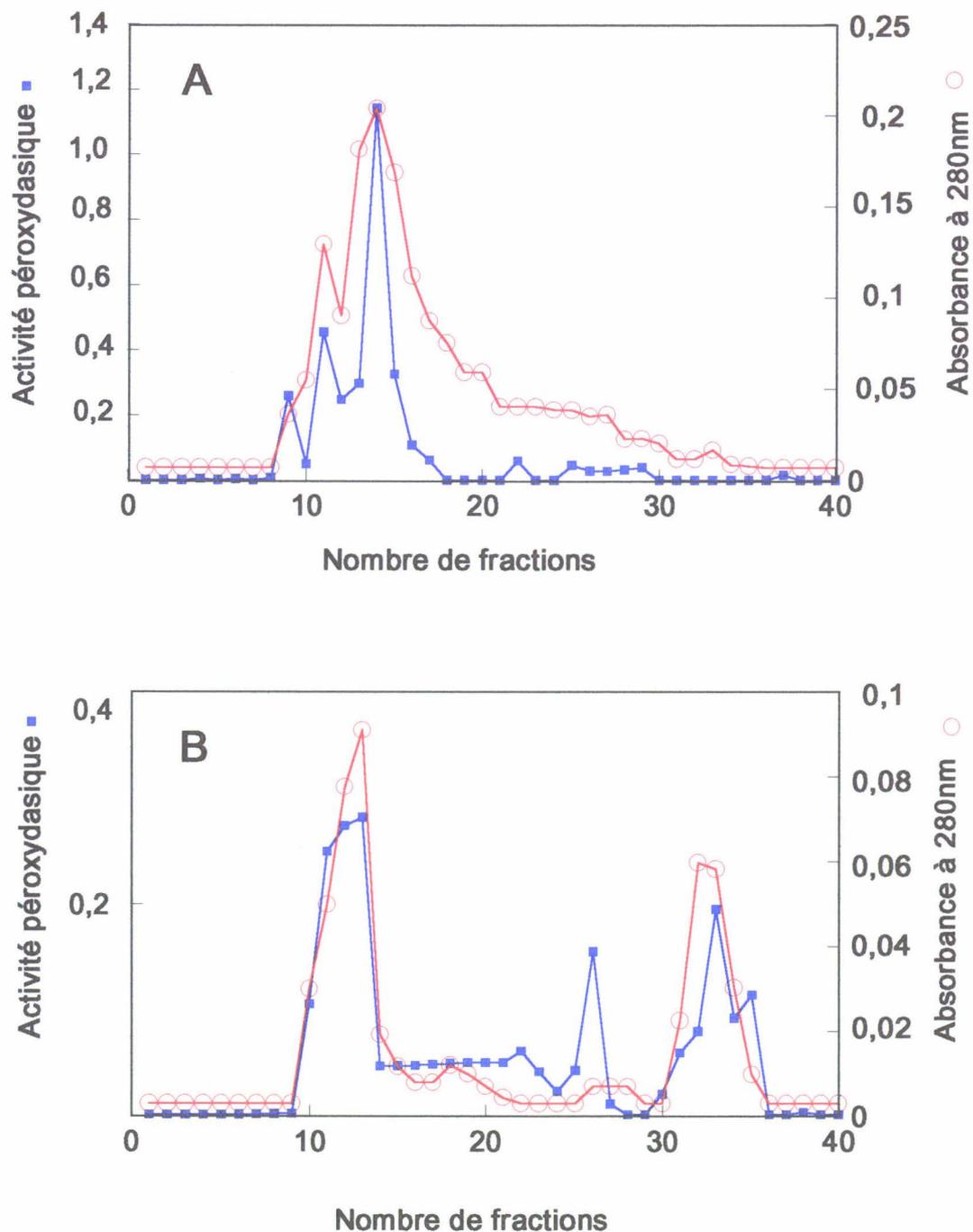


Figure 13 - Purification de la peroxydase majeure à partir d'un extrait protéique de la souche SB4.

A : chromatographie sur colonne échangeuse d'anions monoQ
(vitesse d'élution 30 ml / h)

B : gel filtration sur colonne Ultrogel AC A44 (IBF)
(vitesse d'élution 5 ml / h)

L'absorbance à 280 nm indique la teneur en protéines des fractions.
L'activité peroxydasique des fractions est mesurée avec le TMPD
comme substrat.

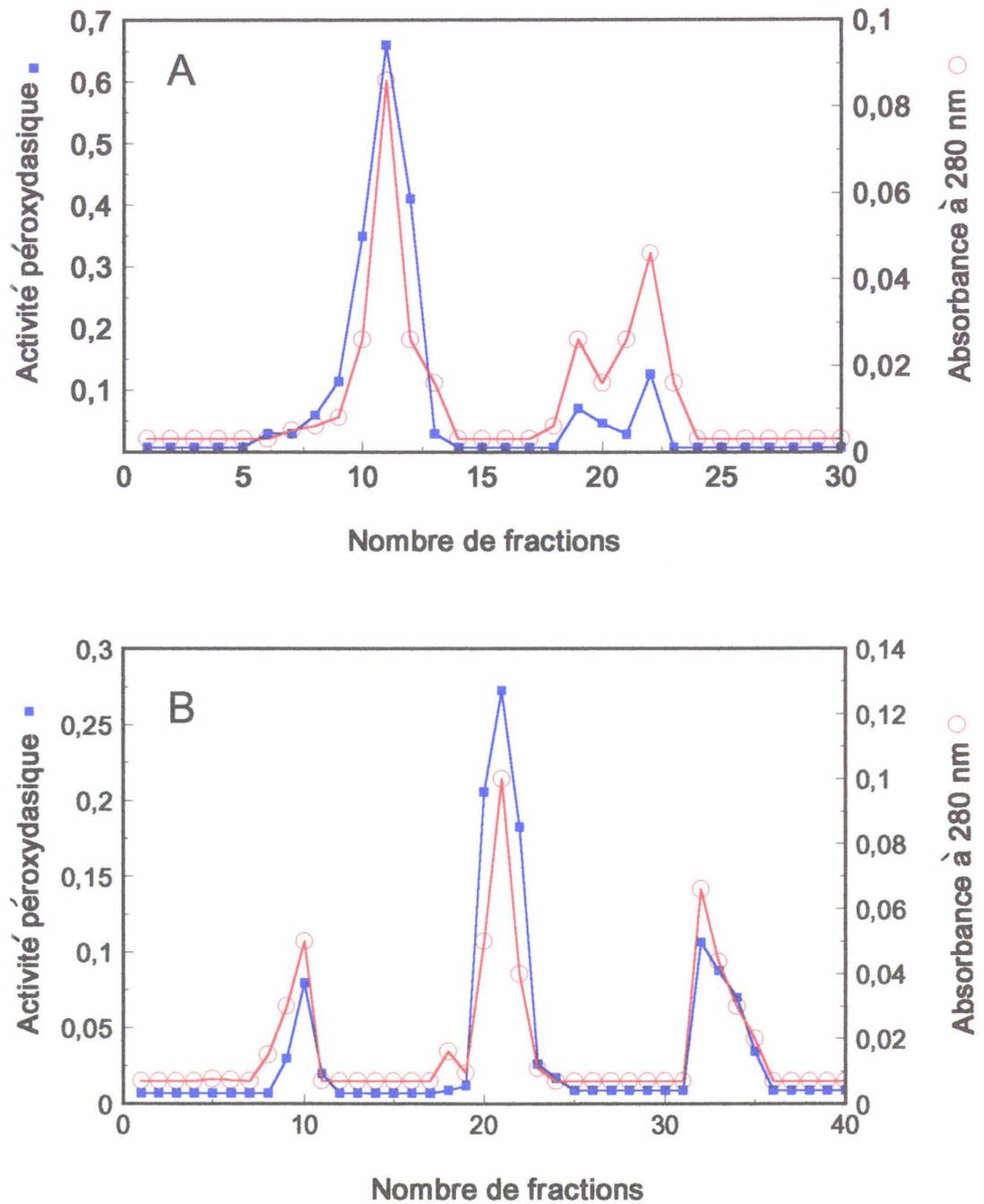


Figure 14 - Purification de la peroxydase majeure à partir d'un extrait protéique de la souche X3

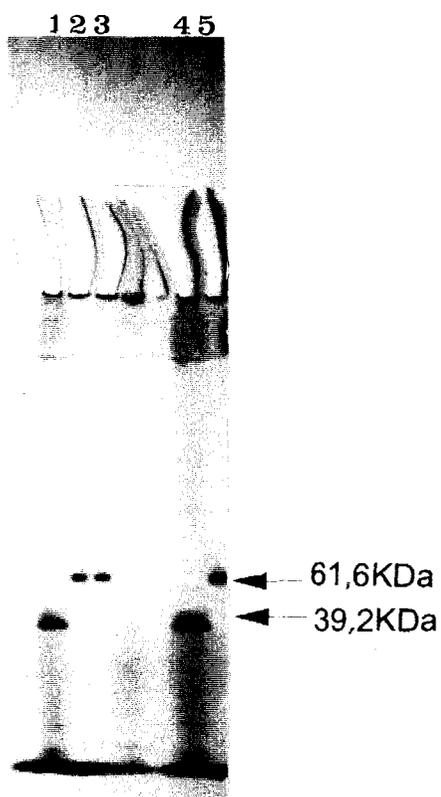


Figure 15 - Analyse en électrophorèse et révélation avec le TMPD des peroxydases majeures des souches X3, SB4, A14, P1 et B7 (puits de 1 à 5).

E. - Résultats de la mise en évidence de la catalase et la SOD

1 - La catalase

Tous les extraits des souches testées (P1, A14, SB4 et X3) donnent une réponse positive avec le test qualitatif (production de bulles d'oxygène après addition de quelques gouttes d' H_2O_2). Le dosage de l'oxygène dissous au moyen de l'électrode à oxygène a été réalisé avec deux souches : A14 et X3 (incubées sous air ou sous oxygène). Les résultats indiqués dans le tableau 26 ont été obtenus grâce à l'utilisation d'une courbe d'étalonnage établie à partir de concentrations connues de catalase commerciale.

L'activité catalasique de ces deux souches A14 et X3 a également été mesurée en tenant compte de la décomposition du substrat : H_2O_2 , suivie à 240 nm au spectrophotomètre. Un exemple de l'évolution de la DO en fonction du temps après addition d' H_2O_2 est présenté dans la figure 16. Les résultats sont indiqués dans le tableau 27.

