



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de L'Enseignement Supérieurs et de la Recherche Scientifique

جامعة احمد بوقرة بومرداس

UNIVERSITÉ M'HAMED BOUGARA \_BOUMERDES

Mémoire Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique

Domaine : Sciences de la nature de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

---

**Caractérisation et optimisation de la production de cellulases par une souche  
d'actinobactérie isolée à partir du sol forestier**

---

Réalisé par :

- MOSTEPHA Yacine

Soutenu le : 19/09/2024

Devant le Jury composé de :

Mme FOUZIA Soumaya

MAA

Présidente

Mme ZIDI Kahina

MCB

Examinatrice

Mme HAMOUDI Houria

MCB

Promotrice

Année universitaire 2023/2024

## **Remerciements**

*En préambule à ce mémoire, je tiens à remercier Allah qui m'a aidé et m'a donné la patience et le courage nécessaires durant ces longues années d'études.*

*Je souhaite exprimer ma gratitude à mes professeurs pour leurs efforts et la qualité de l'enseignement qu'ils m'ont prodigué au cours de mon parcours universitaire.*

*Je remercie plus particulièrement ma promotrice, Dr.HAMOUDI Houria, pour sa gentillesse et sa spontanéité dans la direction de ce travail, ainsi que pour sa disponibilité et ses conseils précieux, grâce auxquels j'ai pu améliorer mon travail.*

*Je suis également reconnaissant envers mes proches et toutes les personnes qui m'ont aidé et encouragé pour accomplir ce travail et atteindre mes objectifs.*

*Je remercie les membres du jury, Dr.FOUDIA Soumaya et Dr. ZIDI Kahina, pour leur présence, leur lecture attentive de ce mémoire, ainsi que pour les remarques qu'elles me feront lors de la soutenance.*

*Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire et à la réussite de cette formidable année universitaire.*

*Je n'oublie pas mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.*

*Enfin, je remercie tous mes proches et amis, qui m'ont toujours encouragé tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Merci à tous et à toutes.*

# ***Dédicace***

***Je remercie Allah de m'avoir donné la force et le courage pour  
Pouvoir réaliser ce modeste travail.***

***Je dédie ce travail à mes parents***

***Pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mon  
parcours scolaire mais aussi personnel. Aucun mot ne serait exprimer  
tout mon amour et toute ma gratitude, merci pour vos sacrifices le  
long de ces années merci pour vos présence rassurante, et si j'en suis  
arrivée là s'est grâce à vous. J'espère que le bon Dieu les garde, les  
comble de santé et leur une longue vie.***

***A mon père MOSTEPHA Mustapha pour son patient avec moi et son  
encouragement.***

***A ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux, ma mère BAOUALI  
Yamina. Que le bon ALLAH vous garde en bonne santé***

***A le meilleure personne de ma vie mon oncle MOSTEPHA Mouhouch  
Allah yrahmo***

***A ma deuxième mère MOSTEPHA Yamina Que le bon ALLAH vous  
garde en bonne santé***

***Mes frères que j'adore : Samir et Khaled et leurs familles Djidjiga et  
Samah ça que je remercie pour leurs aide et dévouement, que Dieu  
nous garde toujours unis.***

***A les enfants de mes frères Oussama et Shaima et Eline***

***À toute ma famille, oncles et tantes, cousins et cousines, petit et grand,  
sans exception.***

*À ma promotrice Dr. HAMOUDI Houria merci pour votre patience,  
Vos efforts intenses, et votre disponibilité permanente.*

*À mes précieuses amies d'enfance qu'ont toujours avec moi et derrière  
mon*

*dos : Walid, Abdou, Kamel, Mohammed, Sidou, Lotfi, Mommen, Sifou,  
Oussama, Salim, Abdelhaq, Othman, Zino, Toto, Yanis, Lamine, Reda,  
Rabah, Aymen, Younes, Mno, Khaled, Aymen, Aghillas, Sliman, Tayeb.*

*A mon meilleure ami Benbouzid Khaled Allah yrahmo.*

*À toute personne que je connais de près ou de loin, a toute la  
promotion Master 02 Biotechnologie microbienne  
2024 : Zaki, Rabah, Said, Farouk, Raouf, Kami, Sara, Khadija, Mounia,  
Mariya, Maroua Pour tous les bons moments passés et à venir.*

*Yacine*

## Table des matières

### Résumé

### Liste des abréviations

### Liste des figures

### Liste des tableaux

### Introduction 1

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. La cellulose et les enzymes cellulolytiques .....</b>                             | <b>3</b>  |
| 1.1 . La cellulose .....                                                                | 3         |
| 1.2 . Les enzymes cellulolytiques .....                                                 | 4         |
| 1.2.2 Classification des cellulases.....                                                | 5         |
| 1.2.3. Propriétés structurales et physico-chimiques des cellulases.....                 | 7         |
| 1.2.4. Application des cellulases.....                                                  | 7         |
| <b>2. Les actinobactéries : généralités et taxonomie et cycle de développement.....</b> | <b>8</b>  |
| 2.1 .Généralités .....                                                                  | 8         |
| 2.2 . Taxonomie des actinobactéries .....                                               | 9         |
| 2.3 . Cycle de développement.....                                                       | 10        |
| <b>3. Notion d'optimisation de la production d'enzymes par plan d'expériences .....</b> | <b>11</b> |
| 3.1 . Généralités .....                                                                 | 11        |
| 3.2 . Plan de Plackett – Burman.....                                                    | 12        |
| 3.3 . Méthodologie des surfaces de réponse .....                                        | 12        |
| <b>Matériel et méthodes : .....</b>                                                     | <b>14</b> |
| <b>1. Matériel .....</b>                                                                | <b>14</b> |
| 1.1 . Matériel analytique .....                                                         | 14        |
| 1.2 . Matériel biologique.....                                                          | 14        |
| <b>2. Méthodes.....</b>                                                                 | <b>14</b> |
| 2.1 . Revivification de la souche actinobactérienne BHZ59.....                          | 14        |

|                                                                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2 . Identification de la souche actinobactérienne BHZ59 .....                                                                     | 14        |
| 2.2.1. Identification morphologique de la souche actinobactérienne BHZ59.....                                                       | 14        |
| 2.2.2. Identification moléculaire de la souche actinobactérienne BHZ59 .....                                                        | 14        |
| 2.3 . Mise en évidence de l'activité cellulase sur milieu solide.....                                                               | 15        |
| 2.4 . Production de cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59 en fermentation submergée. 15                                  |           |
| 2.4.1. Mesure de l'activité cellulase.....                                                                                          | 16        |
| 2.4.2 Détermination des paramètres affectant la production de cellulases par le plan<br>d'expériences Plackett-Burman .....         | 17        |
| 2.5 Caractérisation de cellulases brutes produites par la souche actinobactérienne BHZ59 .....                                      | 19        |
| 2.5.1. Détermination du pH optimum et de la stabilité.....                                                                          | 19        |
| <b>1. Caractérisation et identification de la souche actinobactérienne BHZ59 .....</b>                                              | <b>20</b> |
| 1.1. Caractérisation morphologique .....                                                                                            | 20        |
| 1.2. Caractérisation moléculaire .....                                                                                              | 21        |
| <b>2. Détection de l'activité cellulase .....</b>                                                                                   | <b>23</b> |
| <b>3. Production d'enzymes cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59 en fermentation<br/>submergée .....</b>                 | <b>24</b> |
| <b>4. . Optimisation de la production de cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59<br/>par le plan Plackett-Burman .....</b> | <b>25</b> |
| <b>5. Caractérisation de cellulases produites par la souche actinobactérienne BHZ59 dans<br/>le surnageant brut .....</b>           | <b>28</b> |
| <b>Conclusion</b>                                                                                                                   | <b>33</b> |
| <b>Références bibliographiques .....</b>                                                                                            | <b>35</b> |
| <b>Annexes</b>                                                                                                                      |           |

## Résumé

L'objectif principal de cette présente étude consiste à caractériser et optimiser la production des cellulases par une souche d'actinobactérie BHZ59, isolée à partir du sol forestier, en utilisant la méthode des plans d'expériences. L'analyse du gène de l'ARNr a permis d'identifier la souche BHZ59 comme un nouveau genre d'actinobactérie ayant un pourcentage de similarité inférieur à 94.5% avec les 14 espèces les plus proches. Le criblage qualitatif de l'activité cellulase a révélé la capacité de cette souche à utiliser la CMC comme substrat spécifique pour la production de cellulases. La capacité de cette souche à produire des cellulases à partir des déchets agro-industriels est effectuée. Les résultats ont montré que l'utilisation des écorces d'orange induit la plus forte production de cellulases (28,74UI/mL). Les résultats de l'optimisation en utilisant le plan de Plackett et Burman, a permis d'identifier les facteurs : le temps d'incubation, la concentration des écorces d'orange et le pH ayant un effet significatif positif très élevé sur la production enzymatique, tandis que, la concentration du chlorure de calcium présentant un effet significatif négatif très élevé sur la production des cellulases. Les cellulases brutes présentent un pH optimum de 6 et une température optimale de 60°C. Les cellulases caractérisées sont très stables à des pH alcalins pendant 6h. Elles sont également stables dans la gamme de température de 60 à 80°C et conservent plus de 60 % de leur activité initiale pendant 2h à 80°C. Les différentes propriétés exhibées par les cellulases de la souche étudiée sont prometteuses et comparables à d'autres résultats d'où la possibilité d'utiliser ces enzymes dans divers domaines tels que : la papeterie, l'alimentation animale et la détergence.

**Mots clés:** *Actinobacteria*, Cellulases, Celluloses, Optimisation, Plackett-Burman, Caractérisation.

## ***Abstract***

The primary objective of this study is to characterize and optimize the production of cellulases by an actinobacterial strain BHZ59, isolated from forest soil, using experimental design methods. The analysis of the 16S rRNA gene identified strain BHZ59 as a new genus of actinobacteria with a similarity percentage less than 94.5% with the 14 closest species. Qualitative screening of cellulase activity revealed that this strain can use CMC as a specific substrate for cellulase production. The strain's ability to produce cellulases from agro-industrial waste was evaluated. Results showed that using orange peels induced the highest cellulase production (28.74 U/mL). Optimization using the Plackett and Burman design identified factors such as incubation time, orange peel concentration, and pH as having a very high positive effect on enzyme production, while calcium chloride concentration had a very high negative effect on cellulase production. The crude cellulases exhibited an optimum pH of 6 and an optimal temperature of 60°C. The characterized cellulases are very stable in alkaline pH for 6 hours and stable within the temperature range of 60 to 80°C, retaining over 60% of their initial activity for 2 hours at 80°C. The various properties exhibited by the cellulases from the studied strain are promising and comparable to other results, suggesting potential applications in areas such as paper industry, animal feed, and detergent manufacturing.

Keywords: Actinobacteria, Cellulases, Celluloses, Optimization, Plackett-Burman, Characterization

## الملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تصنيف وتحسين إنتاج إنزيمات السليلاز بواسطة سلالة من البكتيريا الفطرية BHZ59، التي تم عزلها من التربة الغابية، باستخدام طرق تصميم التجارب. أظهر تحليل جين الحمض النووي الريبي الريبوزومي 16S أن السلالة BHZ59 تمثل جنسًا جديدًا من البكتيريا الفطرية، مع نسبة تشابه تقل عن 94.5% مع أقرب 14 نوعًا. كشفت الفحوصات النوعية لنشاط السليلاز أن هذه السلالة قادرة على استخدام CMC كركيزة محددة لإنتاج السليلازات. كما تم تقييم قدرتها على إنتاج السليلازات من النفايات الزراعية والصناعية. أظهرت النتائج أن استخدام قشور البرتقال يؤدي إلى أعلى إنتاج من السليلازات (28.74 وحدة دولية/مل). نتائج التحسين باستخدام تصميم Plackett و Burman أظهرت أن العوامل مثل وقت الحضانة، وتركيز قشور البرتقال، ودرجة الحموضة لها تأثير إيجابي كبير جدًا على إنتاج الإنزيمات، بينما كان لتركيز كلوريد الكالسيوم تأثير سلبي كبير جدًا على إنتاج السليلازات. عرضت السليلازات الخام درجة حموضة مثلى قدرها 6 ودرجة حرارة مثلى قدرها 60 °C. كانت السليلازات المستخلصة مستقرة جدًا في الأوساط القلوية لمدة 6 ساعات، ومستقرة في نطاق درجات حرارة من 60 إلى 80 °C، حيث احتفظت بأكثر من 60% من نشاطها الأولي لمدة ساعتين عند 80 °C. الخصائص المختلفة التي تظهرها السليلازات من هذه السلالة واعدة ويمكن استخدامها في مجالات متنوعة مثل صناعة الورق، تغذية الحيوانات، وصناعة المنظفات.

**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا فطرية، إنزيمات السليلاز، سليولوز، تحسين، تصنيف، تصميم Plackett-Burman،

## ***Liste des abréviations***

***AGX : arabinoglucuronoxylanes***

***AND: Acide désoxyribonucléique***

***ARN: Acide ribonucléique***

***BG :  $\beta$ -glucosidases***

***CAZy : Carbohydrate-Active enzymes (base de données bioinformatique).***

***CBH : Cellobiohydrolases***

***CBM: Cellulose Binding Domain***

***CMC : caroxymethylcellulose***

***GC% : Taux Guanine + Cytosine***

***CD : module catalytique***

***CV : Coefficient de variabilité***

***Df : Degré de liberté***

***DNS : Acide dinitrosalicylique***

***EC : Enzyme commission***

***EG : Endoglucanases***

***F-faleur: Valeur de Ficher***

***GAX : Glucuronoarabinoxylanes***

***GHs : Glycosides hydrolases***

***kDa: Kilodalton.***

***LMA : Laboratoire de microbiologie laboratoire de microbiologie***

***MA : Mycélium aérien***

***MS : Mycelium du substrat***

***NCBI: National center for biotechnology***

***PBD: Plackett- Burman Design***

***PCD : mort cellulaire programmée***

***pH : Potentiel hydrogène***

***PM : Poids moléculaire***

***RSM : méthode de surface réponse méthodologie***

***$R^2$  : Coefficient de détermination***

***rpm : Retation par minute***

***RSM : Response surface methodology***

***UI : Unité international***

## Liste des figures

|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Structure chimique de la cellulose .....                                                                                                                                                                                                                             | 4  |
| Figure 2: Représentation schématique de l'action des cellulases sur la cellulose. ....                                                                                                                                                                                          | 5  |
| Figure 3: Les deux principaux mécanismes d'hydrolyse des liaisons glycosidiques . ....                                                                                                                                                                                          | 6  |
| Figure 4: (A) : Illustration représentant les différents domaines dans la structure 3D des cellulases (B) :<br>Représentation schématique de l'organisation multi-domaines des cellulases. EXG : Exoglucanase ; CBH<br>II : Cellobiohydrolase II ; EG B : Endoglucanase B. .... | 8  |
| Figure 5: Cycle de développement des streptomycètes sur milieu solide .....                                                                                                                                                                                                     | 11 |
| Figure 6 : La réduction de DNS dans un milieu alcalin à 100°C.....                                                                                                                                                                                                              | 16 |
| Figure 7 : Aspect de la souche actinobactérienne BHZ59 sur le milieu Gausse. ....                                                                                                                                                                                               | 20 |
| Figure 8: Observation microscopique optique de la souche BHZ59 après 7 jours d'incubation à 30°C<br>(G×40 et ×100). a : état frais ; b : après coloration de Gram .....                                                                                                         | 21 |
| Figure 9 : Mise en évidence de l'activité cellulase de la souche actinobactérienne BHZ59 sur milieu solide<br>à base de CMC.....                                                                                                                                                | 23 |
| Figure 10: Production de cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59 en fermentation submergée<br>sur quatre substrats lignocellulosiques. ....                                                                                                                            | 24 |
| Figure 11: Charte de Pareto des effets des variables testées.....                                                                                                                                                                                                               | 27 |
| Figure 12: Effet de la variation du pH sur l'activité cellulase.....                                                                                                                                                                                                            | 29 |
| Figure 13: L'activité relative des cellulases produites par la souche actinobactérienne BHZ59 à différents<br>pH.....                                                                                                                                                           | 30 |
| Figure 14: Effet de la température sur l'activité des cellulases.....                                                                                                                                                                                                           | 31 |
| Figure 15: Thermostabilité des cellulases produites par la souche actinobactérienne BHZ59. ....                                                                                                                                                                                 | 32 |
| Figure 16: Courbe d'étalonnage du dosage du glucose.....                                                                                                                                                                                                                        | 46 |

## ***Liste des tableaux***

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1: Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs.....                                                                     | 17 |
| Tableau 2: Les paramètres culturels indépendants criblés par le plan de Plackett-Burman et leurs niveaux attribués .....                    | 18 |
| Tableau 3: Les propriétés macromorphologiques de la souche actinobactérienne BHZ59 sur différents milieux.....                              | 20 |
| Tableau 4: les espèces types les plus proches de la souche actinobactérienne BHZ59 et leurs degrés de similitude.....                       | 22 |
| Tableau 5: Seuils de similarité de séquence du gène de l'ARNr 16S pour les rangs taxonomiques majeurs. ....                                 | 22 |
| Tableau 6: Matrice de Plackett-Burman et les niveaux de production de cellulases. ....                                                      | 25 |
| Tableau 7: L'analyse de la variance (ANOVA) du modèle proposé pour la production des cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59. .... | 26 |
| Tableau 8: Valeurs du coefficient de détermination $R^2$ .....                                                                              | 28 |

# ***Introduction***

## **Introduction**

Au cours de ces dernières années, la demande de l'industrie mondiale en enzymes d'origine microbienne, soutenue par le besoin croissant en solutions durables, ne cesse de croître en raison de leurs propriétés catalytiques et biochimiques uniques afin d'améliorer certains procédés de fabrication tels que l'industrie textile, l'industrie de la papeterie, l'alimentation, la production de produits chimiques ou bien de biocarburants (**Brahmachari, 2016**).

