

Mémoire De Magister

Option :

Microbiologie Appliquée aux Substances Antimicrobiennes

Thème:

**Criblage de souches d'actinomycètes productrices
de cellulases industrielles**

Présentée Par : M^{elle} HAMOUDI Houria

Devant le jury

M ^r ZAIDI. F	MCA (UAMBejaia)	Président
M ^r BENALLAOUA. S	Professeur (UAMBejaia)	Rapporteur
M ^{me} BENABDESSELAM. F	MCA (UAMBejaia)	Examinatrice
M ^r KECHA. M	MCA (UAMBejaia)	Examineur

2010/2011

REMERCIEMENTS

« Louange à Allah pour m'avoir donnée le courage pour réaliser ce travail »

Mes vifs remerciements s'adressent d'abord et en particulier à Mr BENALLOUA SAID, professeur à l'université de Bejaia, directeur du mémoire, pour m'avoir acceptée et accueillie dans votre laboratoire, encadrée, formée, dirigée et surtout pour m'avoir fait confiance. Qu'il trouve ici toute ma gratitude.

J'adresse mes remerciements aussi à :

Docteur ZAIDI. F, Maitre de conférences de l'université de Bejaia, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury ;

Madame la doctoresse BENABDESSELAM. F, Maitre de conférences de l'université de Bejaia, et Docteur KECHA. M, Maitre de conférences de l'université de Bejaia, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Aussi, je voudrais sincèrement exprimer ma profonde gratitude pour M^{me} BOUCHERBA. N et M^{elle} BELHAMICHE. N pour leur gentillesse, leur aide, leurs précieux conseils, leur disponibilité et leurs encouragements incessants.

Mes remerciements s'adressent aussi au chef de département de microbiologie Mr TOUATI ABDELAZIZ, maître de conférences A à l'université de Bejaia.

Je ne peux oublier de remercier chaleureusement mes très chères collègues, Azdine, avec qui j'ai partagé des moments forts, Karima, Salima et Aziz pour l'ambiance cordiale et l'aide qu'elles m'ont apporté à tout moment. Je leur souhaite, à tous, bonne continuation et beaucoup de réussite.

Je tiens à exprimer mes sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui m'ont appris une infinité de choses et qui m'ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Bien sûr je n'oublie pas toute l'équipe du laboratoire.

DEDICACES

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

*A la mémoire de ceux qui me sont très chers au monde ; mon
frère Ibrahim et très chers grands pères*

A Mes chers parents

A mon très cher frère Yazid et sa femme

*A mes très chères sœurs Hadjila, Zouhra et Yamina et leur
maris*

A mes nièces Imane, Hanane, Loubna, Sara et Anfal

A mes neveux Abd Er-Rahim, Bilal et Amine

A mon très cher ami Touahri Abd Er-Rehmane

Toute ma famille

Tous mes amis (es)

Et toute la promotion de la PG 2009 microbiologie

Liste des figures

Figure 1 : Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes.....	8
Figure 2 : Structure chimique partielle de la cellulose.....	12
Figure 3 : Exocellulase CBH I (Cel7A) de <i>Trichoderma reesei</i>	14
Figure 4 : L'hydrolyse enzymatique de la cellulose.....	17
Figure 5 : Mécanisme d'hydrolyse proposé pour les glycosyl hydrolases cellulose.....	19
Figure 6 : Processus de production du bioéthanol.....	25
Figure 7: Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS.....	28
Figure 8 : Observation de zones claires sur milieu solide après 5 jours d'incubation à 28°C.....	42
Figure 9: Micromorphologie de deux souches cultivées pendant 21 jours à 28°C.....	45
Figure 10: Effet CMC sur la production de cellulases.....	53
Figure 11: Effet de l'extrait de levure sur la production de cellulases.....	54
Figure 12 : Effet du sulfate de magnésium sur la production de cellulases	55
Figure 13: Effet du chlorure d'ammonium sur la production de cellulases.....	56
Figure 14: Effet de NaCl sur la production de cellulases.....	57
Figure 15 : Effet de la température sur la production de cellulases	58
Figure 16: Effet du pH initial sur la production de cellulases.....	59
Figure 17 : Effet des sources de carbone sur la production de cellulases	60
Figure 18: Effet des sources d'azote sur la production de cellulases.....	61
Figure 19: Effet du temps d'incubation sur la production de cellulases	61
Figure 20: Effet de la température sur l'activité enzymatique.....	62
Figure 21: Effet du pH sur l'activité enzymatique.....	64
Figure 22: La thermostabilité des cellulases en absence du substrat.....	64
Figure 23: La thermostabilité des cellulases en présence du substrat.....	65
Figure 24: Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique.....	66
Figure 25: Effet des agents dénaturants sur l'activité enzymatique	67
Figure 26 : Effet de du glucose sur l'activité enzymatique	68
Figure 27 : Effet des concentrations de CMC sur l'activité enzymatique	68
Figure 28: Stabilité à 4°C des activités enzymatiques.....	69
Figure 29: Spécificité vis-à-vis de différents substrats.....	70
Figure 30 : Produits d'hydrolyse de CMC analysés par CCM.....	70
Figure 31 : Courbe d'étalonnage des marqueurs protéiques pour l'estimation du poids moléculaires.....	71
Figure 32: Profil de migration des protéines du surnageant (SDS-PAGE) et zymogramme.....	71
Figure 33 : Courbe d'étalonnage de glucose à 575 nm.....	Annexes III