Ces derniers résultats ne montrent pas de différence en fonction des conditions d'incubation des souches (sous air ou sous O_2). Ils sont cependant beaucoup plus élevés que ceux qui ont été fournis par la mesure de l'oxygène. Il est probable que cette mesure de l'oxygène, qui ne tient compte que de l'oxygène dissous, ne représente que partiellement l'activité catalasique des extraits. Cette technique devait cependant pouvoir exprimer des différences d'activité entre les extraits (c'est-à-dire des réponses relatives) et dans ce cas, l'activité plus faible obtenue avec les extraits de X3 provenant de cultures incubées sous oxygène serait à prendre en considération.

2 - La SOD

Pour le dosage de l'activité SOD, deux pH : pH 8 (tampon phosphate) et 10,2 (tampon carbonate-bicarbonate), ont été préalablement essayés et les meilleurs résultats ont été obtenus avec le pH 8.

Deux concentrations de xanthine 0,1 mM et 0,05 mM ont également été testées mais les valeurs obtenues étant voisines, c'est la concentration la plus faible qui a été retenue.

Tableau 26 - Mesure de l'activité catalase des souches A14 et X3 (durée d'incubation 72 h) par le dosage de l'oxygène dissous produit après addition d'H₂O₂

Souches testées	Incubation sous air	Incubation sous oxygène
A14	173,1 ± 7,7	195,0 ± 4,3
X3	174,4 ± 2,4	125,6 ± 3,3

La teneur en oxygène dissous des extraits au temps 0 a été défalquée. Les résultats sont exprimés en unité enzymatique/mg de protéines.

Tableau 27 - Mesure de l'activité catalase des souches A14 et X3 (durée d'incubation : 72 h) par la méthode spectrophotométrique

Souches testées	Incubation sous air	Incubation sous oxygène
A14	1083	1063
X3	1654	1529

Les résultats sont exprimés en unité enzymatique/mg de protéines.

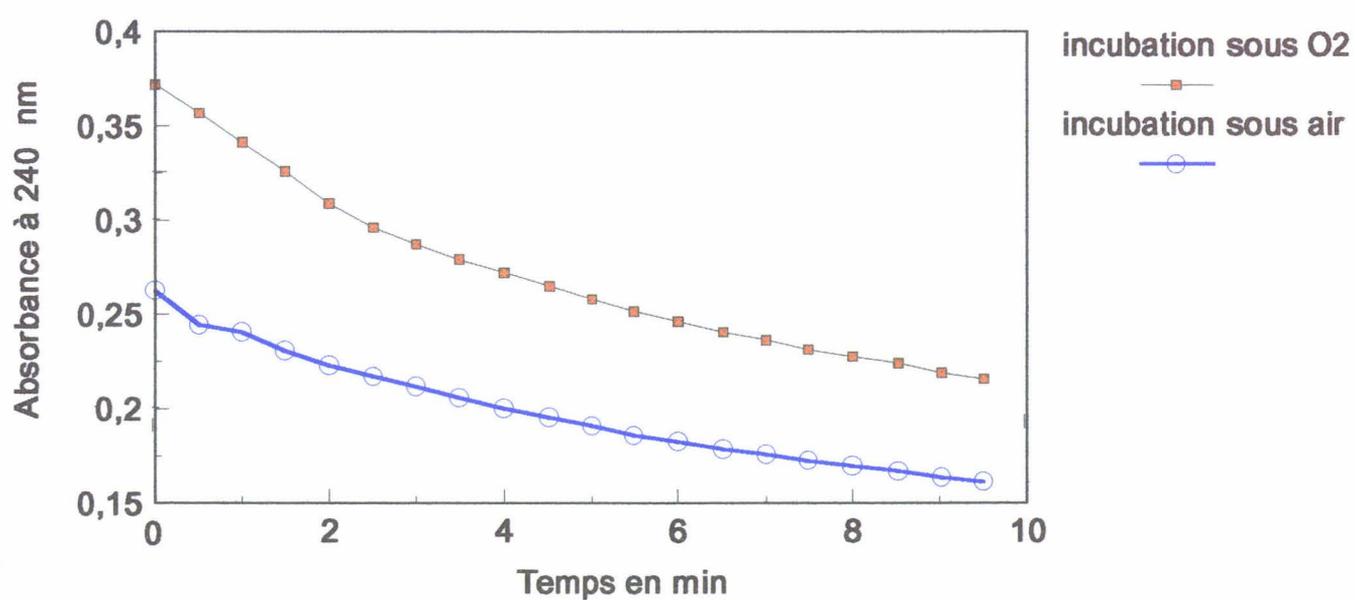


Figure 16 - Cinétique de la décomposition de H₂O₂ par des extraits de A14

Les 2 extraits représentés possèdent des concentrations différentes en protéines totales.

Pour exprimer les résultats en unités de SOD, nous avons utilisé une courbe étalon préparée avec des concentrations connues d'enzymes (de 0,5 à 20 unités - Tab. 28).

Tableau 28 - Inhibition de la réduction du NBT en présence de concentrations connues de SOD

Quantité de SOD (en U)	Taux d'inhibition de réduction du NBT (en %)
0,0	0
0,5	24,96
1,0	39,88
1,5	53,38
2,0	66,86
3,0	81,34
4,0	87,45
5,0	89,45
7,5	90,53
10,0	92,29
15,0	92,36
20,0	92,77

Ces résultats montrent que l'on atteint assez rapidement une saturation de l'effet inhibiteur de la SOD sur la réduction du NBT (pratiquement dès 4 unités de SOD).

Avec la souche X3, l'utilisation de cette méthode nous a permis d'obtenir les résultats suivants (après 72 h d'incubation) :

- X3 incubé sous air : $2,31 \pm 0,07$ U/mg de protéines,
- X3 incubé sous O₂ : $2,42 \pm 0,05$ U/mg de protéines.

Ces résultats, rapportés à la quantité de protéines présentes dans les extraits soniqués, prouvent donc que l'incubation sous O₂ n'a pas stimulé la production de SOD par les bactéries.

Nous avons aussi essayé de vérifier si toute l'activité SOD cellulaire était d'origine cytoplasmique. Pour cela, nous avons utilisé deux extraits cellulaires provenant de la souche X3, l'un était obtenu après 48 h d'incubation, l'autre après 72 h. Ces extraits ont été centrifugés afin de séparer une fraction "cytoplasmique" et une fraction "membranaire". Les résultats sont indiqués dans le tableau 29.

Tableau 29 - Comparaison de la teneur en SOD de fractions cytoplasmiques et membranaires de l'extrait acellulaire X3 provenant de cultures réalisées sous air ou sous oxygène

	1er extrait (48 h de croissance)	2ème extrait (72 h de croissance)
Extrait brut - air	4,27 ± 0,15	9,32 ± 0,29
Extrait brut - O ₂	6,85 ± 0,33	10,03 ± 0,11
Extrait cytoplasmique - air	4,37 ± 0,13	8,90 ± 0,09
Extrait cytoplasmique - O ₂	5,60 ± 0,01	5,00 ± 0,09
Fraction membranaire - air	0	≤ 0,025
Fraction membranaire - O ₂	0,22 ± 0,04	0,88 ± 0,04

Les résultats (en unité enzymatique) correspondent à l'activité totale de chacune des fractions analysées.

Ces résultats ne permettent pas de comparer les activités enzymatiques obtenues à partir des cultures de 48 h ou 72 h ni des activités obtenues sous air ou sous O₂, étant donné que le dosage de protéines totales dans les extraits n'a pas été réalisé.

Par contre, le tableau 29 montre qu'une partie de l'activité SOD peut correspondre à des enzymes plus ou moins associées aux membranes, mais uniquement lorsque les bactéries proviennent de cultures réalisées sous atmosphère d'O₂. En outre, l'activité relative aux membranes est plus importante lorsque les bactéries sont plus âgées (3 % de l'activité totale pour les bactéries âgées de 48 h, 15 % pour les bactéries âgées de 72 h).

IV. - DISCUSSION

Nous savons que les peroxydases sont des enzymes susceptibles de dégrader des substrats à structure complexe. PASTI et CRAWFORD (1991) ont démontré par exemple que des peroxydases de Streptomyces attaquent le bleu Brillant de Rémozol et le sulfonate de polyvinylamine anthroquinone. Ces substances sont d'ailleurs utilisables comme substrat pour la mise en évidence de lignines peroxydases extracellulaires (RAMACHANDRA et coll. 1987, GIROUX et coll. 1988, ADHI et coll. 1989).

Après avoir en vain essayé de mettre en évidence la production d'une Mn peroxydase par nos souches, semblables à celles des champignons qui permettent la minéralisation des mélanoidines (DEHORTER et BLONDEAU 1993), nous avons expérimenté de nombreux substrats dans le but de rechercher des activités peroxydasiques, mais seul le N,N,N',N'-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine a donné des résultats parfaitement quantifiables. Ce substrat a déjà été utilisé comme donneur d'électrons pour doser des oxydases (LORENCE et coll. 1988), des oxygénases (WIMALASENA et WIMALASENA 1991) ou des peroxydases (RAMACHANDRA et coll. 1988). Nos résultats ont montré que l'activité enzymatique des souches est plus importante lorsque la composition du milieu favorise l'attaque des acides humiques ou des mélanoidines, mais aucune relation directe n'a pu être établie entre la production de ces peroxydases, leur localisation et leur activité sur les acides humiques ou mélanoidines.

La synthèse de ces peroxydases se réalise au cours du métabolisme primaire puisque le maximum d'activité se situe à 72 h de croissance, avant la phase de sporulation. La production de lignine peroxydase extracellulaire par S. viridosporus T7A est également dépendante de ce métabolisme primaire (le maximum d'activité est obtenu après 36 h de croissance d'après LODHA et coll. 1991). L'origine métabolique de la synthèse de peroxydases fongiques semble complètement différente puisque chez Phanerochaetes chrysosporium ou Trametes versicolor la lignine peroxydase et la Mn peroxydase sont typiques du métabolisme secondaire (KIRK et FARRELL 1987).

L'existence de deux types de peroxydases dominantes parmi les souches est peut-être en relation avec leur position taxonomique, mais ce problème nécessite également des analyses plus approfondies.

Le poids moléculaire de la peroxydase intracellulaire dominante de S. viridosporus ($39,2 \times 10^3$ D) est nettement plus élevé que celui de la lignine peroxydase dominante (isoforme P3) excrétée par cette même souche et estimé à $17,8 \cdot 10^3$ D par RAMACHANDRA et coll. (1988). De plus, cette isoforme P1 montre deux pics distincts à 280 et 408 nm caractéristiques des hémoprotéines (RENGANATHAN et coll. 1986) alors que nos fractions purifiées ne montrent pas de pic aussi prononcé à 408 nm.