Les principales enzymes utilisées sur le marché mondial sont les enzymes dégradant la lignocellulose, dites lignocellulolytiques, qui détiennent une place importante dans ce marché et représentaient dès la fin des années 1990, 20 % des ventes d'enzymes (**Bhat, 2000**). Parmi ces enzymes, les enzymes cellulolytiques occupant la troisième place mondiale dans l'industrie des enzymes, présentent une cible pour les recherches aussi bien académiques ou industrielles afin de découvrir des nouvelles enzymes hautement compétentes avec une production rentable et respectueuse de l'environnement (**Bahouli et Zidalmal, 2020**).

Les enzymes cellulolytiques sont un groupe complexe d'enzymes glycosides hydrolases sécrétées par un large éventail de micro-organismes, notamment des champignons filamenteux, des bactéries et des levures (**Sandhya et al., 2005 ; Khelil, 2017**), elles convertissent de nombreux composés organiques et déchets agro-industriels en produits économiques à hautes valeurs ajoutées. Cependant, Les cellulases obtenues à partir des actinobactéries se sont révélées des candidats les plus prometteurs dans le milieu industriel de fait de leur meilleure stabilité vis-à-vis de la température, du pH, des sels et des solvants organiques, et qu'elles peuvent être obtenues à moindre coût qui les rendent adaptées aux différents processus biotechnologiques (**Gupta et al., 2003**).

La production des enzymes cellulolytiques peuvent être influencée par différents paramètres, tels que les conditions de culture, la composition des milieux et la composition génétique de la souche productrice. L'optimisation de la production et de l'activité cellulases est devenue un objectif clé pour les chercheurs, et vise à atteindre des rendements plus élevés tout en minimisant les coûts et les exigences de temps. La conception du plan d'expériences est la méthode la plus efficace pour identifier les facteurs potentiellement influençant la production et déterminer les concentrations optimales des variables choisies (**Niladevi et al., 2009**).

Dans cette optique, que notre travail s'inscrit et nous nous sommes fixés pour objectif l'optimisation de la production des cellulases par une souche actinobactérienne cultivée en fermentation submergée à base de déchets agroindustriels bon marché, en utilisant la méthode des plans d'expériences afin de déterminer les différents facteurs clés influençant leur production et étudier leurs propriétés physico-chimiques pour une éventuelle application industrielle.

Pour ce faire, nous avons adopté l'approche méthodologique suivante :

- La première partie de manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique sur les enzymes cellulolytiques, les actinobactéries et ainsi que des notions fondamentales relatives aux plans d'expériences. .
- La deuxième partie est expérimentale et concerne la description du matériel et des méthodes utilisées et la discussion des résultats obtenus.

# *Synthèse bibliographique*

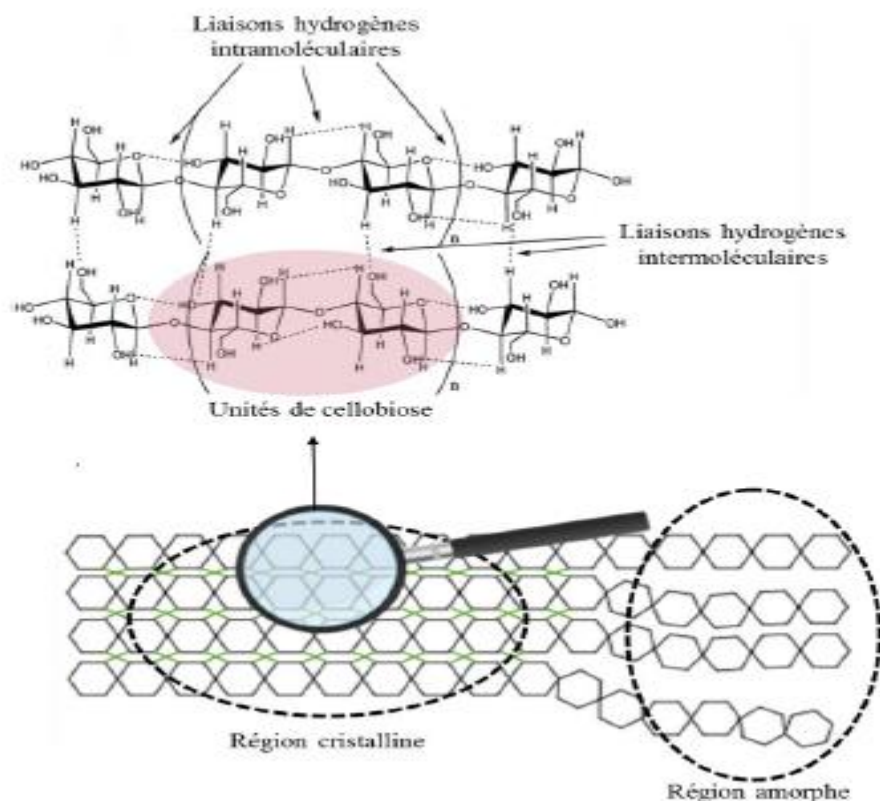
## 1. La cellulose et les enzymes cellulolytiques

### 1.1 . La cellulose

La cellulose est la substance organique naturelle la plus abondante sur terre, elle est considérée comme une source inépuisable dans un contexte mondial où la demande en produits écologiques et biocompatibles est particulièrement croissante. La cellulose est le premier composant de la paroi cellulaire en constituant entre 35 à 50 % de sa matière sèche suivant l'espèce, et chez certaines espèces jusqu'à 100 % comme chez le coton (**Chen, 2014**).

La cellulose correspond à un homopolymère linéaire non ramifié de forte masse moléculaire constitué de résidus  $\beta$ -D-glucopyranose répétés et reliés par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Les unités de glucose sont organisées sous forme de sous-unités de cellobiose distinctes les unes des autres par des rotations de 180° autour de l'axe de la molécule, conférant à la chaîne de cellulose une structure linéaire (**Horn et al., 2012**). Chaque chaîne de cellulose possède une extrémité réductrice, porteuse d'un hémiacétal sur le carbone (C1) du résidu de glucose, et une extrémité non-réductrice non chimiquement équivalentes (**Liao et al., 2020**). Le degré de polymérisation de la cellulose, qui fait référence au nombre d'unités de glucose dans la molécule, est très variable suivant son origine. Il est estimé, à environ 500 dans la paroi primaire jusqu'à plus de 15000 dans la paroi secondaire (**Houfani et al., 2020**).

La configuration  $\beta$  des unités glucoses permet l'établissement de nombreuses liaisons hydrogène intramoléculaires et intermoléculaires entre les groupes OH des chaînes adjacentes pour former des plans en feuillets (**Cosgrove, 2005**) (**Figure 1**). Les feuillets interagissent entre eux par l'intermédiaire d'interactions de Van der Waals pour former un nouveau stade d'arrangement de la cellulose, les microfibrilles. Au sein de ces fibrilles, deux types de régions peuvent être distinguées : les régions cristallines et les régions amorphes. Les régions cristallines représentent les régions riches en liaisons intermoléculaires conférant, à la cellulose, une structure ordonnée et hautement hydrophobe (**Brandt et al., 2013**). Les régions amorphes forment des zones moins ordonnées pauvres en liaisons intermoléculaires confèrent à la cellulose un caractère semi-cristallin et fibrillaire, et la rendant plus accessibles pour les enzymes lors de la déconstruction enzymatique (**Ciolacu et al., 2011**).



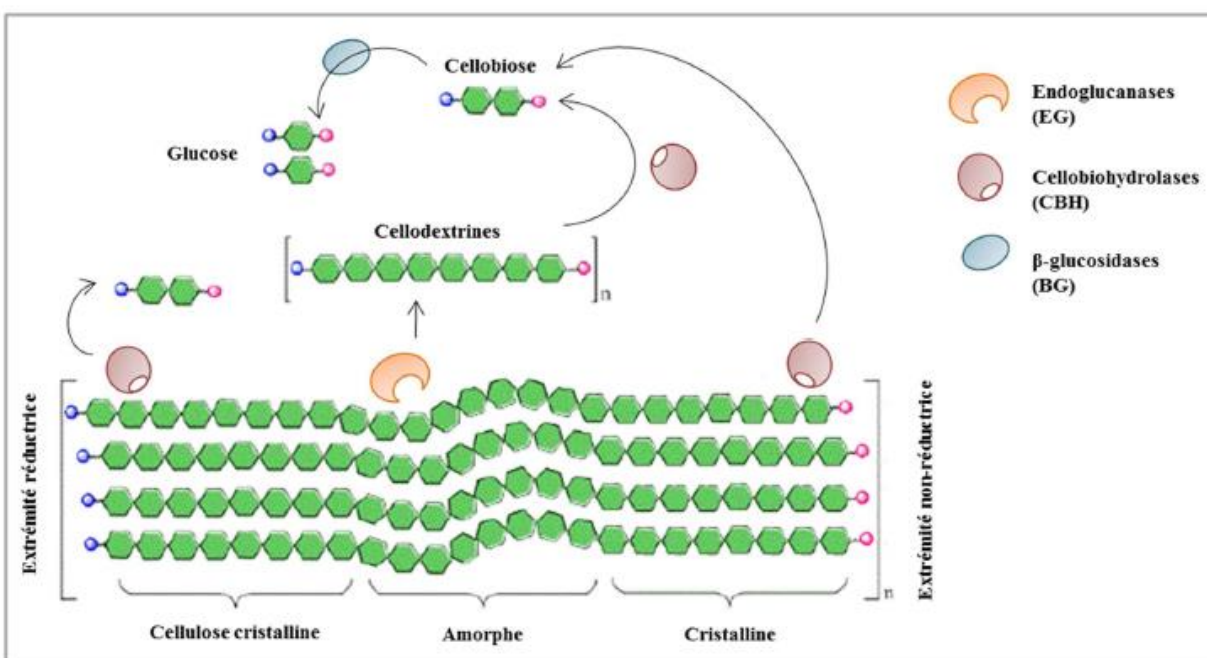
**Figure 1 :** Structure chimique de la cellulose (Chen, 2014).

## 1.2 . Les enzymes cellulolytiques

Les cellulases sont des enzymes appartenant à la famille de glycoside hydrolases (GHs), elles sont généralement extracellulaires, inductibles et produites par les microorganismes durant leur croissance sur le matériel cellulosique (Kim *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2006). Au sein des chaînes de cellulose, les cellulases hydrolysent liaisons  $\beta$ -(1,4) reliant deux unités de glucose, et libèrent comme produits primaires : le glucose, le cellobiose et les cellooligosaccharides (Houfani *et al.*, 2020). Elles donnent un grand rendement de saccharification (90 - 98 %) et leur utilisation peuvent engendrer des effluents favorables pour l'environnement (Aftab et Vermette, 2008).

La dégradation complète de la cellulose requiert le clivage de toutes les liaisons glycosidiques, ce qui fait appel à trois types d'activités complémentaires agissant de manière synergique grâce à leurs différences de spécificité au niveau des liaisons internes

(endoglucannases), des extrémités (exoglucannases) et du cellobiose ( $\beta$ -glucosidases) (**figure 2**) (Couturier et Berrin, 2013 ; Talamantes *et al.*, 2016).



**Figure 2:** Représentation schématique de l'action des cellulases sur la cellulose (Sreedharan *et al.*, 2016).

### 1.2.2 Classification des cellulases

Toutefois, même si toutes les cellulases permettent d'induire des coupures au niveau des liaisons  $\beta$ -(1,4) de la cellulose, elles se diffèrent entre elles par leur structure mais également selon leur site d'action sur la chaîne de cellulose. Suivant la classification CAZy (Carbohydrate-Active enzymes), les cellulases sont, en fonction du regroupement hydrophobe du module catalytique CD (catalytic domain) et de leur similarité d'action et séquences, distribuées entre différentes familles : les endoglucanases, les exoglucanases, et les  $\beta$ -glucosidases (Brethauer et Studer, 2015 ; Houfani *et al.*, 2020).

#### ▪ Endoglucanases (EG)

Les endoglucannases (EC3.2.1.4) ou endo- $\beta$ -(1,4)-glucanases ou 1,4- $\beta$ -D-glucane-4-glucanohydrolases ou encore carboxy-méthylcellulase (CMCase), appartenant aux familles GH5, 6, 7, 12 et 45, agissent de manière aléatoire au niveau de la cellulose amorphe, produisant du cellobiose ou de courtes chaînes de cellulose appelées cellodextrines, induisant une diminution du

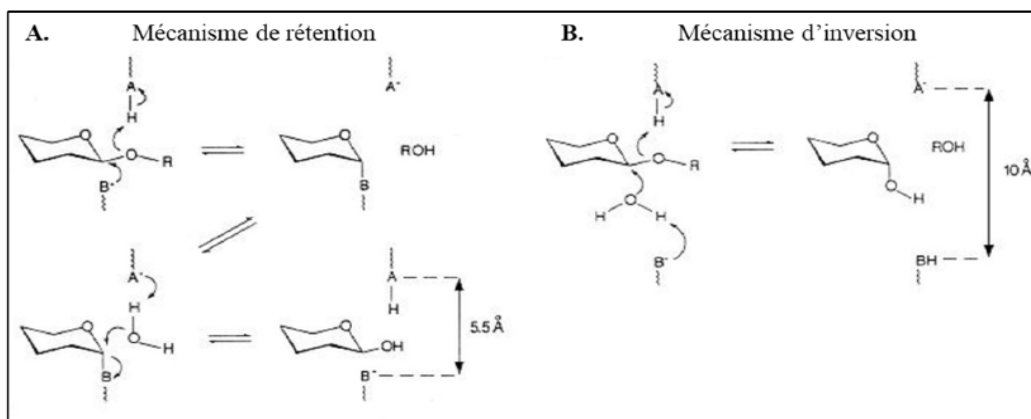
degré de polymérisation de cellulose et la multiplication du nombre d'extrémités, sur lesquelles peuvent s'adsorber les cellobiohydrolases (Zabed *et al.*, 2017; Barbosa *et al.*, 2020).

#### ▪ Cellobiohydrolases (CBH)

Les exo- $\beta$ -(1,4)-D-glucanases ou cellobiohydrolases (CBH), incluant cellobiohydrolases I (EC 3.3.1.91) et II (EC 3.2.1.176), appartiennent aux familles GH6 et GH7 et attaquent les chaînes de cellulose au niveau de la région cristalline par leur extrémité réductrice (CBH1) ou non-réductrice (CBH2), et libèrent du cellobiose de manière processive. Les CBH de la famille GH7 agissant sur l'extrémité réductrice des fragments de cellulose, ont un mécanisme catalytique de rétention (dans lequel le carbone anomérique du produit garde après le clivage la même configuration que celui du substrat, voir **Figure 3A**), tandis que celles de la famille GH6, agissant sur l'extrémité non-réductrice, ont un mécanisme d'inversion (dans lequel le carbone anomérique change de stéréochimie au cours de la réaction, voir **Figure 3B**) (Couturier *et al.*, 2016; Saini *et al.*, 2015).

#### ▪ $\beta$ -glucosidases (BG)

Les  $\beta$ -D-glucosidases (BG) ou cellobiases (EC 3.2.1.21), appartenant aux familles GH1 et GH3, agissent sur le cellobiose et l'extrémité non réductrice des cellodextrines produits par les autres cellulases et les dégradent en monomères de glucose de manière non processive ; cela permet d'éviter l'accumulation de cellobiose, qui est un inhibiteur des cellobiohydrolases et des endoglucanases (Couturier *et al.*, 2016; Saini *et al.*, 2015).



**Figure 3:** Les deux principaux mécanismes d'hydrolyse des liaisons glycosidiques (Davies et Henrissat, 1995).

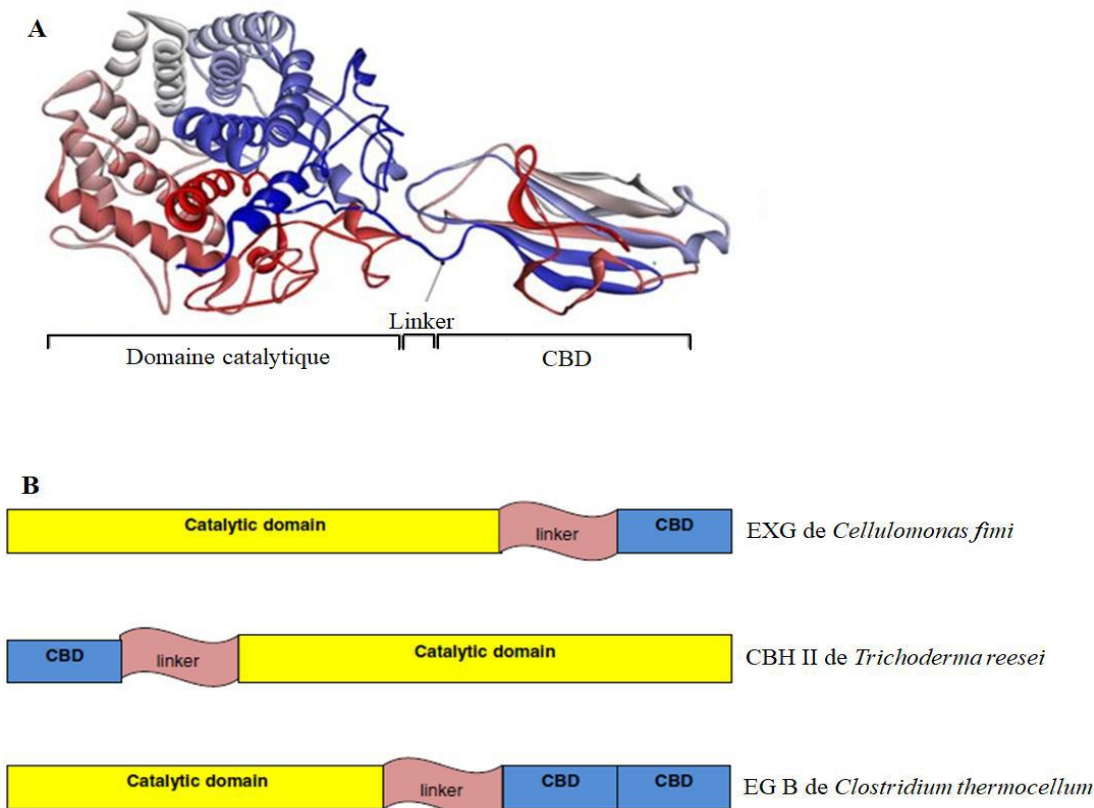
### 1.2.3. Propriétés structurelles et physico-chimiques des cellulases

Les cellulases ont des propriétés structurelles et physico-chimiques différentes selon leur origine. La majorité des cellulases microbiennes sont glycoprotéines avec des niveaux de glycosylation élevés dont leur composition chimique présente une forte proportion des résidus acides (**Bahouli et Zidalmal; 2020**). Les cellulases ont des poids moléculaires très variables qui dépendent principalement de leurs origines. Certaines endoglucanases ont des poids moléculaires de 30-90 KDa, alors que d'autres sont de dimensions beaucoup plus faibles de l'ordre de 13 KDa (**Dan et al., 2000**). Les exoglucanases ont des poids moléculaires de 30-50 KDa (Singh et al. , 1990), alors que les  $\beta$ -glucosidases ont des masses moléculaires plus élevées variant de 90-240 KDa (**Sanyal et al., 1988**). Les cellulases sont souvent liées à des CBM (Cellulose Binding Domain) qui assurent la liaison enzyme-substrat en leur permettant d'approcher le module catalytique (CD) de son substrat, grâce à des interactions avec les résidus hydrophobes qu'ils portent (**Gilbert et al., 2013**). Le CBD existe sous forme domaine simple, double ou triple et il pourrait être situé dans l'extrémité C-terminale (terminaison carboxyle) ou N-terminale (terminaison amine) de la protéine. Le CBD est connecté au domaine catalytique via un peptide riche en proline et thréonine, appelé "Linker"(**figure 4**) (**Lakhundi et al., 2015**).

La plupart des enzymes cellulolytiques caractérisés ont des valeurs de pH optimales de 3-7 (**Lynd et al.,2002**). De manière générale, les cellulases présentent une activité optimale à une température comprise entre 50 et 60 °C (**Kumar et al.,2008**).

### 1.2.4. Application des cellulases

Les cellulases occupent la troisième place parmi les groupes d'enzymes industrielles produite dans le monde. L'intérêt que porte la biotechnologie à la cellulase s'explique par ses larges applications dans diverses industries, les plus répondues sont: l'industrie du textile (**Kotchoni et al., 2003**), l'industrie papetière (**Scriban, 1993**), l'industrie des détergents (**Ponnambalam et al., 2011**). Elles sont également utilisées dans les préparation des additifs alimentaires pour l'alimentation animale (**Singhania et al., 2010**), les préparation des formules médicamenteuses utilisées comme aides digestives (**Ponnambalam et al., 2011; El-ahmady-El-nagga et al., 2012**), la clarification des jus de fruits (**Scriban, 1993**), et la production des biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération par fermentation des biomasses lignocellulosique en éthanol ( **El- ahmady-El-nagga et al., 2012**) etc...



**Figure 4: (A) :** Illustration représentant les différents domaines dans la structure 3D des cellulases (B) : Représentation schématique de l'organisation multi-domaines des cellulases. EXG : Exoglucanase ; CBH II : Cellobiohydrolase II ; EG B : Endoglucanase B (**Lakhundi et al. 2015**).

## 2. Les actinobactéries : généralités et taxonomie et cycle de développement

### 2.1 .Généralités

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif, saprophytes, filamenteuses, formées par un réseau ramifié d'hyphes minces non fragmentés de 0.5-1.0µm de diamètre sur un substrat solide poussant à la fois à la surface et à l'intérieur pour former le mycélium végétatif (**Prescott et al., 2010**), caractérisées par une croissance lente. Ayant un coefficient de Chargaff élevé (GC%) varie généralement entre 60 et 75% (**Chun et al., 1997**).

La majorité des actinobactéries sont hétérotrophes et/ou chimioorganotrophes pouvant utiliser une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris la biomasse

lignocellulosique, aérobies mais certains d'entre eux peuvent se développer dans des conditions anaérobies. Préférant un pH neutre ou peu alcalin, elles sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolèrent des températures avoisinant les 50°C pouvant même aller jusqu'à 60°C (Omura, 1992).

Les actinobactéries sont des microorganismes très présents au niveau de tous les écosystèmes, tels que le sol, l'océan, ainsi que dans des habitats extrêmes (Hopwood, 2007).

## 2.2 . Taxonomie des actinobactéries

Les actinobactéries sont documentées comme une lignée majeure dans le domaine des bactéries. Les genres au sein du phylum présentent une diversité massive en termes de caractéristiques morphologiques, et physiologiques. La taxonomie des actinobactéries a considérablement développé progressivement mais la définition au niveau de l'espèce devient une tâche incomplète à cause de la variabilité des caractéristiques culturels, morphologiques, physiologiques et biochimiques observées aux niveaux inter- et intra-espèces (Anderson et Wellington, 2001). Par conséquent, l'approche taxonomique polyphasique est plus recommandée dans taxonomie des actinobactéries, elle comprend la combinaison de l'ensemble des études morphologiques, culturelles, biochimiques, chimiotaxonomiques, physiologiques, et génomique moléculaires (Vandamme et al., 1996), qui aide à déterminer la taxonomie au niveau des espèces au sein du genre (Anderson et Wellington, 2001). Actuellement, cette approche est plus populaire dans classification bactérienne et fournit de nouvelles informations sur les espèces et les genres de l'organisme. Une identification taxonomique précise est obligatoire pour chaque nouvel isolat microbien provenant d'habitats environnementaux inhabituels (Edison et al., 2022).

Les caractéristiques clés utilisé pour définir la taxonomie des actinobactéries en niveaux de genre et d'espèce, sont : les études morphologiques basées sur la microscopie, la chimiotaxonomie basée sur la chimie cellulaire, les études culturelles principalement sur la formation des mycéliums, la croissance et les pigments, les caractéristiques biochimiques et physiologiques et enfin les études génotypiques moléculaires basées sur le séquençage du gène de l'ARNr 16s , l'hybridation ADN-ADN, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%), ainsi que l'analyse des séquences des protéines ribosomiques (Barka et al., 2016 ; De Vos et al., 2017).

Les actinobactéries sont classés actuellement dans le domaine *Bacteria* ou *Eubacteria*, le phylum des *Actinobacteria* et la classe des *Actinobacteria* également. Constituant un des plus

grands phylum en taxonomie bactérienne avec 6 classes, 29 ordres (dont 18 compris dans la seule classe des Actinobactéries), 64 familles (dont 47 dans la seule classes des Actinobactéries) et 371 genres (NCBI consulté le 04/09/2019) (**Vautrin, 2019**).

### **2.3 . Cycle de développement**

Les actinobactéries ont un cycle de développement très complexe comprend la différenciation et la mort cellulaire programmée (PCD). Le cycle de vie commence par la germination des spores et l'émergence des tubes germinatifs par élongation de la pointe, qui donne naissance à un mycélium végétatif formé d'hyphes ramifiés. Après plusieurs jours, le mycélium du substrat commence à se développer et s'étendre vers la partie superficielle pour former des hyphes aériens multi-nucléés. Finalement, la croissance s'arrête et le mycélium aérien subit un ensemble de changements morphologiques qui incluent la septation massive qui donne naissance à des compartiments uninucléoïdes. Ensuite, chaque compartiment se développe en spores et crée des chaînes de spores matures (**Li et al. 2016 ; Manteca et Sánchez, 2010**) (**figure 5**).

Aux premiers stades de développement, le mycélium substrat présente un métabolisme primaire dynamique et subit le premier cycle de PCD. Le deuxième cycle de PCD est noté dans le mycélium aérien lors de la formation des spores. Les matières cellulaires libérées pendant la PCD génèrent un pool de nutriments qui soutient la croissance ultérieure du microorganisme (**Filippova et Vinogradova, 2017**).

La plupart des souches d'actinobactéries en cultures liquides ne sporulent pas et produisent principalement quatre formes morphologiques : des pastilles, des touffes, des hyphes ramifiés et des hyphes non ramifiés (**Pamboukian et al. 2002**).

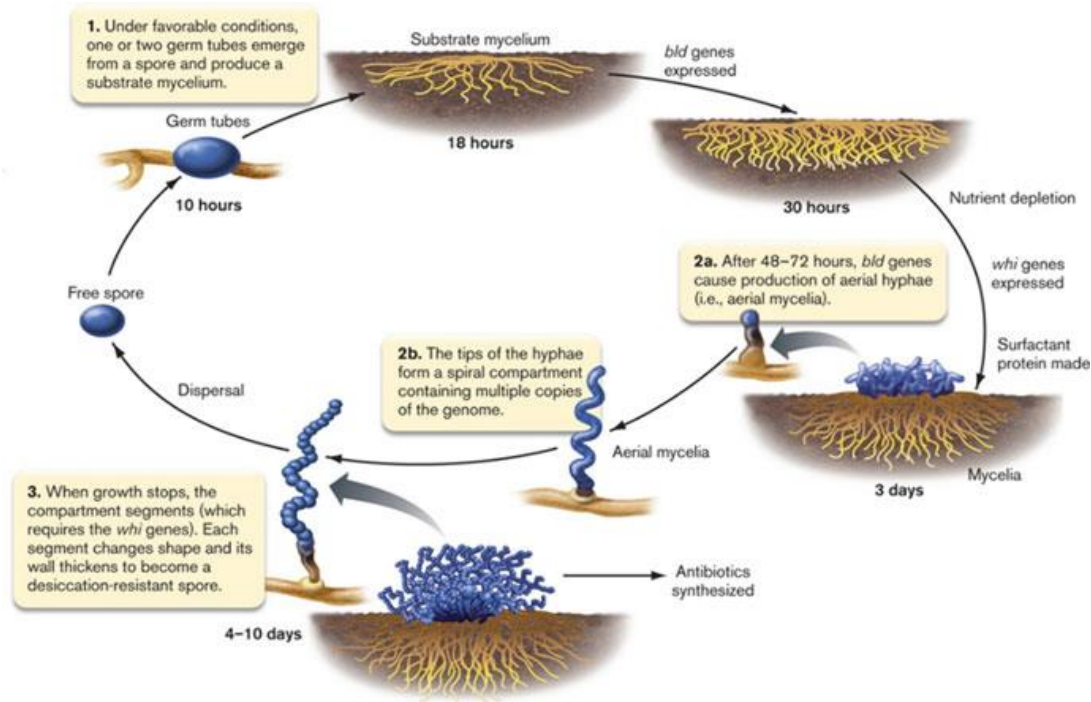


Figure 5: Cycle de développement des streptomycètes sur milieu solide (Edison, 2022).

### 3. Notion d'optimisation de la production d'enzymes par plan d'expériences

#### 3.1 . Généralités

Le processus d'optimisation suscite une grande importance pour la production industrielle des enzymes, les manipulations des milieux représentent la meilleure alternative aux manipulations génétiques (Reddy et al., 2008). L'utilisation de la méthode des plans d'expériences en biologie et particulièrement dans le domaine des biotechnologies, apparait aujourd'hui comme un préalable d'une part à l'amélioration de la production des enzymes et, d'autre part à la réduction des temps de développement. La méthode des plans d'expériences permet en effet à obtenir le maximum de production à un coût minimal avec une meilleure efficacité et une grande exactitude. L'objectif principal des plans d'expériences est de choisir au mieux les expériences à réaliser pour découvrir les règles d'évolution d'une réponse en fonction de variables opératoires, d'identifier et de mieux comprendre les interactions ou éventuelles synergies existent entre les différents paramètres étudiés, en utilisant des méthodes mathématiques et statistiques permettant de

modéliser et d'organiser au mieux des essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles (**Goupy et Creighton, 2006**).

Il existe deux types de plans :

-Plans factoriels complets : Il s'agit d'un remplissage de l'espace de façon régulière dans le domaine expérimental, plus le nombre de niveaux sera important plus le remplissage de l'espace sera satisfaisant mais cela entraîne un nombre énorme d'expériences (**Franco, 2008**).

- Plans factoriels fractionnaires : Dans les plans fractionnaires, l'expérimentation n'est qu'une fraction des essais du plan complet qui inclue tous les effets principaux et toutes les interactions (**Hoinard, 2009**).

E effet, selon leurs propriétés et leurs capacités à répondre à certaines problématiques particulières, Les plans d'expériences sont devisés en deux grandes catégories.

- Les plans pour estimer et comparer les effets des paramètres (plan Plackett- Burman)

- Les plans pour régler les paramètres afin d'obtenir un optimum (méthodologie des surfaces de réponse) (**Goupy, 2017**).

### **3.2 . Plan de Plackett – Burman**

Ce plan consiste essentiellement en une fraction très spécifique d'un plan factoriel complet. Il permet d'évaluer les effets principaux sans le bruit introduit par des alias. Bien que ce plan se base sur deux niveaux de chaque facteur, nous pouvons aussi introduire un certain nombre de points centraux. Ces points servent à évaluer le degré de non-linéarité que possède la surface de réponse en question (**Plackett et Burman, 1946**). L'analyse des résultats de ce plan permis de cribler les facteurs les plus importants présentant un effet significatif sur une réponse d'intérêt.

### **3.3 . Méthodologie des surfaces de réponse**

La méthodologie des surfaces de réponse (MSR permettent de régler les paramètres pour atteindre un optimum entre les niveaux des facteurs étudiés (**Goupy, 2017**). Le principe de toutes les méthodes d'optimisation consiste à explorer cette surface de façon à localiser un éventuel extremum dans un domaine expérimental donné, en utilisant uniquement les facteurs précédemment jugés influents. Ces plans utilisent de modèles polynomiaux du second degré avec

interaction d'ordre 2. (**Goupy et Creighton, 2006**). Il existe de nombreux types de plans permettant de construire des surfaces de réponse tels que : les plans composites centrés, plans de Doehlert et les plans Box-Behnken (**Goupy, 2017**).