Notons enfin qu'une peroxydase intracellulaire de $92 \cdot 10^3$ D a été isolée récemment à partir de S. cyaneus (MLIKI et ZIMMERMAN 1992) mais son rôle n'a pas été précisé. Les données bibliographiques relatives au rôle de ces enzymes chez les Streptomyces sont en effet très restreintes.

En ce qui concerne l'analyse des enzymes oxydatives, le dosage de la catalase par deux méthodes différentes aboutit à des résultats non concordants et nous avons vu que la première méthode utilisée donnait probablement des valeurs par défaut. Le dosage de la SOD présente également une anomalie apparente puisqu'en déterminant le taux d'inhibition du NBT en présence de concentration croissante de SOD, nous n'obtenons jamais 100 %. Ce résultat, remarqué par d'autres auteurs (BEAUCHAMP et FRIDOVICH 1971) peut cependant s'expliquer par une interaction directe possible entre le NBT et la xanthine oxydase, indépendante de la présence de superoxyde dismutase.

Au point de vue quantitatif, nous n'avons pratiquement pas relevé de différences entre les activités catalase et SOD en fonction des conditions d'incubation (air ou O_2) des souches.

En ce qui concerne l'analyse de ces enzymes chez d'autres Streptomyces, nous ne disposons que d'un seul résultat avec S. coelicolor (LEE et coll. 1993). La concentration en catalase relevée chez cette bactérie est comprise entre 600 et 700 U/mg de protéines, c'est-à-dire du même ordre que celles que nous avons obtenues avec la souche A14. Pour la SOD, les valeurs sont cependant plus élevées que les nôtres : de l'ordre de 30 U/mg de protéines, mais les seules valeurs présentées par ce Streptomyces se rapportent à des cellules récupérées en début de croissance.

Ces auteurs ont étudié l'induction des enzymes oxydatives de S. coelicolor après traitement par le peroxyde d'hydrogène, mais n'ont pas recherché l'influence d'une atmosphère enrichie en O₂. L'effet d'un enrichissement en O₂ a pourtant été expérimenté depuis longtemps chez d'autres bactéries et a montré des comportements différents (GREGORY et FRIDOVICH 1973 a-b, GREGORY et coll. 1974). E. coli B et Streptococcus faecalis, par exemple, répondent à un excès d'O₂ par une augmentation de leurs concentrations en SOD mais sans modification du taux de catalase alors que l'inverse est observé chez Bacillus subtilis. E. coli K12 répond différemment puisqu'aucune modification du taux en SOD et catalase n'est décelable. Ces comportements différents de la SOD s'expliquent par la nature de l'enzyme : la FeSOD est constitutive et ne peut répondre à un stress oxydatif contrairement à la MnSOD qui est inductible par l'O₂ (HASSAN et FRIDOVICH 1977).

Une étude relative à ces SOD a été entreprise plus récemment par SCHIAVONE et HASSAN (1987) avec 8 bactéries différentes en effectuant la distinction entre FeSOD et MnSOD. Leurs résultats montrent que lorsque les bactéries ne produisent qu'une seule SOD : la FeSOD, les différences en fonction de l'incubation sous air ou sous 100 % d'O₂ sont variables selon ces bactéries (peu d'écart avec Alcaligenes faecalis, activité double en présence de 100 % d'O₂ avec Pseudomonas aeruginosa). Lorsque ces bactéries produisent les deux types d'enzymes, l'oxygène peut soit avoir aucun effet sur la FeSOD (cas de Proteus vulgaris), soit inhiber sa production (cas de Enterobacter cloacae), mais dans tous ces cas, l'O₂ stimule la MnSOD.

D'après ces données, il est donc possible d'interpréter l'absence de stimulation de l'activité SOD de nos souches en supposant qu'elles ne synthétisent que la FeSOD constitutive. Consécutivement à ce comportement, l'absence de formation excédentaire d'H₂O₂ ne justifie pas une augmentation de l'activité catalasique.

Remarquons cependant que l'activité SOD, que nous avons observée dans les fractions membranaires des cellules incubées sous 100 % d'O₂, peut être en rapport avec une réaction protectrice des bactéries vis-à-vis du stress oxydatif.

Q U A T R I E M E P A R T I E

ANALYSE DE L'ORIGINE DE L'INSTABILITE DES SOUCHES

I. - INTRODUCTION

Les nombreuses difficultés que nous avons rencontrées pour maintenir les potentialités physiologiques de nos souches vis-à-vis de la dégradation des acides humiques est une caractéristique classique de l'instabilité génétique des Streptomyces. Cette perte des fonctions cataboliques s'accompagnait souvent d'autres anomalies telles que l'absence de sporulation, la diminution du taux de croissance ou le retard de la germination des spores.

Avec S. viridosporus, ou la souche X3 qui forme des spores bien pigmentées à leur maturité, le phénotype des colonies issues de spores étalées sur des milieux gélosés pauvres, permet facilement de mettre en évidence cette variabilité "naturelle". Ce phénomène, qui peut toucher d'autres caractères tels que la pigmentation des cellules, la synthèse de facteurs de croissance, la résistance à des antibiotiques, a été analysé plus spécialement ces dernières années avec S. ambofaciens, S. glaucescens, S. lividans et S. fradiae. Les auteurs établissent souvent une relation entre cette variabilité et la présence de séquences d'ADN chromosomique amplifiées, réitérées en tandem (BIRCH et coll. 1990, LEBLOND et coll. 1990). L'intervention des plasmides a également été suggérée (STONESIFER et coll. 1986) mais dans tous les cas le mécanisme moléculaire générant cette instabilité reste énigmatique.

Nous avons abordé cet aspect de la variabilité avec S. viridosporus et quelques unes de nos souches. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Michel VALLE qui s'est plus particulièrement intéressé au Streptomyces viridosporus. Le but étant par conséquent de rechercher la présence éventuelle d'un plasmide ou d'une séquence d'ADN amplifiée dans des mutants stabilisés.

II. - MATERIELS ET METHODES

A. - La recherche de mutants

Elle s'effectue par l'observation des colonies obtenues à 35°C sur boîtes de Pétri avec le milieu P 20 mM contenant 150 mg/l d'extrait de levure. Ces colonies ne sporulent plus sur leur totalité ou présentent seulement des



secteurs incapables de sporuler. Des agents mutagènes ont été employés pour augmenter le taux de ces mutations comme les UV (ANTAI et IYO 1990) : avant incubation, les boîtes de Pétri ensemencées sont alors présentées sous une lampe (254 nm) de 15 W située à 23 cm de hauteur (intensité lumineuse : 7 mW/cm²). Le bromure d'éthidium (Br eth) est également utilisable (DYSON et SCHREMPF 1987) : il est incorporé dans le milieu de culture à raison de 1 ; 2,5 et 5 µg/ml (concentration finale).

B. - Protocole d'extraction de l'ADN total

La méthode d'extraction est une modification de celle qui a été proposée par HOPWOOD et coll. (1985) et LEBLOND et coll. (1989).

- Un gramme de mycélium est suspendu dans 5 ml de tampon T25 E25 (Tris 25 mM, EDTA 25 mM) pH 8 et 20 mg de lysozyme (Sigma, 50 000 U/mg) sont ajoutés et laissés en incubation pendant au moins 1 h à 37°C. 1,2 ml d'EDTA 0,5 M et 0,035 ml d'une solution de pronase E (Sigma) à 10 mg/ml (préalablement solubilisée dans de l'eau et incubée 10 min à 37°C) sont ensuite incorporés et laissés en incubation 1 h à 37°C.
- On ajoute alors 0,65 ml d'une solution de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) à 10 % et après 2 h à 37°C, le lysat est déprotéinisé avec un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (50/49/1 ; V/V/V). Après centrifugation (5 000 t/min pendant 5 min à 4°C), la phase supérieure aqueuse est récupérée, lavée avec un volume de chloroforme/alcool isoamylique (49/1 ; V/V), et centrifugée dans les mêmes conditions que précédemment.
- A la phase supérieure récupérée, on ajoute 1/4 du volume de NaCl 5 M et le matériel nucléaire est précipité par 1/2 volume de PEG (Poly Ethylène Glycol 6 000) à 30 %.
- Les acides nucléiques sont récupérés et lavés dans 1 ml d'éthanol à 70 % avant d'être séchés sous vide. Ils sont resolubilisables dans du tampon T10 E1 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) à pH 8 et traités avec 40 µg/ml de RNase (Sigma) (incubation pendant 2 h à 37°C).

- Après ajustement de la concentration en NaCl à 0,3 M, l'échantillon est soumis à la protéinase K (50 µg/ml) pendant 5 h à 37°C. Une nouvelle déprotéinisation est réalisée avec un volume de mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique, puis deux fois de suite avec un volume de chloroforme/alcool isoamylique. La phase supérieure est récupérée et l'ADN est précipité par deux volumes d'éthanol glacé à 95 %. Cet ADN est lavé 2 fois avec 1 ml d'éthanol à 70 %, séché sous vide, puis redissous dans du tampon T10 E1 pour être conservé à - 20°C.

C. - Protocole d'extraction de plasmide par lyse alcaline

Il s'agit encore d'une méthode de HOPWOOD et coll. (1985) modifiée.

- 200 mg de bactéries sont incorporés dans un tube Eppendorf avec 500 µl d'une solution tampon T25 E25 pH 8 contenant : 5 mg/ml de lysozyme, 50 µg/ml de RNase, 0,3 M de saccharose, 0,02 % de vert de bromocrésol et sont incubés 1 h à 37°C.
- On mélange ensuite avec 250 µl d'une solution de soude 0,3 M contenant 2 % de SDS et un choc thermique est réalisé par une incubation pendant 15 min à 70°C.
- Une première déprotéinisation est obtenue en ajoutant 80 µl d'une solution composée de 5 g de phénol, 5 ml de chloroforme, 5 mg de 8-hydroxyquinoléine et 1 ml d'H₂O (après mélange, cette solution est centrifugée à 10 000 g pendant 2 min).
- A la phase aqueuse récupérée, on ajoute alors : 70 µl d'acétate de sodium 3 M et 700 µl d'isopropanol et après centrifugation, le culot est séché.
- Le matériel nucléaire repris dans 50 µl de T10 E1 + 5 µl d'acétate de sodium 3 M subit une nouvelle déprotéinisation. A la phase aqueuse obtenue après centrifugation, on ajoute 50 µl d'isopropanol et les plasmides sont récupérés par centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment.