***Matériel***  
***Et***  
***Méthodes***

## **Matériel et méthodes :**

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biotechnologie microbienne (S16) au niveau de l'université de Boumerdes faculté des Sciences.

### **1. Matériel**

#### **1.1 . Matériel analytique**

Le matériel analytique utilisé dans cette étude est résumé en **annexe I**.

#### **1.2 . Matériel biologique**

Le microorganisme utilisé dans ce travail pour la production des cellulases est une souche d'actinobactérie désignée BHZ59, appartenant à la collection du laboratoire de Microbiologie Appliquée « LMA » de l'université A/Mira de Bejaia. Cette souche a été isolée à partir du sol forestier dans la région de Tikdjeda, Bouira.

### **2. Méthodes**

#### **2.1 . Revivification de la souche actinobactérienne BHZ59**

La souche actinobactérienne BHZ59, conservée sur le milieu gélosé Gausse à une température de 4°C, est cultivée sur le même milieu gélosé Gausse (**Annexe II**) par la méthode des stries serrées à la surface de la gélose puis incubée à 30° C pendant 5 jours afin de l'activer et la repiquer plus tard sur un milieu à base de CMC.

#### **2.2 . Identification de la souche actinobactérienne BHZ59**

##### **2.2.1. Identification morphologique de la souche actinobactérienne BHZ59**

Cette étude vise à déterminer l'aspect général des colonies, la couleur des mycélia aériens et du substrat de la souche actinobactérienne BHZ59 après 7 jours d'incubation à 30°C sur différents milieux de culture ISP2, ISP3, ISP4 et le milieu Gausse (La composition de ces milieux est donnée en **annexe II**) ainsi que l'aspect micromorphologique à l'aide d'un microscope optique à deux grossissements (x40) et (x100) à l'état frais et après réalisation d'une coloration de Gram.

##### **2.2.2. Identification moléculaire de la souche actinobactérienne BHZ59**

L'identification moléculaire de la souche actinobactérienne BHZ59 est déterminée par le séquençage direct de la séquence du gène de l'ARN ribosomal 16S (Macrogen, Amsterdam, Pays-Bas). Les données de séquence résultantes sont analysées en utilisant l'analyseur génétique

évolutive version 7 (MEGA7) (Kumar *et al.*, 2016), le serveur EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017), et BlastN (Altschul *et al.*, 1990).

### **2.3 . Mise en évidence de l'activité cellulase sur milieu solide**

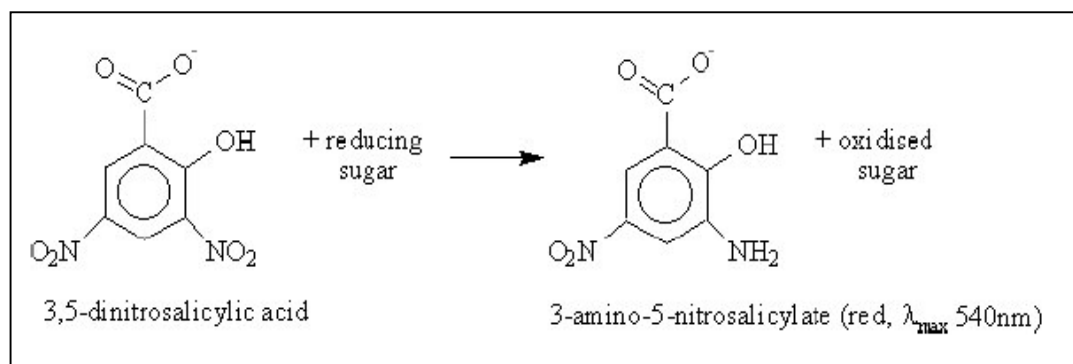
La recherche de l'activité enzymatique cellulase de la souche actinobactérienne BHZ59 est évaluée qualitativement sur un milieu solide contenant la CMC (Carboxymethylcellulose) comme unique source de carbone et d'énergie à 1 %, en utilisant la méthode des cylindres d'agar. Le pH du milieu de culture est ajusté à une valeur de 7.2. La composition du milieu (g/L) : CMC 10 ; NaNO<sub>3</sub> 1.2 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.2 ; CaCl<sub>2</sub> 0.05 ; MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.01 ; extrait de levure 0.5 et agar 20 (EL-naggar *et al.*, 2011). Après incubation des boîtes à 30°C pendant 5 jours, la détection de l'activité enzymatique cellulase est effectuée par l'utilisation d'une solution de rouge de Congo à 0.1%, pendant 20 minutes. Après ce temps, l'excès du colorant est éliminé suivi par un rinçage avec une solution de NaCl à 1M pendant 15 minutes (EL-naggar *et al.*, 2011). L'apparition d'un halo clair autour des cylindres correspond à la zone d'hydrolyse de la CMC par les enzymes cellulases secrétées par la souche testée.

### **2.4 . Production de cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59 en fermentation submergée**

La production des cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59 est effectuée en fermentation submergée à base de nombreux déchets agro-industriels qui sont très riches en cellulose comme unique source de carbone. Pour ce faire, Quatre substrats à une concentration de 2.5 % (m/v) ont été choisis à savoir : paille de blé, son de blé, coques d'arachide et écorces d'oranges. Le milieu liquide de production utilisé est ajusté à une valeur de pH 7.2, puis réparti dans des flacons d'une contenance de 200 mL à raison de 50 mL par flacon. Ces flacons sont inoculés à raison de deux disques d'agar de 6 mm de diamètre puis sont incubées dans un incubateur-agitateur à 30°C/200 rpm pendant 6 jours. Après incubation, Les cultures sont centrifugées à 8000 g pendant 20 minutes à 4 °C afin d'obtenir l'extrait brut et mesurer l'activité enzymatique cellulase.

### 2.4.1. Mesure de l'activité cellulase

L'activité cellulase est déterminée par spectrophotomètre selon la méthode décrite par **Miller (1959)** qui consiste à doser les sucres réducteurs en utilisant l'acide dinitrosalicylique (DNS). En effet, l'hydrolyse de la CMC par l'action des enzymes cellulases provoque l'apparition de sucres réducteurs qui réduisent l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5- DNS) de coloration jaune orangée en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de coloration rouge orangée, mesurable au spectrophotomètre à 540nm (**figure 6**).



**Figure 6 :** La réduction de DNS dans un milieu alcalin à 100°C (**Thongprajukaew et Hayee, 2014**).

Le mélange réactionnel est composé de 900  $\mu\text{L}$  d'une solution de CMC à 1 % (m/v) préparée dans un tampon citrate de sodium 50 mM à pH 6 et auquel sont ajoutés 100  $\mu\text{L}$  de surnageant de culture. Ce mélange est incubé à 50° C pendant 5 min. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 1,5 ml d'une solution à base de DNS (**Annexe II**), puis le mélange est porté à ébullition pendant 5 minutes, suivi par un refroidissement immédiat dans de la glace pendant 5 minutes (**Tuncer et al., 1999**). La lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde de 540 nm. L'activité enzymatique est calculée par référence à la courbe d'étalonnage où les valeurs d'absorption mesurées sont converties en équivalent glucose.

L'étalon de référence est effectué avec une solution de glucose à des concentrations respectives de 0 ; 0,3 ; 0,6 ; 0,9 ; 1,2 et 1,5 mg/mL (**Bailey et al., 1992**) (**tableau 1**).

A partir de chaque concentration, on prélève 100  $\mu\text{L}$ , auquel on rajoute 900 $\mu\text{L}$  de solution de CMC à 1 % et 1,5 ml de la solution de DNS, le chauffage est réalisé à 100°C pendant 5 minutes puis les tubes sont refroidis pour effectuer les lectures d'absorbances à 540 nm.

Le témoin correspond à la solution de CMC (900 µL) incubée sans l'extrait brut à 50°C pendant 5 min, puis on ajoute 1.5 ml de DNS et 100 µL de l'extrait brut déjà traité par la chaleur pendant 2 heures afin d'inactiver l'enzyme .

**Tableau 1:** Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs (Bailey et al., 1992).

| Tube                             | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6    |
|----------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|------|
| CMC à 1.5 mg/mL (µL)             | 0    | 200 | 400 | 600 | 800 | 1000 |
| Tampon citrate pH6 (µL)          | 1000 | 800 | 600 | 400 | 200 | 0    |
| Concentration du glucose (mg/mL) | 0    | 0.3 | 0.6 | 0.9 | 1.2 | 1.5  |

L'activité enzymatique est exprimée en unité internationale par mL d'extrait enzymatique où une unité de l'activité cellulase est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent de glucose par minute. Dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus.

L'activité cellulase est calculée d'après la relation rapportée par Bailey et al (1992) :

$$\text{Activité enzymatique (U/mL)} = P.V.10^3/X.V_e$$

P : vitesse de production d'équivalent glucose en g/L/min.

V : volume réactionnel de la cinétique enzymatique en mL.

Ve : volume enzymatique utilisé en mL.

X : 180 g/mol (Masse molaire de glucose).

## 2.4.2 Détermination des paramètres affectant la production de cellulases par le plan

### d'expériences Plackett-Burman

Dans le but d'avoir une production maximale des cellulases, nous avons procédé à l'optimisation des paramètres de culture en appliquant le plan factoriel de Plackett-Burman (Plackett et Burman, 1946) afin d'identifier les facteurs significativement influençant la production des cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59. La matrice de ce plan a été générée par onze paramètres cultureux indépendants suivant : la concentration des écorces d'orange, la concentration du nitrate de sodium (NaNO<sub>3</sub>), la concentration de l'extrait de levure,

la concentration du phosphate de potassium monobasique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), la concentration du phosphate de potassium dibasique ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), la concentration du sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ) la concentration du chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ), la concentration du sulfate de manganèse ( $\text{MnSO}_4$ ), le pH, le taux d'inoculation et le temps d'incubation. L'espace expérimental opéré au niveau supérieur et inférieur de chaque facteur, est résumé dans le **tableau 2**.

Le traitement de la matrice est effectué à l'aide du logiciel statistique Design Expert® Version 22.0.6.0, Statease, Minneapolis, MN, USA, dont l'analyse statistique consiste à sélectionner les variables qui ont un effet significatif sur la production de cellulases.

La moyenne de l'activité enzymatique cellulase est considérée comme la réponse expérimentale exprimée en U/mL. .

**Tableau 2:** Les paramètres cultureux indépendants criblés par le plan de Plackett-Burman et leurs niveaux attribués

| Code | Paramètres                           | Unité   | Niveau Bas<br>(-1) | Niveau Moyen<br>(0) | Niveau Haut<br>(+1) |
|------|--------------------------------------|---------|--------------------|---------------------|---------------------|
| A    | Ecorces d'orange                     | g/L     | 15                 | 25                  | 35                  |
| B    | $\text{NaNO}_3$                      | g/L     | 0.2                | 1.2                 | 2.2                 |
| C    | Extrait de levure                    | g/L     | 0                  | 0.5                 | 1                   |
| D    | $\text{KH}_2\text{PO}_4$             | g/L     | 1                  | 2                   | 3                   |
| E    | $\text{K}_2\text{HPO}_4$             | g/L     | 2                  | 4                   | 6                   |
| F    | $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | g/L     | 0.2                | 1.1                 | 2                   |
| G    | $\text{CaCl}_2$                      | g/L     | 0                  | 0.5                 | 1                   |
| H    | $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | g/L     | 0                  | 0.01                | 0.02                |
| J    | pH                                   |         | 5                  | 7                   | 9                   |
| K    | Taux d'inoculation                   | Disques | 1                  | 2                   | 3                   |
| L    | Temps d'incubation                   | Jours   | 3                  | 6                   | 9                   |

Le modèle polynomial du premier ordre a été utilisé pour analyser les réponses expérimentales à l'aide de l'équation du premier degré (Eq.1) ci-dessous :

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i$$

$y$  : réponse expérimentale

$\beta_0$ : constante

$\beta_i$  : coefficient de régression de la variable explicative

$X_i$  : variable explicative

## **2.5 Caractérisation de cellulases brutes produites par la souche actinobactérienne BHZ59**

### **2.5.1. Détermination du pH optimum et de la stabilité**

L'influence du pH sur l'activité des cellulases brutes est déterminée par incubation d'un mélange réactionnel composé à des pH variant de 3 à 10, en utilisant trois différents tampons à 50mM à savoir Le tampon citrate pour les pH de 3 à 6, le tampon phosphate pour les pH de 7 à 8 et le tampon Tris-HCl pour les pH de 8 à 10. La stabilité vis-à-vis du pH est évaluée par pré-incubation des cellulases brutes à différents pH (3-10) pendant 3 et 6h.

L'activité enzymatique résiduelle (relative) est calculée en pourcentage par rapport à l'activité initiale, dans les conditions optimales de température et de pH de l'enzyme.

### **2.5.2. Détermination de la température optimale et de la thermostabilité**

L'étude de l'effet de la température sur l'activité enzymatique est effectuée en testant différentes valeurs de température allant de 40°C à 90°C. La thermostabilité a été également étudiée en incubant l'enzyme à différentes températures (60-80°C) pendant 2h. Des aliquotes sont prélevées à des intervalles déterminés (30 min) et refroidies sur de la glace avant d'être utilisées pour déterminer l'activité enzymatique résiduelle dans des conditions optimales. L'enzyme non-traitée est considérée comme témoin (100%).

## ***Résultats et discussion***

## 1. Caractérisation et identification de la souche actinobactérienne BHZ59

### 1.1. Caractérisation morphologique

Les résultats concernant la description des caractères macromorphologiques de la souche actinobactérienne BHZ59 sur les différents milieux utilisés à savoir: la croissance, les pigments diffusibles ainsi que la couleur de mycéliums aériens et du substrat sont résumés dans le **tableau 3**.

**Tableau 3:** Les propriétés macromorphologiques de la souche actinobactérienne BHZ59 sur différents

| Milieu de culture | Croissance | Mycélium aérien | Mycélium du substrat | Pigments diffusibles |
|-------------------|------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| ISP2              | ++++       | Gris            | Marron               | -                    |
| ISP3              | ++++       | Gris            | Vert                 | -                    |
| ISP4              | ++         | Gris            | Beige                | -                    |
| Gausse            | ++++       | Gris            | Vert                 | Vert foncé           |

milieux.

La souche actinobactérienne BHZ59 utilisée dans ce travail, ensemencée sur différents milieux, a donné lieu à des colonies circulaires de 5 mm de diamètre d'aspect poudreux et a montré une bonne croissance sur les milieux ISP2, ISP3 et Gausse en développant un mycélium aérien abondant. Cependant, la croissance était moyenne sur le milieu ISP4.

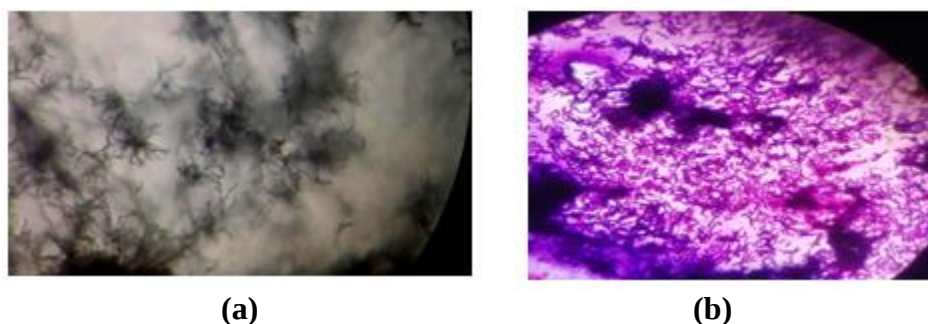


**Figure 7 :** Aspect de la souche actinobactérienne BHZ59 sur le milieu Gausse.

Le mycélium aérien produit est bien développé et de couleur grise (**figure7**) tandis que celui du substrat varie entre beige, marron et vert selon le milieu utilisé. La production de pigments diffusibles est observée sur le milieu Gausse dont la teinte est du vert foncé. Selon **Kampfer, (2006)**, la production des pigments dépend généralement de la composition du milieu et des conditions de culture.

L'observation au microscope optique de la souche actinobactérienne BHZ59 après 7 jours d'incubation à 30°C, révèle que cette souche est une bactérie filamenteuse à Gram positive. Les filaments du mycélium aérien sont très fins, ramifiés et enchevêtrés plus au moins longs.

La **figure 8** suivante représente le mycélium aérien de la souche actinobactérienne BHZ59 observé au microscope optique (Optika) au grossissement 100 x 40.



**Figure 8:** Observation microscopique optique de la souche BHZ59 après 7 jours d'incubation à 30°C (G×40 et ×100). a : état frais ; b : après coloration de Gram

En se basant sur les propriétés morphologiques de la souche utilisée dans cette étude, il a été difficile de la rattacher au genre d'actinobactérie approprié et uniquement le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S qui permettra de statuer définitivement l'appartenance de la souche actinobactérienne BHZ59 au genre précis.

## **1.2. Caractérisation moléculaire**

L'identification moléculaire des souches par séquençage du gène codant pour l'ARN16S, appelé l'étalon-or, est actuellement la technique d'identification la plus fiable et incontournable pour la détermination précise des espèces bactériennes. Dans cette étude, la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche actinobactérienne BHZ59 est analysée par les serveurs suivants MEGA7 puis comparée avec les séquences des espèces-types des bactéries contenues dans la base de données EMBL, EzBioCloud et BlastN.

Les résultats obtenus révèlent un taux d'homologie allant de 90.37 à 90.56 % avec les séquences nucléotidiques des gènes codant pour l'ARN 16S de 14 souches bactériennes du genre *Streptomyces* (**Tableau 4**) où le pourcentage de similarité le plus élevé (90.56%) est obtenu avec les espèces *Streptomyces globisporus* NBRC 12867<sup>T</sup> et *Streptomyces fulvorobeus* NBRC 15897<sup>T</sup>.

**Tableau 4:** les espèces types les plus proches de la souche actinobactérienne BHZ59 et leurs degrés de similitude.

| Description                                                    | Numéro d'accèsion            | % de similarité |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------|
| <i>Streptomyces globisporus</i> NBRC 12867 <sup>T</sup>        | <a href="#">AB184203</a>     | 90,56           |
| <i>Streptomyces fulvorobeus</i> NBRC 15897 <sup>T</sup>        | <a href="#">AB184711</a>     | 90,56           |
| <i>Streptomyces microflavus</i> NBRC 13062 <sup>T</sup>        | <a href="#">AB184284</a>     | 90,46           |
| <i>Streptomyces setonii</i> NRRL ISP-5322 <sup>T</sup>         | <a href="#">MUNB01000146</a> | 90,46           |
| <i>Streptomyces anulatus</i> NRRL B-2000 <sup>T</sup>          | <a href="#">DQ026637</a>     | 90,46           |
| <i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567 <sup>T</sup>            | <a href="#">AY999783</a>     | 90,46           |
| <i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> NRRL B-2570 <sup>T</sup>    | <a href="#">JOEM01000050</a> | 90,46           |
| <i>Kitasatospora papulosa</i> NRRL B-16504 <sup>T</sup>        | <a href="#">JNYQ01000038</a> | 90,46           |
| <i>Streptomyces parvus</i> NBRC 3388 <sup>T</sup>              | <a href="#">AB184756</a>     | 90,46           |
| <i>Streptomyces pluricoloescens</i> NBRC 12808 <sup>T</sup>    | <a href="#">AB184162</a>     | 90,46           |
| <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> NBRC 12912 <sup>T</sup> | <a href="#">AB184240</a>     | 90,46           |
| <i>Streptomyces sindenensis</i> NBRC 3399 <sup>T</sup>         | <a href="#">AB184759</a>     | 90,44           |
| <i>Streptomyces spiroverticillatus</i> NBRC 12821 <sup>T</sup> | <a href="#">AB249921</a>     | 90,37           |
| <i>Streptomyces cremeus</i> NBRC 12760 <sup>T</sup>            | <a href="#">AB184124</a>     | 90,37           |

**Tableau 5:** Seuils de similarité de séquence du gène de l'ARNr 16S pour les rangs taxonomiques majeurs (Stackebrandt and Ebers 2006).

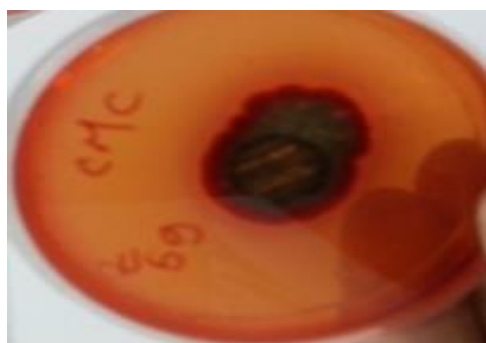
| Rang    | Seuil | Minimum (%)       | Médiane (%)       |
|---------|-------|-------------------|-------------------|
| Espèces | 98.7  | 98.7              | NA                |
| Genre   | 94.5  | 94.8 (94.5, 95.1) | 96.4 (96.2, 96.6) |
| Famille | 86.5  | 87.7 (86.8, 88.4) | 92.3 (91.7, 92.9) |
| Ordre   | 82    | 83.6 (82.3, 84.8) | 89.2 (88.3, 90.1) |
| Classe  | 78.5  | 80.4 (78.6, 82.5) | 86.4 (84.7, 88.0) |
| Phylum  | 75    | 77.5 (75.0; 79.9) | 83.7 (81.6, 86.0) |

Le **tableau 5** ci-dessous montre les seuils de similarité de séquence du gène de l'ARNr 16S pour les rangs taxonomiques majeurs. L'intervalle de confiance est indiqué entre parenthèses. Le seuil de qualification de l'espèce a été déterminé par **Stackebrandt et Ebers (2006)**.

D'après **Stackebrandt et Ebers (2006)**, si deux bactéries présentent des séquences du gène de l'ARNr 16S ayant une similarité inférieure à 98.7% alors elles ne peuvent être dans la même espèce et il n'est pas nécessaire de réaliser une hybridation ADN-ADN. Les données rapportées dans le **tableau 4** permettent de conclure que la souche actinobactérienne BHZ59 représente un nouveau genre d'actinobactérie ayant un pourcentage de similarité inférieur à 94.5%.

## **2. Détection de l'activité cellulase**

La souche actinobactérienne BHZ59 est examinée pour sa capacité à produire des cellulases sur le milieu solide sélectif à base de CMC comme substrat spécifique. Après 5 jours d'incubation à 30°C, la souche d'actinobactérie a montré une croissance par l'apparition d'un halo clair au tour des colonies (**Figure 9**). Cette observation prouve que la souche actinobactérienne BHZ59 est active sur son substrat par la sécrétion d'une quantité de cellulases proportionnelle au diamètre de la zone d'hydrolyse dans le milieu.



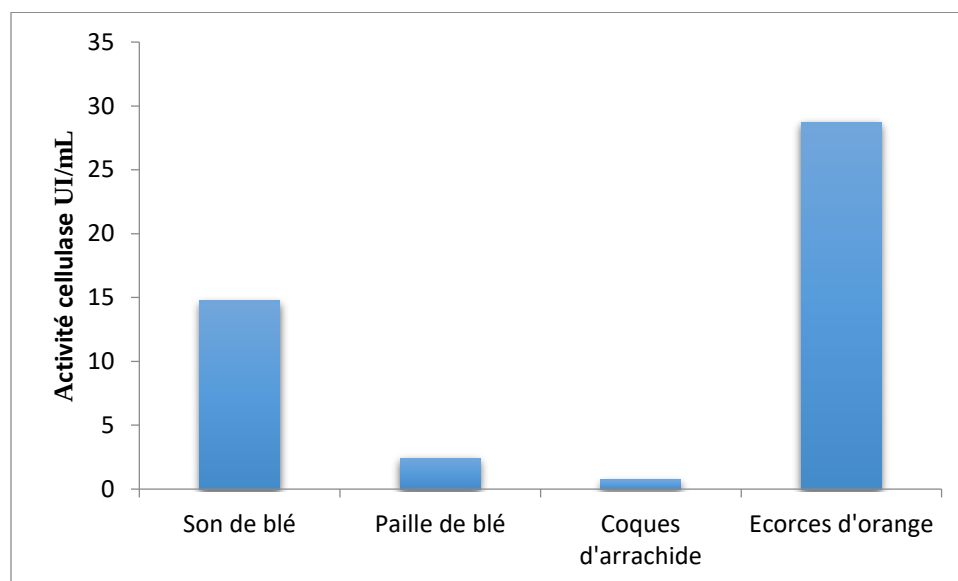
**Figure 9 :** Mise en évidence de l'activité cellulase de la souche actinobactérienne BHZ59 sur milieu solide à base de CMC.

La souche actinobactérienne BHZ59 est isolée à partir des sols forestiers qui représentent un réservoir d'actinobactéries capables de dégrader la matière organique par utilisation d'hydrolases (lipases, chitinases, xylanases, cellulases, protéases, polysaccharidases et d'autres enzymes) pour donner des unités simples assurant le métabolisme de ces microorganismes et également jouent un rôle capital dans la fertilisation des sols (**Li et al., 2017, Meruvu et Meruvu, 2019 ; de Albuquerque et al., 2020, Sharma et al., 2021**).

### 3. Production d'enzymes cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59 en fermentation submergée

Le développement d'un procédé de production des cellulases basé sur les déchets agro-industriels comme source de carbone est très attrayant car ces substrats naturels sont bon marché et facilement disponibles. La production d'enzymes cellulases par fermentation submergée est testée en utilisant quatre substrats agro-industriels (son de blé, paille de blé, coques d'arachide et écorces d'orange) comme unique source de carbone et d'énergie. Les résultats de production d'enzymes cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59 sont illustrés dans la **figure 10**.

Les résultats obtenus montrent la capacité de la souche actinobactérienne BHZ59 à utiliser les substrats comme seule source de carbone et induire la production des quantités variables d'enzymes cellulases.



**Figure 10:** Production de cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59 en fermentation submergée sur quatre substrats lignocellulosiques.

Les résultats illustrés dans la **figure 10** montrent qu'une meilleure production de cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59 est observée dans les cultures contenant des écorces d'orange (28,74UI/mL) et du son de blé (14,73 UI/mL) comme substrats après 6 jours d'incubation

à 30°C. Une très faible activité est obtenue avec la paille blé (2,42 UI/mL) et les coques d'arachide (0,72 UI/mL).

Plusieurs travaux dans la littérature ont rapportés l'utilisation des déchets agro-industriels tels que les écorces des agrumes comme substrat bien étudié pour la production d'enzymes cellulases (Li et al., 2016, Sengar et al., 2020 ; Shariq et Sohail, 2019).

Ces résultats ont permis donc de choisir les écorces d'orange comme source de carbone pour la production des cellulases chez la souche actinobactérienne BHZ59.

#### 4. . Optimisation de la production de cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59 par le plan Plackett-Burman

L'effet de onze facteurs potentiellement importants exprimant les composants du milieu à base d'écorces d'orange sur l'activité cellulase de la souche actinobactérienne BHZ59, est évalué suivant une étape de criblage statistique, en utilisant un plan factoriel de type Plackett–Burman. L'ensemble des réponses des différents essais expérimentaux de la matrice statistique de Plackett-Burman sont consignés dans le **Tableau 6**.

**Tableau 6:** Matrice de Plackett-Burman et les niveaux de production de cellulases.

| ordre | Run | A   | B   | C    | D   | E   | F    | G   | H    | J  | K       | L     | Activité<br>Cellulase |
|-------|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|------|----|---------|-------|-----------------------|
|       |     | g/L | g/L | mg/L | g/L | g/L | mg/L | g/L | mg/L |    | Disques | Jours | U/mL                  |
| 11    | 1   | +1  | -1  | +1   | +   | +1  | -1   | -1  | -1   | +1 | -1      | +1    | 116,52                |
| 5     | 2   | -1  | -1  | +1   | -1  | +1  | +1   | -1  | +1   | +1 | +1      | -1    | 12,87                 |
| 15    | 3   | 0   | 0   | 0    | 0   | 0   | 0    | 0   | 0    | 0  | 0       | 0     | 5,57                  |
| 2     | 4   | -1  | +1  | +1   | -1  | +1  | +1   | +1  | -1   | -1 | -1      | +1    | 35,36                 |
| 8     | 5   | +1  | +1  | -1   | -1  | -1  | +1   | -1  | +1   | +1 | -1      | +1    | 123,11                |
| 6     | 6   | -1  | -1  | -1   | +   | -1  | +1   | +1  | -1   | +1 | +1      | +1    | 40,86                 |
| 10    | 7   | -1  | +1  | +    | +   | -1  | -1   | -1  | +1   | -1 | +1      | +1    | 41,25                 |
| 3     | 8   | +1  | -1  | +1   | +1  | -1  | +1   | +1  | +1   | -1 | -1      | -1    | 18,34                 |
| 13    | 9   | 0   | 0   | 0    | 0   | 0   | 0    | 0   | 0    | 0  | 0       | 0     | 2,52                  |
| 7     | 10  | +1  | -1  | -1   | -1  | +1  | -1   | +1  | +1   | -1 | +1      | +1    | 100,71                |
| 14    | 11  | 0   | 0   | 0    | 0   | 0   | 0    | 0   | 0    | 0  | 0       | 0     | 7,97                  |
| 12    | 12  | -1  | -1  | -1   | -1  | -1  | -1   | -1  | -1   | -1 | -1      | -1    | 11,15                 |

|   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|
| 9 | 13 | +1 | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | 33,88 |
| 1 | 14 | +1 | +1 | -1 | +1 | +  | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | 37,9  |
| 4 | 15 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | -1 | 8,07  |

L'examen du **tableau 6** indique que les réponses obtenues en termes d'activité cellulases, estimées par la méthode de DNS varient de 2.52 (essai 9) à 123,11 UI/mL (essai 5). Ce qui montre l'importance de cette étape dans la sélection des facteurs les plus influents.

Ces résultats sont aussi présentés dans la **figure11** de la charte de Pareto où les paramètres sont organisés dans l'ordre décroissant de leur effet significatif sur la production des cellulases dont les barres en orange de la charte de Pareto présentent les paramètres à effet positive et les barres en bleu présentent les paramètres à effet négatif.

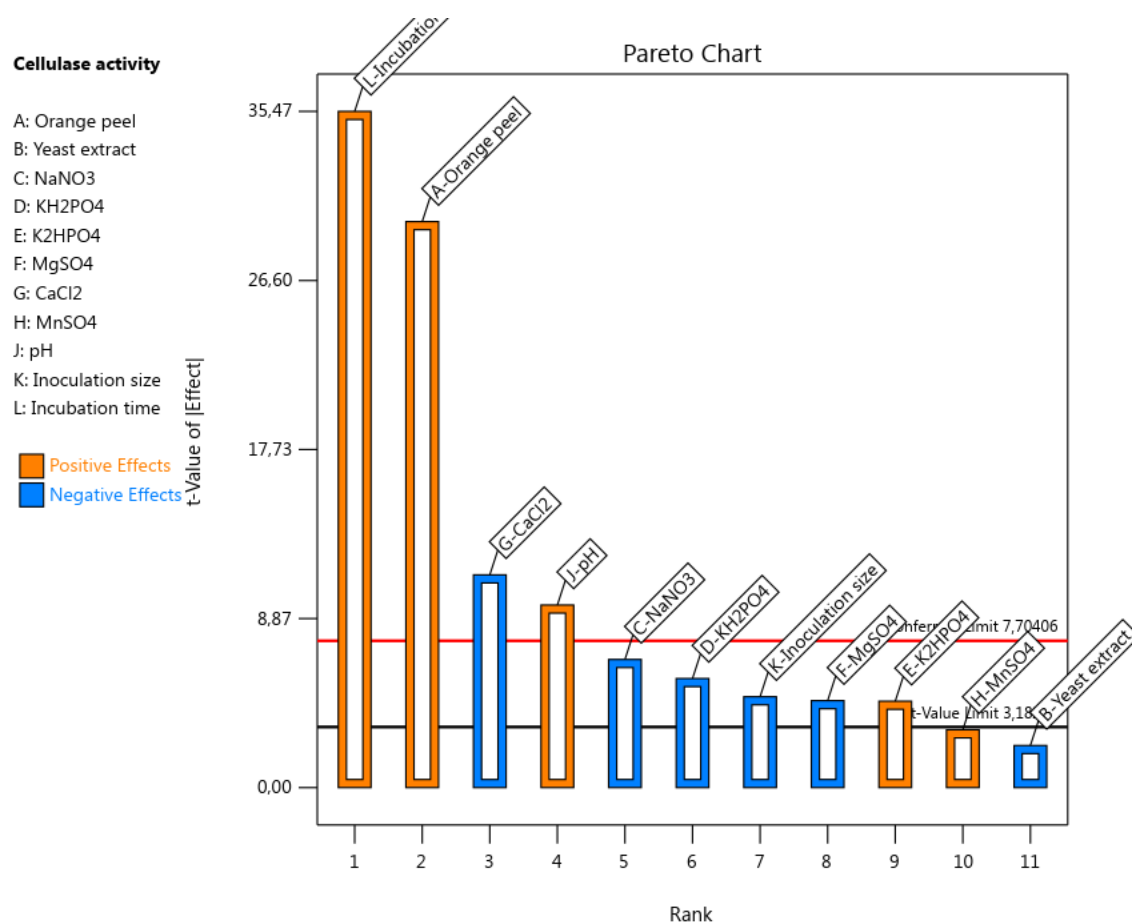
**Tableau 7:** L'analyse de la variance (ANOVA) du modèle proposé pour la production des cellulases par la souche actinobactérienne BHZ59.