- Ils sont traités avec la spermine (500 μ l de tampon T10 E1 plus 25 μ l d'une solution de spermine - 4 - HCl 100 mM) pendant 5 min. Puis après centrifugation (300 μ l d'acétate de sodium 0,3 M + 10 mM $MgCl_2$ dans lesquels sont ajoutés 700 μ l d'éthanol) pendant 1 h à température ambiante, ils sont récupérés de la même façon que précédemment et dissous dans du tampon T10 E1 ou T10 E10.

D. - Purification de l'ADN plasmidique

Deux techniques d'ultracentrifugation ont été utilisées : en gradient isopycnique de chlorure de césium à deux couches préformées (ISH-HOROWICZ et BURKE 1981) ou en gradient de saccharose discontinu (BRAXENTHALER et coll. 1991).

1 - Purification par gradient de chlorure de césium (CsCl)

4,2 g de CsCl sont ajoutés à l'ADN dissous dans 2,4 ml de tampon T10 E10 (densité 1,8). Après complète dissolution du CsCl, 0,4 ml de solution de bromure d'éthidium à 2 mg/ml (préparé dans le T10 E10 pH 8,0) sont ajoutés et le mélange est versé dans un tube d'ultracentrifugation en polyallomère de 13 ml (Beckman). Le tube est complété à 11,5 ml avec une solution de CsCl préparée dans le T10 E10 pH 8,0 et possédant un indice de réfraction 1,378 (à 25°C) correspondant à une masse volumique de 1,47 g/ml. On obtient un gradient préformé constitué de deux couches de CsCl de densités différentes.

La préparation d'ADN est ensuite centrifugée durant 19 h à 50 000 tours/min et à 20°C dans un rotor de type 70.1 Ti, ce qui correspond à une accélération de 170 000 g. Après la centrifugation, les tubes sont observés sous éclairage UV.

2 - Purification par gradient de saccharose discontinu

Des solutions de saccharose à 30, 40, 50 et 60 % sont réalisées dans du tampon T10 E1 N1000 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M) à pH 8 et autoclavées. Le gradient est préparé dans le tube d'ultracentrifugation en superposant ces solutions en fonction de leur densité décroissante. 1 ml de la solution d'acides nucléiques dissous dans le T E N est déposé sur ce gradient

et la centrifugation s'effectue à 100 000 g pendant 16 h à 1°C, rotor de type SW 40 Ti (Beckman). Après ultracentrifugation, des fractions de 600 µl sont récupérées dans des tubes Eppendorf en utilisant un appareil de fractionnement [Densité Gradient Fractionator Model 185 (ISCO)].

E. - Enzymes de restriction utilisées pour l'analyse de l'ADN

Il s'agit d'endonucléases reconnaissant une séquence particulière de 6 paires de nucléotides, en général riches en cytosine et guanine compte-tenu de la composition nucléotidique de l'ADN des Streptomyces. Les digestions s'opèrent dans un volume de tampon permettant à l'enzyme d'avoir une activité optimale.

Dans le tableau 30 sont représentées les enzymes utilisées avec les séquences coupées.

Tableau 30 - Enzymes de restriction utilisées

Enzymes	Séquences
<u>Bam</u> HI	G/GATCC
<u>Hind</u> III	A/AGCTT
<u>Kpn</u> I	GGTAC/C
<u>Pst</u> I	CTGCA/G
<u>Pvu</u> II	CAG/CTG
<u>Sal</u> I	G/TCCAC
<u>Sma</u> I	CCC/GGG
<u>Xho</u> I	C/TCGAG

F. - Electrophorèse horizontale

Les électrophorèses sont réalisées en gel d'agarose et permettent de contrôler la pureté de l'ADN, d'estimer les concentrations en ADN par rapport à un témoin de concentration connue (ADN lambda), ou de séparer et déterminer la taille de fragments d'ADN provenant d'une digestion (le témoin de poids moléculaire utilisé est l'ADN de lambda digéré par HindIII ou EcoRI).

Le gel d'agarose est préparé dans le tampon Tris 89 mM ; EDTA 2,5 mM ; acide orthoborique 89 mM pH 8,3 (tampon TBE) avec 0,8 % d'agarose. La solution d'agarose est portée à ébullition puis refroidie à 60°C avant d'être versée dans un support muni d'un peigne de 8, 10 ou 15 dents. Après gélification, le peigne est retiré, laissant place aux alvéoles ou "slots" au niveau desquels seront effectués les dépôts. Le gel est alors placé dans la cuve à électrophorèse et immergé dans le tampon TBE. Le dépôt des échantillons d'ADN s'effectue en immersion, ce qui implique que la solution d'ADN doit être plus dense que le tampon d'électrophorèse. Pour cela, on ajoute à l'échantillon, 1/3 V de tampon d'arrêt pH 7,0 constitué de saccharose 50 % (P/V), EDTA 50 mM, urée 4 M et bleu de bromophénol 0,1 %.

Après avoir déposé les échantillons dans les alvéoles, on impose au gel une différence de potentiel comprise entre 80 et 120 Volts ; l'ADN chargé négativement va migrer vers l'anode tout comme le bleu de bromophénol qui constituera le témoin de migration.

Lorsque l'électrophorèse est terminée, le gel est coloré dans un bain de bromure d'éthidium (0,25 ml de bromure d'éthidium à 1 mg/ml dans 500 ml d'eau distillée) pendant 30 min à l'obscurité (le temps de coloration dépend en fait de l'épaisseur et de la concentration en agarose du gel). Le gel est ensuite décoloré dans l'eau distillée pendant 0,5 à 4 h, ce qui permet d'obtenir des bandes bien contrastées.

L'utilisation d'un transilluminateur permet finalement de visualiser les bandes d'ADN sous éclairage UV.

III. - RESULTATS

A. - Caractérisation des mutants

La figure 17 a,b,c montre qu'il est parfois possible d'observer l'apparition de mutants incapables de sporuler lorsque les spores sont réparties sur un milieu gélosé en boîte de Pétri. La composition de ce milieu influe sur la fréquence d'apparition de ces mutants : ceux-ci sont plus nombreux sur un milieu pauvre. Le milieu employé pour obtenir les mutants représentés sur les photos comprend les sels additionnés d'une petite quantité d'extrait de levure (150 mg/l) (pour S. viridosporus par exemple, on obtient 2,6 fois plus de mutants non sporulés sur ce milieu par rapport au milieu riche DSM).

Pour la souche P1 qui normalement donne des spores colorées en gris perle, les mutants apparaissent de couleur plus ou moins orangée.

Pour B7 et X3 par contre, les mutants apparaissent sous forme de colonies bien blanches (dus à la formation de filaments aériens qui n'évoluent pas en formant des spores).

Pour P1 et X3, on peut également voir l'apparition de la mutation qui occupe un secteur de la colonie. Ce phénotype suppose par conséquent que la mutation est apparue après la germination des spores, au cours des premières divisions cellulaires.

On peut augmenter la fréquence d'apparition des mutants en utilisant les agents mutagènes et particulièrement les ultra-violets : avec des temps d'irradiation compris entre 50 et 60 secondes qui donnent de l'ordre de 1 à 1,5 % de cellules viables. La fréquence d'apparition des mutants asporulants sur boîte de Pétri contenant le milieu pauvre peut être supérieure à 10 %. Le bromure d'éthidium accentue également les taux de mutations. Les résultats sont du même ordre qu'avec les UV mais cette méthode n'a pas été poursuivie compte-tenu des problèmes posés par l'utilisation de cette substance toxique.

Ces différents mutants sont réensemencés plusieurs fois, et seules sont conservées les souches qui ne réversent pas. A partir de ces souches, la perte de l'activité catabolique sur les acides humiques a été également vérifiée.

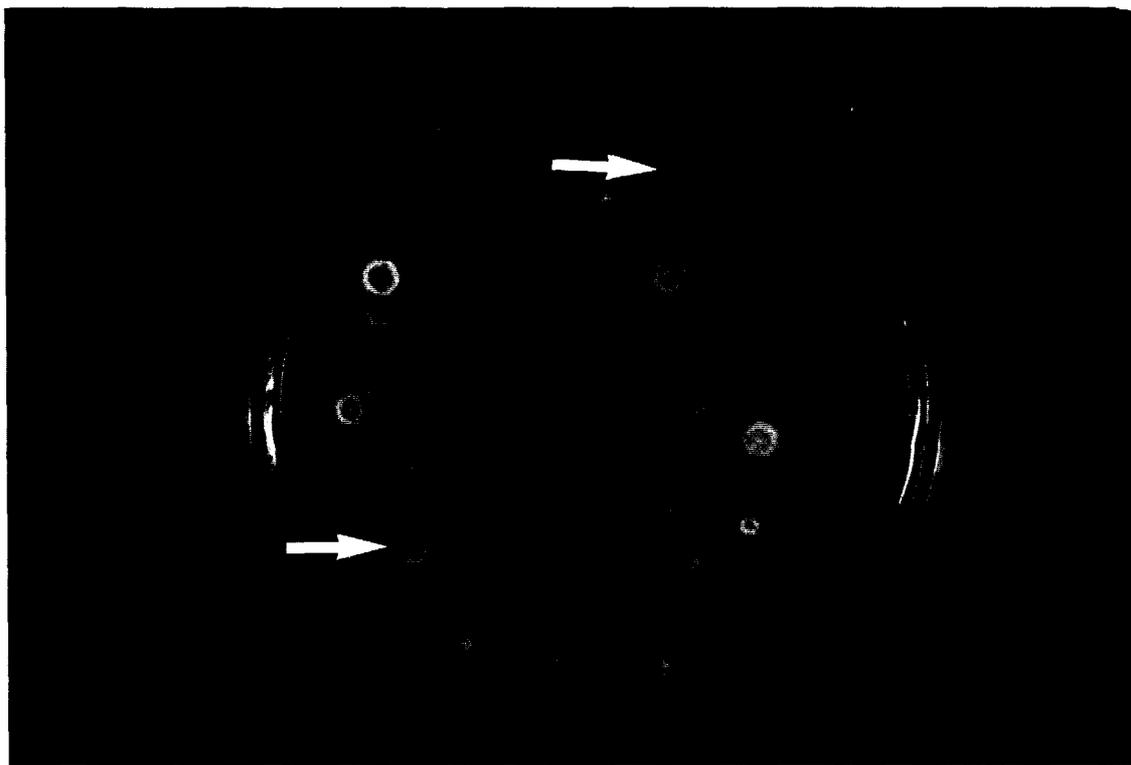
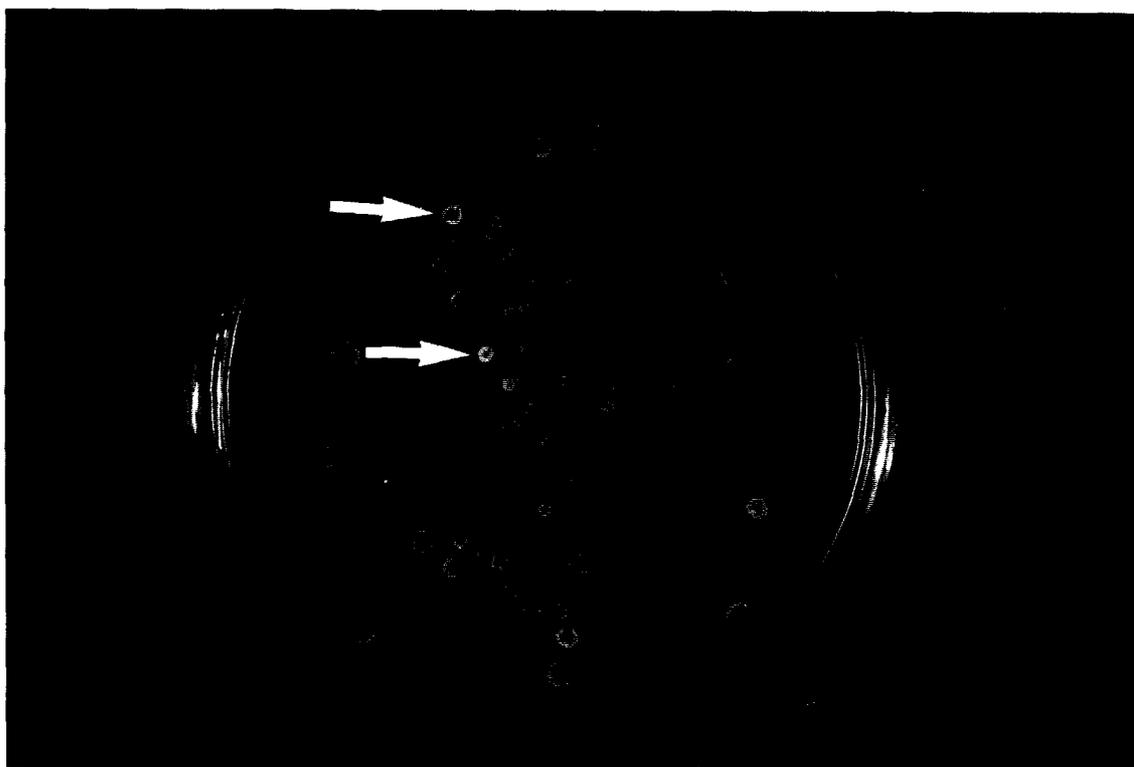


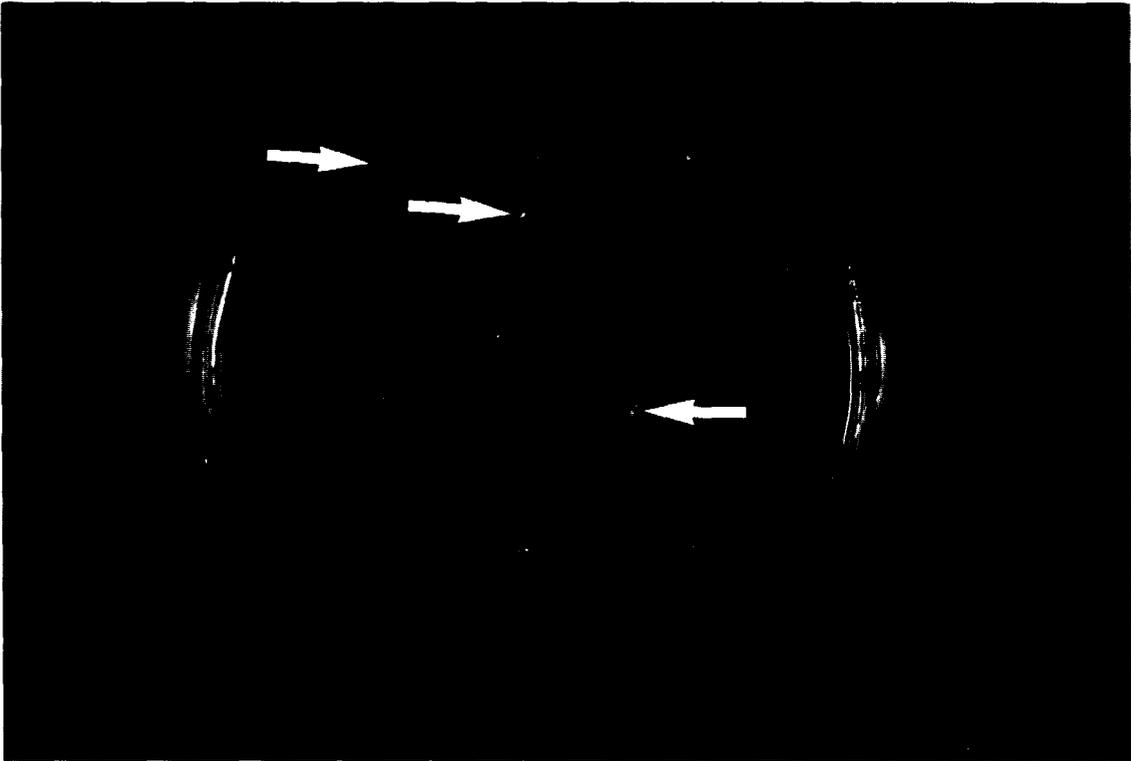
Figure 17 - Mutants naturels obtenus sur le milieu phosphate.

a) Souche P1 : les mutants sont indiqués par une flèche.



b) Souche B7 : les mutants sont indiqués par une flèche.





c) Souche X3 : les mutants sont indiqués par une flèche.

B. - Analyse de l'ADN des mutants

C'est à partir de quelques-uns de ces mutants stables que nous avons essayé d'identifier des plasmides en utilisant les deux techniques précédemment décrites, mais tous les essais ont donné des résultats négatifs.

La mise en évidence de séquences amplifiées dans l'ADN mutant a dès lors été entreprise et dans un premier temps les essais avec les différentes enzymes de restriction ont montré que les résultats les plus intéressants provenaient de Sall, PstI, SmaI : la figure 18a présente, à titre d'exemple, les profils de restriction obtenus avec l'ADN des souches "sauvages" X3, X4 et B7 digéré par Sall et PstI. Sur la 2ème photo, Fig. 18b, on constate que le profil de restriction donné par Sall sur l'ADN du mutant A14 met en évidence une bande qui correspond à un poids moléculaire assez élevé compris entre 20 et 25 kb. Avec S. viridosporus (Fig. 18c), une bande à haut poids moléculaire (33 à 36 kb), obtenue avec la même enzyme, est également mise en évidence à partir de l'un des mutants. L'ADN de cette même souche digéré avec SmaI donne deux bandes supplémentaires. Nous avons vérifié que ces fragments d'ADN ne provenaient pas d'une contamination de la souche en réalisant plusieurs extractions.

Etant donné le poids moléculaire relativement élevé de ces fragments caractéristiques des mutants A14 et S. viridosporus, des essais d'identification de plasmides ont été réalisés selon les deux protocoles mais cette fois encore, aucun plasmide n'a pu être mis en évidence. Il semblerait donc que l'origine de ce phénomène puisse correspondre réellement à une amplification de l'ADN.

IV. - DISCUSSION

L'apparition de mutants spontanés caractérisés par la perte des fonctions de sporulation et la diminution des activités cataboliques est facile à mettre en évidence avec nos souches de Streptomyces surtout lorsque le milieu employé contient peu de facteurs de croissance. L'irradiation UV ainsi que le bromure d'éthidium accentuent l'apparition de ces mutants, phénomène qui a déjà été remarqué par FREEMAN et HOPWOOD (1978) et CRAMERI et coll. (1986), et

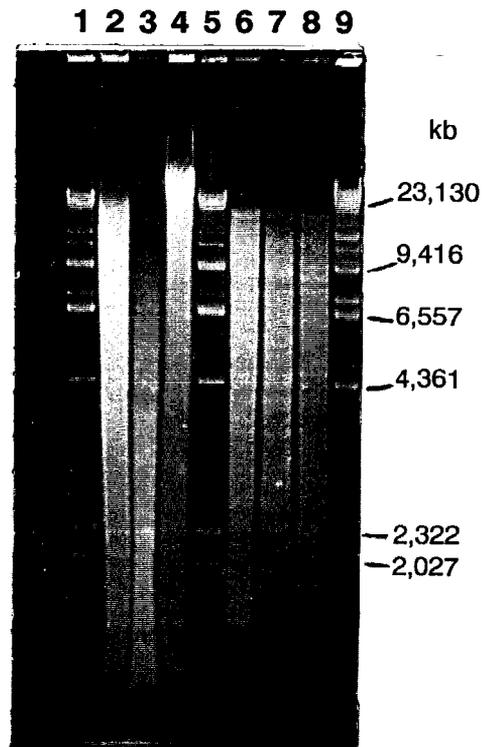


Figure 18 - Comparaison des profils de digestion de l'ADN chromosomique des souches.

- a) Profils de restriction donnés avec Sall et PstI sur l'ADN des souches X4, X3 et B7. 1, 5, 9 : témoins de poids moléculaires (ADN lambda digéré par HindIII) ; 2, 3, 4 : Sall sur X4, X3, B7 ; 6, 7, 8 : PstI sur X4, X3, B7.

qui a été confirmé récemment par VOLFF et coll. (1993) à propos de S. ambofaciens. Ces auteurs trouvent une augmentation d'environ 30 % de la fréquence d'apparition de mutants apigmentés à la suite d'une irradiation UV ou de l'action de la mitomycine C. Dans notre cas, ces mutants spontanés ou induits sont la plupart du temps réversibles. Il a été assez difficile de sélectionner des souches conservant leur mutation lorsqu'elles sont cultivées sur milieu riche.

Les résultats des digestions enzymatiques nous ont orientés dans un premier temps vers la recherche d'un plasmide. En effet, par la possibilité qu'a un plasmide de se présenter sous forme indépendante ou inséré dans le chromosome d'une bactérie, il peut occasionner des anomalies génétiques réversibles. Ces interactions plasmide-chromosome ont été remarquées chez S. lividans par BROWN et coll. (1988) avec l'intégration "site multiple" du pSE101 ainsi que chez S. coelicolor avec le réplicon SLPI (OMER et COHEN 1986).

Si ces fragments d'ADN identifiés après électrophorèse ne sont pas d'origine plasmidique, il est probable qu'ils correspondent à des séquences ayant subi une amplification, phénomène classique en relation avec la variabilité génétique des Streptomyces. La taille des fragments amplifiés, qui sont obtenus après digestion enzymatique, est souvent comprise entre 3 et 90 kb (BIRCH et coll. 1990). Dans notre cas, les fragments que nous avons caractérisés à partir de l'ADN des mutants de A14 et S. viridosporus (respectivement 20-25 kb et 33-36 kb) correspondent également à ces valeurs publiées.