| Source                             | Somme des carrés | Df | Moyen carré | F-value | p-value             |
|------------------------------------|------------------|----|-------------|---------|---------------------|
| <b>Model</b>                       | 18737,36         | 11 | 1703,40     | 228,31  | 0,0044 Significatif |
| A- Ecorces d'Orange                | 6575,40          | 1  | 6575,40     | 881,32  | 0,0011              |
| B- Extrait de levure               | 36,33            | 1  | 36,33       | 4,87    | 0,1581              |
| C- NaNO <sub>3</sub>               | 336,87           | 1  | 336,87      | 45,15   | 0,0214              |
| D- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 244,26           | 1  | 244,26      | 32,74   | 0,0292              |
| E- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 152,94           | 1  | 152,94      | 20,50   | 0,0455              |
| F- MgSO <sub>4</sub>               | 155,09           | 1  | 155,09      | 20,79   | 0,0449              |
| G- CaCl <sub>2</sub>               | 928,93           | 1  | 928,93      | 124,51  | 0,0079              |
| H- MnSO <sub>4</sub>               | 68,55            | 1  | 68,55       | 9,19    | 0,0938              |
| I- pH                              | 684,03           | 1  | 684,03      | 91,68   | 0,0107              |
| J- taux d'inoculation              | 169,35           | 1  | 169,35      | 22,70   | 0,0413              |
| K- temps d'incubation              | 9385,61          | 1  | 9385,61     | 1257,98 | 0,0008              |
| Curvature                          | 33,82            | 1  | 4433,82     | 594,28  | 0,0017              |
| <b>Erreur pure</b>                 | 14,92            | 2  | 7,46        |         |                     |
| <b>Total</b>                       | 23186,09         | 14 |             |         |                     |

L'effet significatif de chaque facteur étudié sur la réponse en termes d'activité cellulase (**tableau 7**), est vérifié par la probabilité de signification ( $P \leq 0,05$ ), où les valeurs inférieures à 0,05 indiquent une signification. Les résultats de l'analyse de variance (ANOVA) montrent que parmi les

onze facteurs testés par le plan de criblage seul neuf facteurs (L, A, G, J, C, D, K, F et E) ont une influence significative au niveau de probabilité  $P \leq 0,05$  (Tableau 7 et la figure 11). Ces résultats montrent aussi que parmi ces facteurs sélectionnés trois facteurs tels que le temps d'incubation, la concentration des écorces d'orange et le pH, exercent un effet significatif positif très élevé sur la production enzymatique, tandis que, la concentration du chlorure de calcium présente un effet significatif négatif très élevé sur la production des cellulases.

La valeur « F- valeur » estimée à 228.31 implique que le modèle est statistiquement significatif (p-valeur =0,0044) et suggère que la production de cellulase pourrait être bien décrite avec ce modèle.



**Figure 11:** Charte de Pareto des effets des variables testées.

L'analyse statistique indique une valeur du coefficient de détermination de  $R^2 = 0.9992$  % pour ce modèle (**Tableau 8**). Cela signifie que 99.92 % de la production des cellulases sont expliqués par ce modèle et que 0.08 % restent par conséquent inexpliqués. En effet plus le coefficient de détermination  $R^2$  s'approche de 1, plus le modèle est meilleur. Davantage, un coefficient de variation faible (CV = 6.87%) prouve la précision et la fiabilité des expériences (**Sathishkumar et al., 2013**).

**Tableau 8:** Valeurs du coefficient de détermination  $R^2$ .

|                  |       |                                |         |
|------------------|-------|--------------------------------|---------|
| <b>Std. Dev.</b> | 2,73  | <b><math>R^2</math></b>        | 0,9992  |
| <b>Mean</b>      | 39,74 | <b><math>R^2</math> ajusté</b> | 0,9948  |
| <b>C.V. %</b>    | 6,87  | <b>Adeq Precision</b>          | 46,3090 |

Les résultats obtenus sont en désaccord avec divers travaux scientifiques indiquant que le  $\text{CaCl}_2$  et l'extrait de levure présentent un effet significatif positif et qui sont nécessaires pour l'induction de la production de cellulases, tandis que, le pH présente un effet significatif négatif (**Annamalai et al., 2013, Thakkar et Saraf, 2014 et Shajahan et al., 2016**).

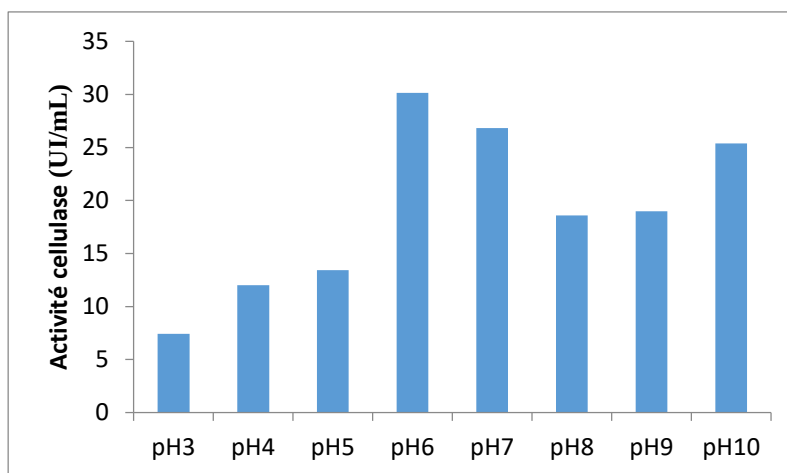
Par ailleurs, le niveau des facteurs significatifs avec un effet positif pourraient être ultérieurement optimisé par RSM en utilisant le plan de Box-Behnken, les variables à effet positif sur l'activité (Temps d'incubation, la concentration des écorces d'orange et le pH) seront maintenues constantes à un niveau supérieur (+) alors que les variables ayant un effet négatif sur l'activité ( $\text{CaCl}_2$ ) seront maintenues à leurs niveau inférieur (-).

## 5. Caractérisation de cellulases produites par la souche actinobactérienne BHZ59 dans le surnageant brut

### 5.1 Effet du pH sur l'activité et la stabilité

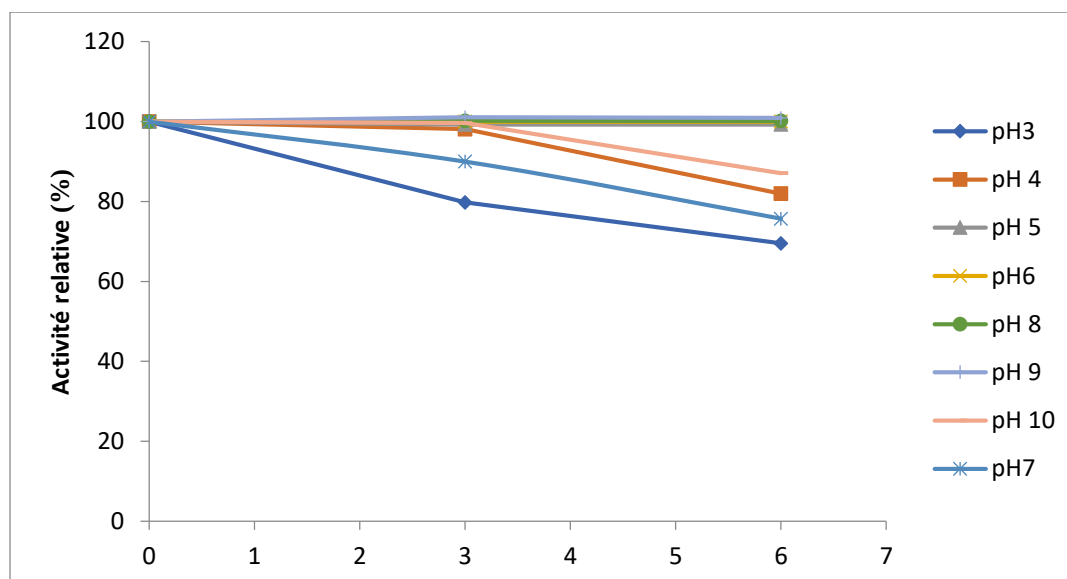
L'étude de l'effet du pH sur l'activité montre que les cellulases brutes produites par la souche actinobactérienne BHZ59 sont actives sur une large gamme du pH variant de 3-10 (**Figure12**) ce qui est très intéressant sur le plan biotechnologique. L'examen de la courbe indique que l'activité cellulase maximale de 30.14 UI/mL est obtenue à pH 6 (pH optimal). Les résultats montrent que l'enzyme cellulase présente une activité considérable dans des niveaux de pH compris entre 6 à

10, ce qui est très intéressant notamment dans le domaine de la détergence utilisant souvent la soude dans la composition des détergents commerciaux.



**Figure 12:** Effet de la variation du pH sur l'activité cellulase.

Ces résultats sont similaires à la plupart des études réalisés où l'activité optimale est, fréquemment, obtenue à un pH neutre. De ce fait, on peut citer les cellulases produites par souches *Streptomyces* sp. B-PNG23 (**Bettache et al., 2013**) *Bacillus halodurans* IND1 (**Vijayaraghavan et al., 2016**), *Bacillus subtilis* CBS31 (**Regmi et al., 2020**) et *Bacillus equilensis* (**Malik et Javed, 2024**). Cependant, les cellulases de la souche *Aspergillus flavus* ont montré une activité optimale à pH10 (**Bano et al., 2019**).

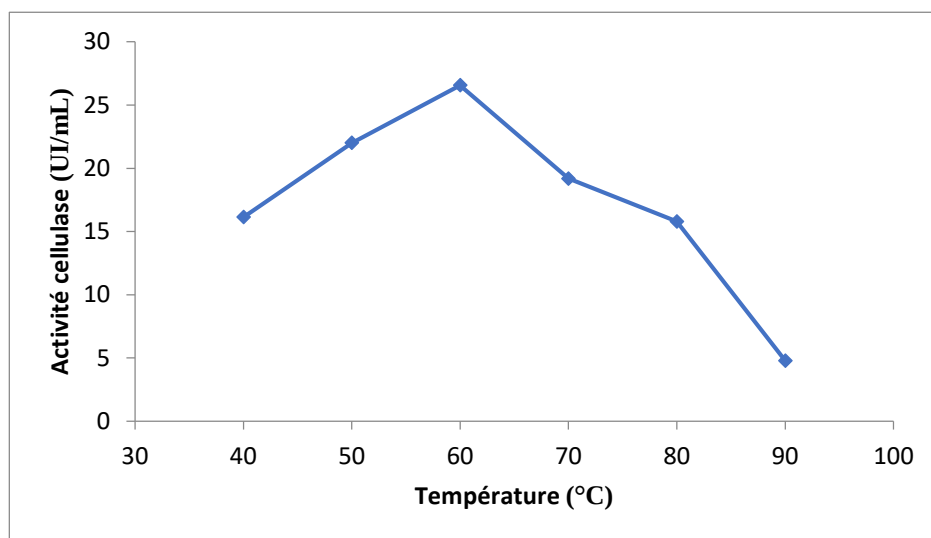


**Figure 13:** L'activité relative des cellulases produites par la souche actinobactérienne BHZ59 à différents pH.

L'étude de la stabilité des cellulases vis-à-vis du pH est testée aux différents pH pendant 6 h, dans les conditions optimales de température et de pH de l'enzyme. Selon les résultats illustrés par la courbe dans la **figure 13**, les cellulases brutes de la souche étudiée sont très stables sur les pH alcalins par rapport aux pH acides et gardent environ 70% de leur activité initiale à pH 3 pendant 6h d'incubation, ce qui est considérable et un succès pour l'industrie. Ces résultats obtenus sont similaires avec ceux rapportés chez *Bacillus circulans* (Hakamada et al., 2002), et *Bacillus sphaericus* (Singh et al., 2004).

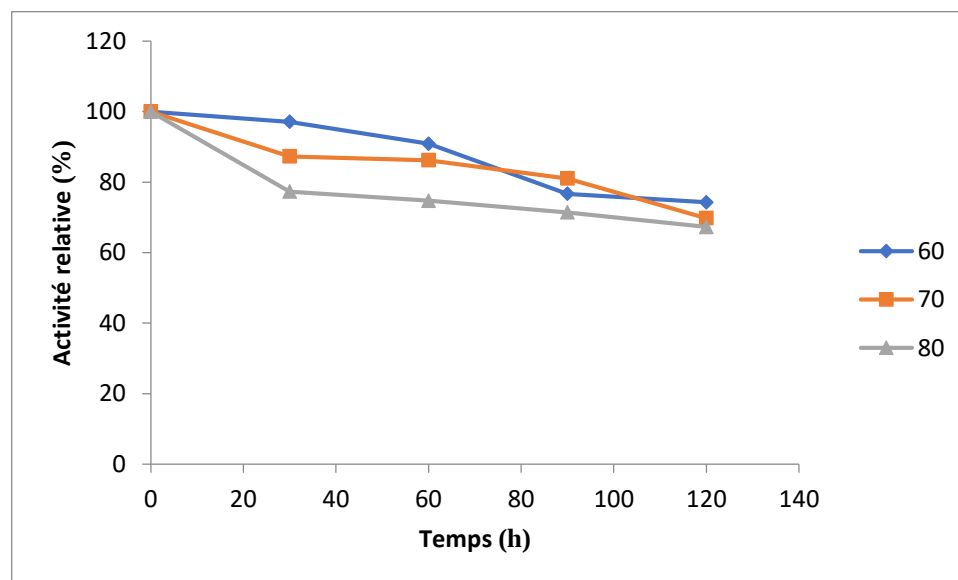
## 5.2. Effet de la température sur l'activité et la thermostabilité

Concernant l'étude de l'effet de la température sur l'activité cellulase, l'examen des résultats de la **figure 14** montrent que les cellulases brutes se sont révélées actives aux différentes températures appliquées avec une activité optimale à 60 °C (26.56 UI/mL). Cette température optimale rapportée est en parfait accord avec la majorité des cellulases caractérisées (Ko et al., 2010, Asha et al., 2012, Kim et Ku, 2018, Bano et al., 2019, Elsababty et al., 2022, Doan et al., 2024). En revanche, Esther Nkechi et al. (2024) ont rapporté que les cellulases de la souche *Fusarium Graminearum* montrent une température optimale de 70 °C.



**Figure 14:** Effet de la température sur l'activité des cellulases

Les expériences de la thermostabilité révèlent que les cellulases de la souche actinobactérienne exhibent une grande stabilité sur la gamme de température testée. Elles conservent plus de 60 % de leur activité initiale pendant 2h à 80°C (**figure15**). La thermostabilité de nos cellulases est meilleure que celle décrit par **Shyaula et al. (2023)** dont les cellulases de *Bacillus licheniformis* conservent 67% de leur activité jusqu'à 1h à 55 °C et environ 35 % après 1h d'incubation à 75 °C. **Bettache et al. (2013)** ont rapportés que les cellulases produites par la souche *Streptomyces* sp. B-PNG23 sont stables à 50°C, avec un temps de demi-vie de 6h.



**Figure 15:** Thermostabilité des cellulases produites par la souche actinobactérienne BHZ59.

Les différentes propriétés exhibées par les cellulases de la souche étudiée sont prometteuses et comparables à d'autres résultats d'où la possibilité d'utiliser ces enzymes dans divers domaines tels que : la papeterie, l'alimentation animale et la détergence.

# ***Conclusion***

## **Conclusion**

Ce travail avait pour principal objectif la caractérisation et l'optimisation de la production des cellulases par une souche d'actinobactérie désignée BHZ59, isolée à partir du sol forestier, en utilisant la méthode des plans d'expériences.

L'analyse moléculaire basée sur le gène de l'ARNr 16S et l'étude morphologique permettent de conclure que la souche actinobactérienne BHZ59 représente un nouveau genre d'actinobactérie ayant un pourcentage de similarité inférieur à 94.5% avec les 14 espèces les plus proches.

Le test qualitatif de l'activité cellulase sur milieu solide révèle la capacité de la souche actinobactérienne à utiliser le substrat CMC comme unique source de carbone et d'énergie en sécrétant une quantité de cellulases proportionnelle au diamètre de la zone d'hydrolyse dans le milieu du criblage.