Ces profils particuliers d'électrophorèse n'ont été mis en évidence que pour deux mutants issus de souches différentes. Pour les autres souches analysées, l'absence apparente de modifications au niveau de leur ADN peut s'expliquer par l'instabilité importante de ces mutants qui, dans les milieux riches employés pour permettre les extractions d'ADN, réversent très souvent en donnant des populations probablement très hétérogènes. Ces populations sont difficiles à étudier étant donné la nature multicellulaire des filaments bactériens.

L'origine des amplifications et la nature des réarrangements génétiques constituent un phénomène qui, chez les Streptomyces, est difficile à interpréter (LEBLOND et coll. 1990, DARY et coll. 1992, GRAVIUS et coll. 1993). Des délétions importantes d'ADN chromosomiques coïncident souvent avec l'apparition de ces amplifications même si le phénotype de la bactérie ne soit pas toujours affecté.

Dans notre cas, nous n'avons jamais pu observer de délétions. Etant donné l'objectif de notre recherche, qui concernait une activité catabolique d'une collection de Streptomyces, nous n'avons pas poursuivi l'analyse de ce phénomène génétique qui aurait nécessité de nombreuses expériences et l'emploi de techniques de biologie moléculaire que ne nous maîtrisons pas. De plus, cet objectif ne correspondait pas aux nouveaux thèmes de recherche mis en oeuvre au Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée.

CONCLUSION GENERALE

Les 16 souches bactériennes que nous avons isolées sur milieu gélosé et sélectionnées en fonction de leur capacité à décolorer les acides humiques sont des Streptomyces, caractérisés par la présence dans leur paroi de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique. Ces souches ne présentent aucune exigence nutritionnelle et sont fortement amylolytiques et protéolytiques. Le phénotype de l'un de ces Streptomyces correspond à S. viridosporus, employé dans nos essais comme souche de référence.

Ces souches provoquent également la décoloration des acides humiques en milieu liquide, mais sont incapables de les utiliser comme seule source de carbone. Ces milieux de cultures doivent par conséquent contenir une source de carbone facilement métabolisable comme le glucose, mais l'incorporation de facteurs stimulant la croissance nuit plutôt à l'activité des souches. Des composés synthétisés par réaction de Maillard et considérés comme homologues des acides humiques naturels sont également décolorés en culture liquide et leur minéralisation peut être mise en évidence grâce au marquage radioactif obtenu avec du glucose ^{14}C . L'enrichissement de l'atmosphère en oxygène stimule l'activité de la plupart des souches et semble favoriser une interaction plus intime entre les composants de la surface des cellules et le substrat. Ces interactions s'expriment, en atmosphère ordinaire, par une adsorption importante des molécules humiques sur les bactéries, suggérant un mécanisme de biodégradation localisé à ce niveau (les filtrats de culture n'ont d'ailleurs jamais présenté d'activité sur les acides humiques naturels ou sur les mélanoidines de synthèse, contrairement aux filtrats de culture des champignons capables de les dégrader).

La localisation particulière de l'activité catabolique nous a conduit à rechercher la présence d'activités peroxydasiques dans des extraits acellulaires obtenus par sonication. Ces activités ont pu être mises en évidence en utilisant comme substrat le N,N,N',N'-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine, mais les résultats ne permettent pas d'établir une relation constante entre ces activités et la capacité minéralisatrice des souches (mise à part l'évolution parallèle des activités peroxydasiques et cataboliques en fonction de la valeur nutritive des milieux de culture). Après purification des extraits enzymatiques et électrophorèse sur gel de polyacrylamide, la peroxydase majeure de chaque souche peut être rangée dans 2 groupes différents distincts par le poids moléculaire (39,2 kDa et 61,6 kDa). En relation avec les résultats

donnés par une atmosphère enrichie en oxygène, les activités catalase et superoxyde dismutase ont également été déterminées. Ces activités ne semblent pas être régulées par la concentration en oxygène, mais il est curieux de constater qu'en présence d'oxygène pur, une activité superoxyde dismutase peut être décelée dans les fractions membranaires.

Au cours de ces analyses, nous avons pu constater qu'il était parfois difficile de conserver la stabilité de l'activité catabolique des souches. En effet, les conditions expérimentales qui favorisent l'action bactérienne sur les acides humiques induisent apparemment des modifications génétiques conduisant à la perte réversible (ou momentanée) de cette activité, associée la plupart du temps avec un retard de la germination des spores et une perte des facultés de sporulation. Nous avons essayé d'expliquer cette variabilité en analysant le génome de mutants stables, et plus particulièrement la présence de plasmides ou de séquences d'ADN amplifié qui sont les causes les plus fréquentes de la variabilité génétique chez les Streptomyces. Des fragments d'ADN de 25 à 35 kb, identifiés chez certains mutants, peuvent correspondre à de telles amplifications, mais ces résultats sont à confirmer. Il est probable que cette instabilité génétique est très limitée dans la nature, et qu'elle apparaît en laboratoire par suite de l'optimisation des paramètres qui conditionnent l'activité du phénomène étudié.

- X - ACHARD F.K., 1786 - In: "Humus Chemistry. Genesis - Composition - Reaction". STEVENSON F.J., 1982, Willey-Interscience, New-York, 443 p.

- ADHI T.P., KORUS R.A., POMETTO III A.L. and CRAWFORD D.L., 1988 - Lignin degradation and production of microbially modified lignin polymers by Streptomyces viridosporus in slurry reactors.
Appl. Biochem. Biotech. 18 : 291-302.

- ADHI T.P., KORUS R.A. and CRAWFORD D.L., 1989 - Production of major extracellular enzymes during lignocellulose degradation by two Streptomycetes in agitated submerged culture.
Appl. Environ. Microbiol. 55 : 1165-1168.

- ANTAI S.P. and IYO A.H., 1990 - Selection of mutant Streptomyces strains with enhanced ability for acid precipitable polymeric lignin production.
J. Bas. Microbiol. 30 : 643-647.

- BARDER M.J. and CRAWFORD D.L., 1981 - Effect of carbon and nitrogen supplementation on lignin and cellulose decomposition by a Streptomyces.
Can. J. Microbiol. 27 : 859-863.

- BEAUCHAMP C. and FRIDOVICH I., 1971 - Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels.
Anal. Biochem. 44 : 276-287.

- BENZING-PURDIE L.M., RATCLIFFE C.I. and RIPMEESTER J.A., 1986 - Solid state ¹H and ¹³C NMR studies of melanoidins synthesized from D-xylose and glycine.
J. Carbohyd. Chem. 5 : 571-584.

- BERDY J., 1974 - Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure.
Adv. Appl. Microbiol. 18 : 309-406.

- BERDY J., 1980 - Recent advances in and prospects of antibiotic research.
Process Biochem. 15 : 28-35.

- BERZELIUS J.J., 1861 - In: "Humus Chemistry. Genesis - Composition - Reaction". STEVENSON F.J., 1982, Willey-Interscience, New-York, 443 p.
- BIRCH A., HAUSLER A. and HUTTER R., 1990 - Genome rearrangement and genetic instability in Streptomyces spp.
J. Bacteriol. 172 : 4138-4142.
- BLONDEAU R., 1988 - Evolution des acides humiques soumis à l'activité d'une microflore bactérienne hétérotrophe.
Science du Sol 26 : 41-50.
- BLONDEAU R., 1989 - Biodegradation of natural and synthetic humic acids by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium.
Appl. Environ. Microbiol. 55 : 1282-1285.
- BOHN H.L., 1976 - Estimate of organic carbon in world soils.
Soil Sci. Soc. Am. J. 40 : 468-470.
- BRAXENTHALER M., POETSH B., FROHLICH K.U. and MECKE D., 1991 - pSAR1, a natural plasmid from Streptomyces arenae, shows rapid increase and decrease of copy numbers on changes of growth media.
FEMS Microbiol. Lett. 83 : 311-316.
- BROWN D.P., CHIANG S.J.D., TUAN J.S. and KATZ L., 1988 - Site-specific integration in Saccharopolyspora erythraea and multisite integration in Streptomyces lividans of actinomycete plasmid pSE101.
J. Bacteriol. 170 : 2287-2295.
- BUCHANAN R.E. and GIBBONS N.E., 1974 - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Eighth Edition). The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1246 p.
- BURGESS A. and LATTER P., 1960 - Decomposition of humic acid by fungi.
Nature 186 : 404-405.
- CHATER K.F. and MERRICK M.J., 1979 - In: "Streptomyces in developmental biology of prokaryotes. PARISH J.H., 1979, vol 1 : 93, University of California Press, Berkeley.

- CIAVATTA C. and GOVI M., 1993 - Use of insoluble polyvinylpyrrolidone and isoelectric focusing in the study of humic substances in soils and organic wastes.
J. Chromat. 643 : 261-270.

- CLARA R.W. and KNOWLES R., 1984 - Superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in ammonium-grown and nitrogen-fixing Azospirillum brasilense.
Can. J. Microbiol. 30 : 1222-1228.

- CRAMERI R., DAVIES E.J. and HUTTER R., 1986 - Plasmid curing and generation of mutations induced by ethidium bromide in Streptomyces.
J. Gen. Microbiol. 132 : 819-824.

- CULLUM J., ALTENBUCHNER J., FLETT F. and PIENDL W., 1986 - DNA amplification and genetic instability in Streptomyces.
Biotech. Gen. Engin. Rev. 4 : 59-78.

- DARY A., BOURGET N., GIRARD N., SIMONET J.M. and DECARIS B., 1992 - Amplification of a particular DNA sequence in Streptomyces ambofaciens RP181110 reversibly prevents spiramycin production.
Res. Microbiol. 143 : 99-112.

- DAVIES J., 1990 - What are antibiotics ? Archaic functions for modern activities. **Mol. Microbiol.** 4 : 1227-1232.

- DAZA A., MARTIN J.F., DOMINGUEZ A. and GIL J.A., 1989 - Sporulation of several species of Streptomyces in submerged cultures after nutritional downshift.
J. Gen. Microbiol. 135 : 2483-2491.

- DE HAAN H., 1977 - Effect of benzoate on microbial decomposition of fulvic acids in Tjeukemeer (The Netherlands).
Limnol. Oceanogr. 22 : 39-44.

- DEHORTER B. and BLONDEAU R., 1992 - Extracellular enzyme activities during humic acid degradation by the white rot fungi Phanerochaete chrysosporium and Trametes versicolor.
FEMS Microbiol. Lett. 94 : 209-216.

- DEHORTER B. and BLONDEAU R., 1993 - Isolation of an extracellular Mn-dependent enzyme mineralizing melanoidins from the white rot fungus Trametes versicolor.
FEMS Microbiol. Lett. 109 : 117-122.

- DE SAUSSURE, 1804 - In: "Humus Chemistry. Genesis - Composition - Reaction". STEVENSON F.J., 1982, Willey-Interscience, New-York, 443 p.

- DYSON P. and SCHREMPF M., 1987 - Genetic instability and DNA amplification in Streptomyces lividans 66.
J. Bacteriol. 169 : 4796-4803.

- ERIKSON D., 1940 - Pathogenic anaerobic organisms of the actinomycetes group.
Special Report Series N°240, Medical Research Council, London.

- FREEMAN R.F. and HOPWOOD D.A., 1978 - Unstable naturally occurring resistance to antibiotics in Streptomyces.
J. Gen. Microbiol. 106 : 377-381.

- FUCHS W., 1930 - In: "Humus Chemistry. Genesis - Composition - Reactions". STEVENSON F.J., 1982, Willey-Interscience, New-York, 443 p.

- GIROUX H., VIDAL P., BOUCHARD J. and LAMY F., 1988 - Degradation of kraft indulin lignin by Streptomyces viridosporus and Streptomyces badius.
Appl. Environ. Microbiol. 54 : 3064-3070.

- GOODFELLOW M., LACEY J. and TODD C., 1987 - Numerical classification of thermophilic Streptomyces.
J. Gen. Microbiol. 133 : 3135-3149.

- GOODFELLOW M., WILLIAMS S.T. and MORDARSKI M., 1988. Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press Limited, London, 501 pp.

- GRAVIUS B., BEZMALINOVIC T., HRANUELI D. and CULLUM J., 1993 - Genetic instability and strain degeneration in Streptomyces rimosus.
Appl. Environ. Microbiol. 59 : 2220-2228.

- GREGORY E.M. and FRIDOVICH I., 1973a - Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen.
J. Bacteriol. 114 : 543-548.
- GREGORY E.M. and FRIDOVICH I., 1973b - Oxygen toxicity and the superoxide dismutase.
J. Bacteriol. 114 : 1193-1197.
- GREGORY E.M., GOSCIN S.A. and FRIDOVICH I., 1974 - Superoxide dismutase and oxygen toxicity in an Eukaryote.
J. Bacteriol. 117 : 456-460.
- HAIDER K.M. and MARTIN J.P., 1988 - Mineralization of ¹⁴C-labelled humic acids and humic acid bound ¹⁴C xenobiotics by Phanerochaete chrysosporium.
Soil Biol. Biochem. 20 : 425-429.
- HALL R.M., STRITHARAN M., MESSENGER A.J.M. and RATLEDGE C., 1987 - Iron transport in Mycobacterium smegmatis: occurrence of iron-regulated envelope proteins as potential receptors for iron uptake.
J. Gen. Microbiol. 133 : 2107-2114.
- HARAGUCHI T. and MOROHOSHI N., 1976 - Degradation of lignosulphonates by Streptomyces sp. In: Proceedings of the third International Biodegradation Symposium. SHARPLEY J.M. and KAPLAN A.M. (Eds), Applied Science Publishers, London, pp. 719-729.
- HASSAN M. and FRIDOVICH I., 1977 - Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 129 : 1574-1583.
- HAWORTH R.D., 1971 - The chemical nature of humic acid.
Soil Sci. 111 : 71-79.
- HAYAKAWA M. and NONOMURA H., 1987 - Humic acid- vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes.
J. Ferment. Technol. 65 : 501-510.

- HAYASE F., KIM S.B. and KATO H., 1986 - Analyses of the chemical structures of melanoidins by ^{13}C NMR ; ^{13}C and ^{15}N CP-Mas NMR spectrometry.
Agric. Biol. Chem. 50 : 1951-1957.

- HEDGES I.I., 1978 - The formation and clay mineral reactions of melanoidins.
Geochim. Cosmochim. Acta 42 : 69-76.

- HOPPE-SEYLER F., 1889 - In: "Humus Chemistry. Genesis - Composition - Reactions". STEVENSON F.J., 1982, Willey-Interscience, New-York, 443 p.

- HOPWOOD D.A., BILL M.J., CHARTER K.F., KIESER T., BRUTON C.J., KIESER H.M., LYDIATE D.J., SMITH C.P., WARD J.M. and SCHREMPF H., 1985 - Genetic manipulation of Streptomyces, a Laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, 356 pp.

- HOUGHTON R.A., HOBBIE J.E., MELILLO J.M., MOOSE B., PETERSON B.J., SHAVER G.R. and WOODWELL G.M., 1983 - Changes in the carbon content of terrestrial biota and soils between 1860 and 1980: a net release of CO_2 to the atmosphere.
Ecol. Monogr. 53 : 235-262.

- ISH-HOROWICZ D. and BURKE J.F., 1981 - Rapid and efficient cosmid vector cloning.
Nucl. Acids Res. 9 : 2989-2998.

- JENKINSON D.S. and RAYMER J.H., 1977 - The turn over of soil organic matter in some of the Rothamsted classical experiments.
Soil Sci. 123 : 298-305.

- KALAKOUTSKII L.V. and AGRE N.S., 1976 - Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes.
Bacteriol. Rev. 40 : 469-524.

- KENDRICK K.E. and ENSIGN J.C., 1983 - Sporulation of Streptomyces griseus in submerged culture.
J. Bacteriol. 155 : 357-366.

- KHANDELWAL K.C. and GAUR A.C., 1980 - Degradation of humic acids extracted from manure and soil by some Streptomyces and fungi. **Zbl. Bakteriol. Parasitenkunde Infekt. Krankh. Hyg.** 135 : 119-122.

- KIRK T.K. and FARRELL R.L., 1987 - Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annu. Rev. Microbiol.** 41 : 465-505.

- KIRK T.K. and FENN P., 1982 - Formation and action of the ligninolytic system in basidiomycetes in decomposer Basidiomycetes. FRANKLAND J.C. and HEDGER J.N. (Eds), Swift Cambridge, Cambridge University Press, pp. 69-90.

- KONTCHOU C.Y. and BLONDEAU R., 1990 - Effect of heterotrophic bacteria on different humic substances in mixed batch cultures. **Can. J. Soil Sci.** 70 : 51-59.

- KONTCHOU C.Y. and BLONDEAU R., 1992 - Biodegradation of soil humic acids by Streptomyces viridosporus. **Can. J. Microbiol.** 38 : 203-208.

- KUTZNER H.J., 1981 - The family Streptomycetaceae. In: The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. STARR, STOLP, TRUPER, BALOWS and SCHLEGEL (Eds), Springer- Verlag, Berlin, Vol. II, pp. 2028-2090.

- LAMBERT G., 1987 - Le CO₂ dans l'atmosphère. **La Recherche** 189 : 778-787.

- LANGHAM C.D., WILLIAMS S.T., SNEATH P.H.A. and MORTIMER A.M., 1989 - New probability matrices for identification of Streptomyces. **J. Gen. Microbiol.** 135 : 121-133.

- LAWTON P., WHITAKER A., ODELL D. and STOWELL J.D., 1989 - Actinomycete morphology in shaken culture. **Can. J. Microbiol.** 35 : 881-889.

- LEBLOND P., DEMUYTER Ph., MOUTIER L., LAAKEL M., DECARIS B. and SIMONET J.M., 1989 - Hypervariability, a new phenomenon of genetic instability, related to DNA amplification in Streptomyces ambofaciens. **J. Bacteriol.** 171 : 419-423.

- LEBLOND P., DEMUYTER P., SIMONET J.M. and DECARIS B., 1990 - Genetic instability and hypervariability in Streptomyces ambofaciens: towards an understanding of a mechanism of genome plasticity. **Mol. Microbiol.** 4 : 707-714.

- LECHEVALIER H.A. and LECHEVALIER M.P., 1967 - Biology of the actinomycetes. **Annu. Rev. Microbiol.** 21 : 71-100.

- LECHEVALIER M.P. and LECHEVALIER H.A., 1970 - Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 20 : 435-443.

- LECHEVALIER M.P. and LECHEVALIER H.A., 1980 - The chemotaxonomy of actinomycetes. In: Actinomycete taxonomy, special publication 6. DIETZ and THAYER (Eds), Society for Industrial Microbiology, Arlington, VA, pp. 227-291.

- LEE J.S., HAH Y.G. and ROE J.H., 1993 - The induction of oxidative enzymes in Streptomyces coelicolor upon hydrogen peroxide treatment. **J. Gen. Microbiol.** 139 : 1013-1018.

- LOCCI R., 1984 - Streptomycetes and related genera. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins Ed., Baltimore, Vol. 4, pp. 2451-2468.

- LOCCI R. and SHARPLES G.P., 1984 - Morphology. In: The Biology of the Actinomycetes. GOODFELLOW, MORDARSKI and WILLIAMS (Eds), Academic Press, London, pp. 165-199.

- LODHA S.J., KORUS R.A. and CRAWFORD D.L., 1991 - Synthesis and properties of lignin peroxidase from Streptomyces viridosporus. **Appl. Biochem. Biotechn.** 28/29 : 411-420.

- LORENCE R.M., CARTER K. and GENNIS R.B., 1988 - Trypsin proteolysis of the cytochrome d complex of Escherichia coli selectively inhibits ubiquinol oxidase activity while not affecting N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylene diamine oxidase activity.
J. Biol. Chem. 263 : 5271-5276.

- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.H., FARR A.L. and RANDALL R.J., 1951 - Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

- McCARTHY A.J., 1987 - Lignocellulose degrading actinomycete.
FEMS Microbiol. Rev. 46 : 145-163.

- MAILLARD L.C., 1911 - Action des acides aminés sur les sucres ; formation des mélanoidines par voie méthodique.
C. R. Soc. Biol., pp. 66-68.

- MAL' S.S., SLIVKA Z.M., POVARKOVA S.S. and YURKEVICH Ye. A., 1983 - Comparative study of melanoidins and humic acids.
Sov. Soil Sci. (Engl. Transl.) 14 : 62-70.

- MARTEL J.A. and PAUL E.A., 1974 - The use of radiocarbon dating of organic matter in the study of soil genesis.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 38 : 501-506.

- MATHUR S.P. and PAUL E.A., 1967 - Microbial utilisation of soil humic acids.
Can. J. Microbiol. 13 : 573-580.

- MATHUR S.P., 1969 - Microbial use of podzol Bh. fulvic acids.
Can. J. Microbiol. 15 : 677-680.