L'utilisation des écorces d'orange, résidus agro-industriels bon marché, comme seule source de carbone en fermentation submergée induit la plus forte production de cellulases (28,74UI/mL) avec une concentration de 2.5%.

L'analyse statistique des résultats de l'optimisation en utilisant le plan de Plackett et Burman, a permis d'identifier trois facteurs exerçant un effet significatif positif très élevé sur la production enzymatique tels que le temps d'incubation, la concentration des écorces d'orange et le pH, tandis que, la concentration du chlorure de calcium présentant un effet significatif négatif très élevé sur la production des cellulases.

La caractérisation des cellulases produites dans le surnageant brut de la souche utilisé dans cette étude, révèle que ces enzymes sont actives dans une gamme de pH testée (3-10) avec préférence aux pH alcalins et de température (40-90°C) avec un pH optimum et une température optimale de 6 et 60°C, respectivement. Les cellulases brutes sont très stables à des pH alcalins pendant 6h. Elles sont également stables dans la gamme de température de 60 à 80°C et conservent plus de 60 % de leur activité initiale pendant 2h à 80°C.

Les résultats obtenus sont intéressants et méritent d'être approfondis, et au terme de cette étude, nous avons jugé que les points suivants pouvaient faire l'objet de perspectives :

- Réaliser une étude statistique plus poussée, utilisant des logiciels qui permettent de déterminer les optima et d'évaluer les interactions entre plusieurs variantes à la fois tel que la méthode de surface réponse méthodologie (RSM).
- Purifier les cellulases afin de mieux caractériser leurs propriétés physico-chimiques et catalytiques.
- Rechercher les gènes impliqués dans l'expression de cette enzyme avec clonage, ce qui permet d'une part d'obtenir des quantifiés de cellulases et d'autre part de faciliter la purification.
- Poursuivre des études sur la souche BHZ59 en s'intéressant à autres activités enzymatiques prometteuses.

## ***Références bibliographiques***

## Références bibliographiques

### A

- Aftab, A. & Vermette, P. (2008)** Culture-based strategies to enhance cellulose enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, **40**, 399-407.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J.Mol Biol.*, **215**,403–410.
- Anderson, A.S.& Wellington, E.M.H. (2001).**The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(3):797–814
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Elayaraja, S.& Balasubramanian, T. (2013).** Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydr. Polym.*, 94 (1), 409–415.
- Asha, B.M., Revathi, M., Yadav, A.& Sakthivel, N.(2012).** Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic strain, *Paenibacillus barcinonensis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 1501–1509.

### B

- Bahouli, M.& Zidalmal, B. (2020).** Valorisation des déchets lignocellulosiques par fermentation en milieu solide pour la production de cellulases microbiennes. Mémoire de Master en Biochimie, Université des Frères Mentouri, Constantine 1.
- Bailey, M.J., Biely, P. & Poutanen K. (1992).** Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol.* 23, 257-270.
- Bano, A., Chen, X., Prasongsuk, S. Lotrakul, P., Puapayak, H., Anwar, M., Sajid, S. & Ali, I (2019).** Purification and Characterization of Cellulase from Obligate Halophilic *Aspergillus flavus* (TISTR 3637) and Its Prospects for Bioethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol* **189**, 1327–1337.
- Barbosa, F.C., Silvello, M.A . & Goldbeck, R. ( 2020.).** Cellulase and oxidative enzymes: new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production. *Biotechnology Letters*, 2020. 42(6): p. 875-884.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & Clément, C. (2016).** Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Brahmachari, G. (2016).** Biotechnology of microbial enzymes: production, biocatalysis and Industrial applications. Academic Press, 632.

**Bhat, M.K. (2000).** Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5): p. 355-383.

**Brandt, A. , Grsvik, J., Hallett, J.P.& Welton, T. (2013).** Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids'. *Green Chemistry*, 15(3), 550–583.

**Brethauer, S. & Studer, M.H. (2015).** Biochemical Conversion Processes of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals &#8211; A Review. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 69(10): p. 572-581.

## C

**Chen, H. (2014).** Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. p. 25- 71.

**Chun, J., Blackall, L.L., Kang, S., Hah, Y.C. & Goodfrllow, M. (1997).** A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. Nov., *Int. j. Syst. Bact.*, 47, 127-131.

**Ciolacu, D., F. Ciolacu, & Popa, V. ( 2011).** Amorphous cellulose - Structure and characterization. *Cellulose Chemistry and Technology*, 45: p. 13-21.

**Cosgrove, D.J. (2005).** Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11): p. 850-861.

**Couturier, M. & Berrin, J.G. (2013).**The Saccharification Step: The Main Enzymatic Components. In: *Lignocellulose Conversion*, pp. 93–110: Springer, Berlin, Heidelberg.

**Couturier, M., Bennati-Granier, C., Barbian Urio, M., Pereira Ramos, L. and Berrin, J.-G. (2016).** Fungal Enzymatic Degradation of Cellulose. In: *Green Fuels Technology*.

**Ciolacu, D., Ciolacu, F. & Popa, V. (2011.).** Amorphous cellulose - Structure and characterization. *Cellulose Chemistry and Technology*, 45: p. 13-21.

## D

**Dan., S., Marton, I., Dekel, M., Bravdo, B.A,He, S., Withers, S.G.& Shoseyov. O. (2000).**Cloning, expression, characterization and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase.*J.Biol.Chem.*275 (7).p:4973-4980.

**Davies, G. & Henrissat, B. (1995).** Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases.*Structure*, 3, 853–859.

**De Albuquerque, M.F.G., Guimaraes, V.M. & Rezende, S.T. (2020).** L' utilisation d'abeille sucre tla farine et le son de blé comme source de carbone améliorent l'efficacité de la *chrysoporthecubensis* dans la saccharification de la bagasse de canne à sucre. *Recherche en bioénergie* 1-14.

**De Vos, P., Thompson, F., Thompson, C. & Swings, J. (2017).** A Flavor of Prokaryotic Taxonomy: Systematics Revisited. In *Microbial Resources.* : Elsevier, 29-44.

**Doan, C.T., Tran, T.N., Pham, T.P., Tran, T.T.T., Truong, B.P. Nguyen, T.T., Nguyen, T.M., Bui, T.Q.H., Nguyen, A.D. & Wang, S.-L. (2024).** Production, Purification, and Characterization of a Cellulase from *Paenibacillus elgii*. *Polymers*, 16, 2037.

## E

**Edison, L. K. , Anu, S. & Pradeep, N. S. (eds.), 2022,** Microbial Beta Glucanases, Interdisciplinary Biotechnological Advances, 117-134.

**El -ahmady-El-naggar, N. & Abdelwahed, N.A.M. (2012).** Optimization of process parameters for the production of alkali-tolerant carboxymethyl cellulase by newly isolated *Streptomyces* sp .strain NEAE-D. *African Journal of Biotechnology* 11(5): 1185–1196.

**El-naggar, N.E., Sherief, A.A. & Hamza, S.S. (2011).** Bioconversion process of rice straw by thermotolerant cellulolytic *Streptomyces viridiochromogenes* under solid-state fermentation conditions for bioethanol production, *J. Biotechnol.*, 10(56), 11998-12011.

**Elsababty, Z.E., Abdel-Aziz, S.H., Ibrahim, A.M., Guirgis, A.A. & Dawwam, G.E. (2022).** Purification, biochemical characterization, and molecular cloning of cellulase from *Bacillus licheniformis* strain Z9 isolated from soil. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 20, 34.

**Esther Nkechi, E., Bukunola Oluyemisi, A., Ifabunmi Oduyemi, O., Abayomi Samson, F., Segun Babatunde, A., & Kuburat Temitope, O. (2024).** Isolation and Characterization and Some Properties of Cellulase from *Fusarium Graminearum* Isolated from Corn Cob. *African Journal of Pure and Applied Sciences*, 5(1).

## F

**Filippova, S.N. & Vinogradova, K.A. (2017).** Programmed cell death as one of the stages of streptomycete differentiation. *Microbiology* 86(4):439–454.

**Franco, J. (2008).** Planification d'expériences numériques en phase exploratoire pour la simulation des phénomènes complexes. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne).

## G

**Gilbert, H. J., Knox, J. P. & Boraston, A. B. (2013).** Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Current opinion in structural biology*, 23, 669–677.

**Goupy, J., & Creighton, L. (2006).** Introduction aux plans d'expériences—3e édition. Technique et ingénierie, série conception. L'usine nouvelle-Dunod, 179-206.

**Goupy, J. (2017).** Les plans d'expériences (5 ed.).

**Gilbert, H. J., Knox, J. P. & Boraston, A. B. (2013)** Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Current opinion in structural biology*, **23**, 669–677.

**Ciolacu, D., F. Ciolacu, & V. Popa**, Amorphous cellulose - Structure and characterization. *Cellulose Chemistry and Technology*, 2011. 45: p. 13-21.

**Goupy, J., & Creighton, L. (2006)**. Introduction aux plans d'expériences–3e édition. Technique et ingénierie, série conception. L'usine nouvelle-Dunod, 179-206.

**Goupy, J. (2017)**. Les plans d'expériences (5 ed.).

## H

**Hoinard, C., (2009)**. Les plans factoriels fractionnaires. Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Tours. 24.

**Hakamada, Y., Endo, K., Takizawa, S., Kobayashi, T., Shirai, T., Yamane, T. & Ito, S. (2002)**. Enzymatic properties, crystallization, and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. *Biochim Biophys Acta*;1570(3):174-80.

**Hopwood, D. A. (2007)**. *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*. Oxford University Press.

**Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B. & Eijsink, V.G. (2012)**. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1): p. 45.

**Houfani, A.A., Anders, N. , Spiess, A.C. , Baldrian, P. , & Benallaoua, S. (2020)**. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars– a review. *Biomass and Bioenergy*, 134: p. 105481.

## K

**Kämpfer, P. (2006)**. The family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edn, 3, Archaea, Bacteria, Firmicutes, Actinomycetes (edited by Dwor- kin, Falkow, Rosenberg, Schleifer and Stackebrandt). Springer, New York, Pp. 538–604.

**Khelil, O., (2017)**. Production de cellulase et d'enzymes associées par des souches de *Bacillus* sp : Le rôle des prétraitements et l'effet des polyphénols, des flavonoïdes et des biosurfactants. Thèse en vue de l'obtention du Diplôme de doctorat, Université Mohamed Boudiaf-Oran.

**Kotchoni ,O.S., Shonukan, O.O.& Gachomo, W.E. (2003)**. *Bacillus pumilus* BPCR16, a promising candidate for cellulase production under conditions of catabolic repression. *African Journal of Biotechnology* 2: 140-146.

**Kim, B.K., Lee, B.H., Lee, Y.J., Jin, I.H., Chung, C.H. & Lee, J.W. (2009).** Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology*, **44**, 411–416.

**Kim, D.& Ku, S. (2018).** Bacillus cellulase molecular cloning, expression, and surface display on the outer membrane of Escherichia coli. *Molecules*, **23**, 503.

**Ko, C.H., Tsai, C.H., Lin, P.H., Chang, K.C., Tu, J., Wang, Y.N.& Yang, C.Y. (2010).** Characterization and pulp refining activity of a Paenibacillus campinasensis cellulase expressed in Escherichia coli. *Bioresour. Technol.*, **101**, 7882–7888.

**Kumar, A. G., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N., & Sekaran, G. (2008).** Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated Bacillus pumilus. *J Appl Microbiol*, **104**(2), 411-420.

**Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016).** MEGA7: Molecular evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.*, **33**(7), 1870-4.

## L

**Lakhundi, S., Ruqaiyyah, S. & Naveed, A. K. (2015).** Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of Acanthamoeba infections. *Parasites & Vectors*, **8**, 23.

**Li, B., Xu, H., & Mu, X. (2016).** Review of Alkali-Based Pretreatment to Enhance Enzymatic Saccharification for Lignocellulosic Biomass Conversion. *Industrial & Engineering Chemistry Research Review*, **55**, 8691-8705.

**Li, Z., Liu, G. & Qu, Y. (2017).** Improvement of cellulolytic enzyme production and performance by rational designing expression regulatory network and enzyme system composition. *Bioresour.Technol*, **245**, 1718-1726.

**Liao, Y., de Beeck, B. O., Thielemans, K., Ennaert, T., Snelders, J., Dusselier, M., & Sels, B. F. (2020).** The role of pretreatment in the catalytic valorization of cellulose. *Molecular Catalysis*, **487**: 110883.

**Liu J, Yuan, X., Zeng, G., Shi, J. &Chen, S. (2006).** Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by Trichoderma viride in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, **41**(11), 2347–2351.

**Lynd, L.R., Weimer, P.J., Vanzyl, W.H. & Pretorius, I.S. (2002).** Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66** (3), p: 506-577.

## M

- Malik, W.A. & Javed, S. (2024).** Enhancement of cellulase production by cellulolytic bacteria SB125 in submerged fermentation medium and biochemical characterization of the enzyme. *Int J Biol Macromol.* ,263(Pt 2):130415.
- Manteca, A. & Sanchez, J. (2010).** Streptomyces developmental cycle and secondary metabolite production. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol* 1:560–566
- Miller, G. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analy. Chem.*, 31(3), 426-428.

## N

- Niladevi, K.N., Sukumaran, R.K., Jacob, N., Anisha, G.S. & Prema, P. (2009).** Optimization of laccase production from a novel strain *Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiol. Res.*, **164**,105-113

## O

- Omura, S. (1992).** The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Verlag, New York. Inc.281–303.

## P

- Pamboukian, C.R.D., Guimarães, L.M.& Facciotti, M.C.R. (2002).** Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Braz J Microbiol* 33(1):17–21
- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946).** The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325.
- Ponnambalam, A.S., Deepthi, R.S. & Ghosh, A.R. (2011).** Qualitative display and measurement of enzyme activity of isolated cellulolytic bacteria. *Journal of Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering* 1(1):33-37.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A.(2010).** Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition, p.1088.

## R

- Reddy, L.V.A. ,Wee , Y.J, Yun, J.S. & Ryu, H.W. (2008).** Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response SURFACE methodological approaches. *Bioresources and Technology* ; 99; 2242–2249
- Regmi, S., Choi, Y.S., Kim, Y.K., Khan, M.M., Lee, S.H., Cho, S.S., Jin, Y.Y., Lee, D.Y., Yoo, J. C.& Suh, J.W. (2020) .** Endoglucanase produced by *Bacillus subtilis* strain CBS31:

biochemical characterization, thermodynamic study, enzymatic hydrolysis, and bio-industrial applications, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 25 104–116.

## S

**Saini, J.K., R. Saini, & L. Tewari, (2015).** Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4): p. 337-353.

**Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. & Pandey, A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8), 2689-2694.

**Sathishkumar, P., Balan, K., Palvannan, T., Kamala-Kannan, S., Oh, B.T. & Rodríguez - Couto, S. (2013.).** Efficiency of *Pleurotus florida* laccase on decolorization and detoxification of the reactive dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR) under optimized conditions. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 41(7), 665-672.

**Sayanla, A., Kundu, R.K. & Dube, D.K. (1988).** Extracellular cellulolytic enzymes system of *Aspergillus japonicus*. Purification and characterization of an inducible extracellular -glucosidase. *Enzyme. Microb. Technol.* 10. P: 91-99.

**Sengar, R. S., Lugani, Y., Rai, R., Prabhu, A. A., Maan, P., Hans, M., Kumar, V., Kumar, S., Anuj K. & Chandel, A. K. (2020).** Recent advances in bioethanol production from lignocelluloses: a comprehensive review with a focus on enzyme engineering and designer biocatalysts. *Biofuel Research Journal*, 28, 1267-1295.

**Shajahan, S., Ganesh, Moorthy, I., Sivakumar, N. & Selvakumar, G. (2016).** Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. *Journal of King Saud University – Science*, 29, 302-310.

**Shariq, M. & Sohail, B. (2019).** Citrus limetta peels: a promising substrate for the production of multi-enzyme preparation from a yeast consortium. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(43), 115.

**Sharma, D., Nagpal, R., Agrawal, S., Bhardwaj, N., & Mahajan, R. (2021).** Eco-friendly Bleaching of Agrowaste Wheat Straw Using Crude Alkaline-Tolerant Cellulase-Free Xylano-Pectinolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-15.

**Shyaula, M., Regmi, S., Khadka, D., Poudel, R.C., Dhakal, A., Koirala, D., Sijapati, J., Singh, A. & Maharjan, J. (2023).** Characterization of Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* PANG L Isolated from the Himalayan Soil. *Int J Microbiol.*, 3615757.