- MLIKI A. and ZIMMERMANN W., 1992 - Purification and characterization of an intracellular peroxidase from Streptomyces cyaneus.
Appl. Environ. Microbiol. 58 : 916-919.

- MONIB M., HOSNY I., ZOHDY L. and KHALAFALLAH M., 1981 - Studies on humic acids decomposing Streptomyces. 2 - Efficiency of different species in decomposition.
Zbl. Bakt. II. Abt. 136 : 15-25.

- MULLER G. and RAYMOND K.N., 1984 - Specificity and mechanism of ferrioxamine mediated iron transport in Streptomyces pilosus.
J. Bacteriol. 160 : 304-312.

- MURATA M., TERASAWA N. and HOMMA S., 1992 - Screening of microorganisms to decolorize a model melanoidin and the chemical properties of a microbially treated melanoidin.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 56 : 1182-1187.

- MURZAKOV B.G., SEMENOV A.M., EUDOKIMOVA M.D., YAKSMINA V.M. and DOROFEVA J.K., 1989 - Decomposition of soil humus compounds by microorganisms.
Microbiology 58 : 88-92.

- NATZUME M., YASUI K. and MARUMO S., 1989 - Calcium ion regulates aerial mycelium formation in actinomycetes.
J. Antibiotics 42 : 440-447.

- NISSENBAUM A. and KAPLAN I.R., 1972 - Chemical and isotopic evidence for the "in situ" origin of marine humic substances.
Limnol. Oceanogr. 17 : 570-582.

- ODEN S., 1914 - Zur Kolloidchemie der Humustoffe.
Kolloid Z. 14 : 123-130.

- ODEN S., 1919 - Huminsäuren.
Kolloidchemie Beih. 11 : 75.

- OMER C.A. and COHEN S.N., 1986 - Structural analysis of plasmid and chromosomal loci involved in site specific excision and integration of the SLP1 element of Streptomyces coelicolor.
J. Bacteriol. 166 : 999-1006.

- PANKHURST E.S., DAVIES M.J. and BLAKE H.M., 1972 - The ability of polymers and materials containing polymers to provide a source of carbon for selected microorganisms. In: Biodeterioration of Materials. WALTERS A.H. and HUECK VAN DER PLAS E.H. (Eds), Applied Science Publishers, London, Vol. 2, pp. 76-90.

- PASTI M.B. and CRAWFORD D.L., 1991 - Relationships between the abilities of Streptomycetes to decolorize the anthron-type dyes and to degrade lignocellulose.
Can. J. Microbiol. 37 : 902-907.

- PLANT J.E., ATTWELL R.W. and SMITH C.A., 1988 - A semi-micro quantitative assay for cellulolytic activity in microorganisms.
J. Microbiol. Meth. 7 : 259-263.

- POMMER E.H. and LORENZ G., 1986 - The behaviour of polyester and polyether polyurethanes towards microorganisms. In: Biodeterioration and biodegradation of plastics and polymers. SEAL K.J. (Ed.).
Biodeterioration Society Occasional Publication 1 : 77-86.

- PRESTON C.M. and SCHNITZER M., 1984 - Effects of chemical modifications and extractants on carbon 13 - NMR spectra of humic materials.
Soil Sci. Soc. Am. J. 48 : 305-311.

- RAMACHANDRA M., CRAWFORD D.L. and POMETO III A.L., 1987 - Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by Streptomyces spp. A comparative study of wild-type and genetically manipulated strains.
Appl. Environ. Microbiol. 53 : 2754-2760.

- RAMACHANDRA M., CRAWFORD D.L. and HERTEL G., 1988 - Characterization of extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete Streptomyces viridosporus.
Appl. Environ. Microbiol. 54 : 3057-3063.

- REID I.D. and SEIFERT K.A., 1982 - Effect of an atmosphere of oxygen on growth, respiration, and lignin degradation by white-rot fungi.
Can. J. Bot. 60 : 252-260.

- RENGANATHAN V., MIKI K. and GOLD M.H., 1986 - Role of molecular oxygen in lignin peroxidase reactions.
Arch. Biochem. Biophys. 246 : 155-161.

- RIFAI N. et BERTRU G., 1980 - La biodegradation des acides fulviques.
Hydrobiologia 75 : 181-184.

- RUBINSZTAIN Y., LOSELIS P., IKAN R. and AIZENSHTAT Z., 1984 - Investigations on the structural units of melanoidins.
Org. Geochem 6 : 791-804.

- SCHIAVONE J.R. and HASSAN H.M., 1987 - Biosynthesis of superoxide dismutase in eight prokaryotes: effects of oxygen, paraquat and an iron chelator.
FEMS Microbiol. Lett. 42 : 33-38.

- SCHNITZER M. and KHAN S.U., 1972 - Humic substances in the environment. DEKKER M. (Ed.), Inc., New-York, 327 p.

- SCHULTEN H.R., PLAGE B. and SCHNITZER M., 1991 - A chemical structure for humic substances.
Naturwissenschaften 78 : 311-312.

- SCHULTEN H.R., PLAGE B. and SCHNITZER M., 1992 - A chemical structure for humic substances.
Naturwissenschaften 79 : 330-331.

- SCHWYN B. and NEILANDS J.B., 1987 - Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores.
Anal. Biochem. 160 : 47-56.

- SINDEN D.L., 1979 - Isolation of aromatic hydrocarbon degrading actinomycetes and the relationship of aromatic hydrocarbon depending abilities to lignocellulose degrading abilities.
M.S. Thesis, University of Idaho, Moscow.

- SNEATH P.H.A., 1978 - Identification of microorganisms. In: Essays in Microbiology. NORRIS J.R. and RICHMOND M.H. (Eds), Wiley, Chichester, pp. 10/1 - 10/32.

- STANECK J.L. and ROBERTS G.D., 1974 - Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. **Appl. Microbiol.** 28 : 226-231.

- STEPHENS G.R. and HEICKEL G.H., 1975 - Agricultural and forest products as sources of cellulose. **Biotechnol. Bioenz. Symp.** 5 : 27-42.

- STEVENSON F.J., 1982 - Humus chemistry. Genesis - Composition - Reactions. Willey-Interscience, New-York, 443 p.

- STONESIFER J., MATSUSHIMA P. and BALTZ R.H., 1986 - High frequency conjugal transfer of tylosin genes and amplifiable DNA in Streptomyces fradiae. **Mol. Gen. Genet.** 202 : 348-355.

- STUIVER M., 1978 - Atmospheric carbon dioxide and carbon reservoir changes. **Science** 199 : 253-258.

- TAMM C.O. and OSTLUND H.G., 1960 - Radio carbon dating of soil humus. **Nature** 185 : 706-707.

- TRESNER H.D., HAYES J.A. and BACKUS E.J., 1967 - Morphology of submerged growth of Streptomyces as a taxonomic aid. 1 - Morphological development of Streptomyces aureofaciens in agitated liquid media. **Appl. Microbiol.** 15 : 1185-1191.

- VOLFF J.N., VANDEWIELE D., SIMONET J.M. and DECARIS B., 1993 - Ultraviolet light, mitomycin C and nitrous acid induce genetic instability in Streptomyces ambofaciens ATCC 23877. **Mutation Res.** 287 : 141-156.

- WAKSMAN S.A., 1950 - The actinomycetals : nature occurrence activities and importance. *Chronica Botanica Co*, Waltham MA, pp. 46-68.
- WAKSMAN S.A., 1959 - The actinomycetals. Vol. 1 : Nature occurrence and activities. Williams and Wilkins Co, Baltimore, pp. 27-43.
- WALLERIUS J., 1761 - "Soil organic matter". In: KONONOVA M.M. (Ed.), Pergamon Press Ltd, Oxford, 450 p.
- WELTE D., 1973 - Recent advances in organic geochemistry of humic substances and kerogen, a review. In: Advances in Organic Geochemistry. TISSOT B. and BIENNER F. (Eds), Editions Technip, Paris, pp. 3-13.
- WHITTAKER R.H. and LIKENS G.E., 1973 - Carbon and the biosphere. In: Aquatic and terrestrial humic materials. CHRISTMAN R.F. and GJESSING E.T. (Eds), Ann Arbor Science Publishers, Michigan. U.S. Atomic Energy Commission. A.E.C. Symposium n°30 : 281-302.
- WILLIAMS S.T., ENTWHISTLE S. and KURYLOWICZ W., 1974 - The morphology of streptomycetes growing in media used for commercial production of antibiotic.
Microbios 11A : 47-60.
- WILLIAMS S.T., GOODFELLOW M., ALDERSON G., WELLINGTON E.M.H., SNEATH P.H.A. and SACKIN M.J., 1983a - Numerical classification of Streptomyces and related genera.
J. Gen. Microbiol. 129 : 1743-1813.
- WILLIAMS S.T., GOODFELLOW M., WELLINGTON E.M.H., VICKERS J.C., ALDERSON G., SNEATH P.H.A., SACKIN M.J. and MORTIMER A.M., 1983b - A probability matrix for identification of Streptomyces.
J. Gen Microbiol. 129 : 1815-1830.
- WILLIAMS S.T., SHARPE M.E. and HOLT J.C., 1989 - In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins Eds, Baltimore, vol. 4.

- WIMALASENA K., and WIMALASENA D.S., 1991 - N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenylene diamine: a facile electron donor and chromophoric substrate for dopamine β -monooxygenase.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 175 : 920-927.

- ZAYED M.N., TAHA S.M., HAMED A.S. and ZOHDY L., 1974 - Studies in humic acid decomposing bacteria. III - Some by-products of the biological decomposition of humic acid.

Zbl. Bakteriол. Parasitenkde Infekt. Krankh. Hyg. 129 : 539-548.

S U M M A R Y

A Streptomyces collection capable of decolorizing humic acids was isolated and characterized using biochemical and microbiological methods. Six strains showing distinct phenotypes and reproducible activities on humic acids in liquid medium were selected for further analysis. Biodegradation properties were studied in presence of either natural humic acids or labelled humic acid-like substances obtained by the Maillard reaction. Results showed that the catabolic activity, cells surface associated, was dependent on an additional readily available carbon supply and stimulated by culture under oxygen incubation. Peroxidase activity from cell-free extracts, analysed by using the oxidation of tetramethyl-1,4-phenylene-diamine, allowed to distinguish two groups of strains according to the molecular weight of their purified major peroxidase. Catalase and superoxide dismutase activities were also analysed but did not seem linked to the above phenomena. Lastly, a genetic approach was undertaken to understand the origin of instability in the catabolic response encountered, under the culture conditions used, in these Streptomyces.