**Singh, J., Batra, N. & Sobti, R.C. (2004).** Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31 51–56.

**Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C. & Pandey, A. (2010).** Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and

submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 46(7): 541–549.

**Sreedharan, S., Prakasan, P., Sasidharan, S. and Sailas, B. (2016).** An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, **6**, 1–13.

**Scriban, R. (1993).** Biotechnologie. 4<sup>ème</sup> édition. Technique de documentation. Edition, Lavoisier.pp. 32 – 690

**Stackebrandt, E. & J. Ebers (2006).** Taxonomic parameters revisited : tarnished gold standards . In : *Microbiol. Today* 33, p. 152-155.

## T

**Talamantes, D., Biabini,N., Dang, H. & Abdoun, K.(2016).** Natural diversity of cellulases, xylanases, and chitinases in bacteria. *Biotechnology for Biofuels*, 16(133).

**Thongprajukaew, K., Choodum, A., Sa-E, B. & Hayee, U. (2014).** Smart phone: a popular device supports amylase activity assay in fisheries research. *Food Chem*,163:87-91.

**Thakkar, A., & Saraf, M. (2014).** Application of statistically based experimental designs to optimize cellulase production and identification of gene. *Natural products and bioprospecting*, **4**, 341-351.

**Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. & Chun, J. (2017).** Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* ,**67**, 1613–1617.

**Tuncer, M., Ball, A.S., Rob, A. & Wilson, M.T. (1999).** Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25, *Enzym .Microb.Technol.*, **25**, 38-47.

## V

**Vautrin, F. (2019).** Milieux urbains et exposition aux Actinobactéries pathogènes : cas particulier des bassins d’infiltration. Thèse de doctorat. Ecologie, Environnement. Université de Lyon. France.

**Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60(2):407–438.

**Vijayaraghavan, P., Prakash Vincent, S.G. & Dhillon, G.S. (2016).** Solid-substrate bioprocessing of cow dung for the production of carboxymethyl cellulase by *Bacillus halodurans* IND18, *Waste Manag.* **48** 513–520.

**Z**

**Zabed, H., Sahu, J., Suely, A., Boyce, A. & Faruq, G. (2017).**Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017. 71: p.475-501.

# ***Annexes***

## **Annexe I**

### **Matériel utilisé**

| <i><b>Appareillage</b></i> | <i><b>Verreries</b></i>    | <i><b>Autres</b></i>        |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| -Autoclave                 | - Boîtes pétries           | -pipette pasteur            |
| -Agitateur magnétique      | -Eprouvettes               | -barreaux magnétique        |
| -ph mètre                  | -Erlenmeyers               | -Micropipette 1000          |
| -vortex                    | -Becher                    | -Micropipette 100           |
| -Spectrophotomètre         | -Flacons en verre de 200ml | -Spatule                    |
| -Bain marie                |                            | - Pissettes                 |
| -Balance de précision      |                            | -Pince                      |
| -Etuve                     |                            | -Embout bleu et jaunes      |
| -Bec bunsen                |                            | -Cuves de spectrophotomètre |
| -Réfrigérateur             |                            |                             |

## Annexe II

### ▪ Composition des Milieux de culture

#### 1. Milieu Gausse

Amidon .....20g  
 Agar.....20g  
 KNO<sub>3</sub>.....1g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....0,5g  
 MgSO<sub>4</sub>.....0,5g  
 Eau distillée.....1000 mL

#### 6. Milieu ISP2

Glucose : .....0,4g  
 Extrait de levure : .....0,4g  
 Extrait de Malt : .....1g  
 Agar : .....2g  
 Eau distillée : .....100ml ; PH=7,2.

#### 7. Milieu ISP3

Farine d'avoine : .....2g  
 Solution saline standard : .....0,1ml  
 Agar : .....2g  
 Eau distillée : .....100ml ; PH=7,2.

#### 8. Milieu ISP4

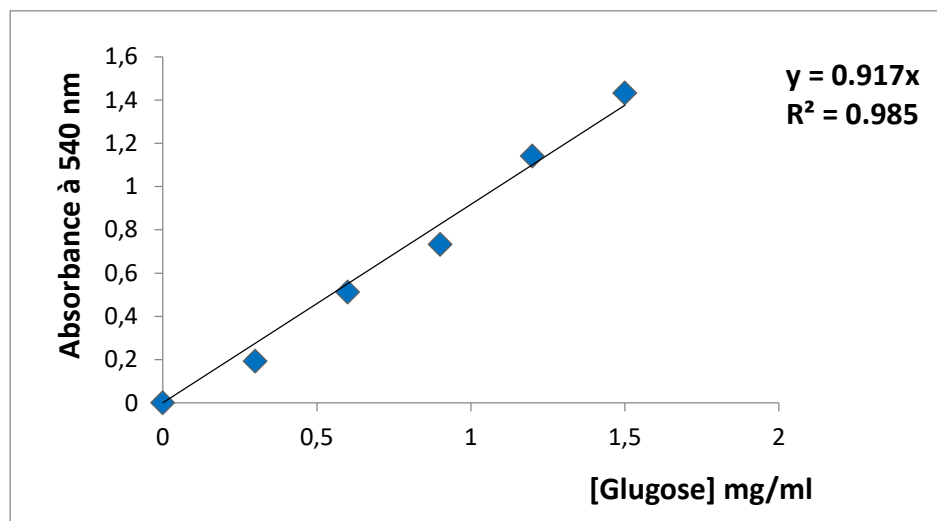
Amidon : .....1g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : .....0,1g  
 MgSO<sub>4</sub> : .....0,1g  
 NaCl : .....0,1g  
 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : .....0,2g  
 CaCO<sub>3</sub> : .....0,2g  
 Solution saline standard : .....0,1ml  
 Agar : .....0,2g  
 Eau distillée : .....100ml ; PH=7,2.

### ▪ Solution DNS

Acide dinitrosalysique .....1g  
 Soude (NaOH) .....1,6g  
 Tartrate sodium et de potassium .....30g  
 Eau distillée .....100ml  
 À l'obscurité, chauffer à 50°C et filtré par un papier filtre.

Annexe III

## Courbes d'étalonnage

**Figure 16:** Courbe d'étalonnage du dosage du glucose

Annexe IV**Table de Fische**

Valeur des 95ièmes centiles (niveau 0,05)

F0,95 pour la distribution F

| $\begin{matrix} \nu_1 \rightarrow \\ \nu_2 \downarrow \end{matrix}$ | 1    | 2     | 3    | 4     | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 12   | 15   | 20   | 24   | 30   | 40   | 60   | 120  | $\infty$ |
|---------------------------------------------------------------------|------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------|
| 1                                                                   | 161  | 200   | 216  | 225   | 230  | 234  | 237  | 239  | 241  | 242  | 244  | 246  | 248  | 249  | 250  | 251  | 252  | 253  | 254      |
| 2                                                                   | 18,5 | 19,00 | 19,2 | 19,20 | 19,3 | 19,3 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,4 | 19,5 | 19,5 | 19,5 | 19,5 | 19,5 | 19,5     |
| 3                                                                   | 10,1 | 9,55  | 9,28 | 9,12  | 9,01 | 8,94 | 8,89 | 8,85 | 8,81 | 8,79 | 8,74 | 8,7  | 8,66 | 8,64 | 8,62 | 8,59 | 8,57 | 8,55 | 8,53     |
| 4                                                                   | 7,71 | 6,94  | 6,59 | 6,39  | 6,26 | 6,16 | 6,09 | 6,04 | 6,00 | 5,96 | 5,91 | 5,86 | 5,80 | 5,77 | 5,75 | 5,72 | 5,69 | 5,66 | 5,63     |
| 5                                                                   | 6,61 | 5,79  | 5,41 | 5,19  | 5,05 | 4,95 | 4,88 | 4,82 | 4,77 | 4,74 | 4,68 | 4,62 | 4,56 | 4,53 | 4,50 | 4,46 | 4,43 | 4,40 | 4,37     |
| 6                                                                   | 5,99 | 5,14  | 4,76 | 4,53  | 4,39 | 4,28 | 4,21 | 4,15 | 4,10 | 4,06 | 4,00 | 3,94 | 3,87 | 3,84 | 3,81 | 3,77 | 3,74 | 3,70 | 3,67     |
| 7                                                                   | 5,59 | 4,74  | 4,35 | 4,12  | 3,97 | 3,87 | 3,79 | 3,73 | 3,68 | 3,64 | 3,57 | 3,51 | 3,44 | 3,41 | 3,38 | 3,34 | 3,3  | 3,27 | 3,23     |
| 8                                                                   | 5,32 | 4,46  | 4,07 | 3,84  | 3,69 | 3,58 | 3,50 | 3,44 | 3,39 | 3,35 | 3,28 | 3,22 | 3,15 | 3,12 | 3,08 | 3,04 | 3,01 | 2,97 | 2,93     |
| 9                                                                   | 5,12 | 4,26  | 3,86 | 3,63  | 3,48 | 3,37 | 3,29 | 3,23 | 3,18 | 3,14 | 3,07 | 3,01 | 2,94 | 2,90 | 2,86 | 2,83 | 2,79 | 2,75 | 2,71     |
| 10                                                                  | 4,96 | 4,10  | 3,71 | 3,48  | 3,33 | 3,22 | 3,14 | 3,07 | 3,02 | 2,98 | 2,91 | 2,85 | 2,77 | 2,74 | 2,70 | 2,66 | 2,62 | 2,58 | 2,54     |
| 11                                                                  | 4,84 | 3,98  | 3,59 | 3,36  | 3,20 | 3,09 | 3,01 | 2,95 | 2,90 | 2,85 | 2,79 | 2,72 | 2,65 | 2,61 | 2,57 | 2,53 | 2,49 | 2,45 | 2,40     |
| 12                                                                  | 4,75 | 3,89  | 3,49 | 3,26  | 3,11 | 3,00 | 2,91 | 2,85 | 2,8  | 2,75 | 2,69 | 2,62 | 2,54 | 2,51 | 2,47 | 2,43 | 2,38 | 2,34 | 2,30     |
| 13                                                                  | 4,67 | 3,81  | 3,41 | 3,18  | 3,03 | 2,92 | 2,83 | 2,77 | 2,71 | 2,67 | 2,60 | 2,53 | 2,46 | 2,42 | 2,38 | 2,34 | 2,30 | 2,25 | 2,21     |
| 14                                                                  | 4,60 | 3,74  | 3,34 | 3,11  | 2,96 | 2,85 | 2,76 | 2,7  | 2,65 | 2,60 | 2,53 | 2,46 | 2,39 | 2,35 | 2,31 | 2,27 | 2,22 | 2,18 | 2,13     |
| 15                                                                  | 4,54 | 3,68  | 3,29 | 3,06  | 2,90 | 2,79 | 2,71 | 2,64 | 2,59 | 2,54 | 2,48 | 2,40 | 2,33 | 2,29 | 2,25 | 2,20 | 2,16 | 2,11 | 2,07     |
| 16                                                                  | 4,49 | 3,63  | 3,24 | 3,01  | 2,85 | 2,74 | 2,66 | 2,59 | 2,54 | 2,49 | 2,42 | 2,35 | 2,28 | 2,24 | 2,19 | 2,15 | 2,11 | 2,06 | 2,01     |
| 17                                                                  | 4,45 | 3,59  | 3,20 | 2,96  | 2,81 | 2,70 | 2,61 | 2,55 | 2,49 | 2,45 | 2,38 | 2,31 | 2,23 | 2,19 | 2,15 | 2,1  | 2,06 | 2,01 | 1,96     |
| 18                                                                  | 4,41 | 3,55  | 3,16 | 2,93  | 2,77 | 2,66 | 2,58 | 2,51 | 2,46 | 2,41 | 2,34 | 2,27 | 2,19 | 2,15 | 2,11 | 2,06 | 2,02 | 1,97 | 1,92     |
| 19                                                                  | 4,38 | 3,52  | 3,13 | 2,90  | 2,74 | 2,63 | 2,54 | 2,48 | 2,42 | 2,38 | 2,31 | 2,23 | 2,16 | 2,11 | 2,07 | 2,03 | 1,98 | 1,93 | 1,88     |
| 20                                                                  | 4,35 | 3,49  | 3,10 | 2,87  | 2,71 | 2,60 | 2,51 | 2,45 | 2,39 | 2,35 | 2,28 | 2,20 | 2,12 | 2,08 | 2,04 | 1,99 | 1,95 | 1,90 | 1,84     |
| 21                                                                  | 4,32 | 3,47  | 3,07 | 2,84  | 2,68 | 2,57 | 2,49 | 2,42 | 2,37 | 2,32 | 2,25 | 2,18 | 2,10 | 2,05 | 2,01 | 1,96 | 1,92 | 1,87 | 1,81     |
| 22                                                                  | 4,30 | 3,44  | 3,05 | 2,82  | 2,66 | 2,55 | 2,46 | 2,40 | 2,34 | 2,30 | 2,23 | 2,15 | 2,07 | 2,03 | 1,98 | 1,94 | 1,89 | 1,84 | 1,78     |
| 23                                                                  | 4,28 | 3,42  | 3,03 | 2,80  | 2,64 | 2,53 | 2,44 | 2,37 | 2,32 | 2,27 | 2,20 | 2,13 | 2,05 | 2,01 | 1,96 | 1,91 | 1,86 | 1,81 | 1,76     |
| 24                                                                  | 4,26 | 3,40  | 3,01 | 2,78  | 2,62 | 2,51 | 2,42 | 2,36 | 2,30 | 2,25 | 2,18 | 2,11 | 2,03 | 1,98 | 1,94 | 1,89 | 1,84 | 1,79 | 1,73     |
| 25                                                                  | 4,24 | 3,39  | 2,99 | 2,76  | 2,60 | 2,49 | 2,40 | 2,34 | 2,28 | 2,24 | 2,16 | 2,09 | 2,01 | 1,96 | 1,92 | 1,87 | 1,82 | 1,77 | 1,71     |
| 26                                                                  | 4,23 | 3,37  | 2,98 | 2,74  | 2,59 | 2,47 | 2,39 | 2,32 | 2,27 | 2,22 | 2,15 | 2,07 | 1,99 | 1,95 | 1,9  | 1,85 | 1,8  | 1,75 | 1,69     |
| 27                                                                  | 4,21 | 3,35  | 2,96 | 2,73  | 2,57 | 2,46 | 2,37 | 2,31 | 2,25 | 2,2  | 2,13 | 2,06 | 1,97 | 1,93 | 1,88 | 1,84 | 1,79 | 1,73 | 1,67     |
| 28                                                                  | 4,20 | 3,34  | 2,95 | 2,71  | 2,56 | 2,45 | 2,36 | 2,29 | 2,24 | 2,19 | 2,12 | 2,04 | 1,96 | 1,91 | 1,87 | 1,82 | 1,77 | 1,71 | 1,65     |
| 29                                                                  | 4,18 | 3,33  | 2,93 | 2,70  | 2,55 | 2,43 | 2,35 | 2,28 | 2,22 | 2,18 | 2,10 | 2,03 | 1,94 | 1,90 | 1,85 | 1,81 | 1,75 | 1,70 | 1,64     |
| 30                                                                  | 4,17 | 3,32  | 2,92 | 2,69  | 2,53 | 2,42 | 2,33 | 2,27 | 2,21 | 2,16 | 2,09 | 2,01 | 1,93 | 1,89 | 1,84 | 1,79 | 1,74 | 1,68 | 1,62     |
| 40                                                                  | 4,08 | 3,23  | 2,84 | 2,61  | 2,45 | 2,34 | 2,25 | 2,18 | 2,12 | 2,08 | 2,00 | 1,92 | 1,84 | 1,79 | 1,74 | 1,69 | 1,64 | 1,58 | 1,51     |
| 60                                                                  | 4,00 | 3,15  | 2,76 | 2,53  | 2,37 | 2,25 | 2,17 | 2,10 | 2,04 | 1,99 | 1,92 | 1,84 | 1,75 | 1,70 | 1,65 | 1,59 | 1,53 | 1,47 | 1,39     |
| 120                                                                 | 3,92 | 3,07  | 2,68 | 2,45  | 2,29 | 2,18 | 2,09 | 2,02 | 1,96 | 1,91 | 1,83 | 1,75 | 1,66 | 1,61 | 1,55 | 1,50 | 1,43 | 1,35 | 1,25     |
| $\infty$                                                            | 3,84 | 3,00  | 2,60 | 2,37  | 2,21 | 2,10 | 2,01 | 1,94 | 1,88 | 1,83 | 1,75 | 1,67 | 1,57 | 1,52 | 1,46 | 1,39 | 1,32 | 1,22 | 1,00     |