Liste des tableaux

Tableau I : Répartition des actinomycètes dans la nature.....	4
Tableau II : Nombre approximatif de produits microbiens bioactifs.....	10
Tableau III : Composition en cellulose de matériaux lignocellulosiques.....	12
Tableau IV : Les microorganismes producteurs de cellulases.....	18
Tableau V : les antibiotiques testés à l'égard des souches d'actinomycètes.....	34
Tableau VI : Diamètres des zones d'hydrolyse des 20 souches sélectionnées.....	43
Tableau VII : Activités cellulasiqes mesurées à 50°C, à pH 7.....	43
Tableau VIII : Résultats de la croissance de l'isolat P ₃ D ₂₈ sur différents milieux	46
Tableau IX : Résultats de la croissance de l'isolat P ₄ D ₁₀ sur différents milieux.....	47
Tableau X : Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat P ₃ D ₂₈ par chromatographie sur couche mince	48
Tableau XI : Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat P ₄ D ₁₀ par chromatographie sur couche mince.....	48
Tableau XII : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des deux isolats P ₃ D ₂₈ et P ₄ D ₁₀	51
ANNEXES	
Tableau XIII : Préparation des gels de séparation et de concentration.....	Annexes II

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES ACTINOMYCETES

1. Généralité sur les actinomycètes	3
2. Ecologie des actinomycètes.....	3
3. Taxonomie des actinomycètes.....	5
3.1. Evolution de la taxonomie des actinomycètes.....	5
3.2. Critères actuels d'identification.....	7
3.2.1. Caractères morphologiques.....	7
3.2.2. Critères chimiotaxonomiques.....	7
3.3.3. Critères physiologiques.....	9
3.3.4. Critères moléculaires.....	9
4. Importances industrielles des actinomycètes.....	9

CHAPITRE II : LES CELLULASES

1. Cellulose.....	12
2. Cellulases.....	13
2.1. Structure des cellulases.....	14
2.2. Classification des cellulases.....	15
2.3. Les systèmes enzymatiques.....	15
2.3.1. Les Endoglucanases.....	16
2.3.2. Les Exoglucanases.....	16
2.3.3. Les β -glucosidases.....	17
2.4. Source et origines des cellulase.....	17
2.5. Mécanisme d'action.....	18
3. Méthodes et techniques d'étude.....	20
3.1. Mesure de l'activité enzymatique.....	20
3.2. Propriétés physicochimiques des cellulases.....	20
3.3. Production de cellulases.....	21
3.3.1. Les conditions de culture affectant la production de cellulases.....	21
3.3.2. Composition du milieu de culture.....	23
4. Applications industrielles des cellulases.....	23

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I : MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériel biologique.....	26
2. Criblage des souches d'actinomycètes productrices de cellulases.....	26
2.1. Sur milieu solide.....	26
2.2. Sur milieu liquide.....	27
2.3. Mesure de l'activité cellulasique.....	27

2.4. Dosage des sucres réducteurs.....	28
3. Etude taxonomique des souches sélectionnées.....	28
3.1. Etude morphologique.....	28
3.2. Etude chimiotaaxonomique.....	29
3.3. Etude physiologique.....	30
3.4. Tests biochimiques.....	32
4. Optimisation de la production de cellulases.....	35
4.1. Le milieu de culture.....	35
4.2. Effet de la température.....	35
4.3. Effet du pH.....	35
4.4. Effet des sources de carbone.....	35
4.5. Effet des sources d'azote.....	36
4.6. Effet du temps d'incubation.....	36
5. Caractérisation des cellulases dans le surnageant.....	36
5.1. Effet de la température.....	36
5.2. Effet du pH.....	36
5.3. Mesure de la thermostabilité.....	37
5.4. Effet des ions métalliques.....	37
5.5. Effet des agents dénaturants.....	37
5.6. Effet du glucose.....	37
5.7. Effet de la concentration de CMC.....	38
5.8. Spécificité de CMCase vis-à-vis de différents substrats.....	38
5.9. Stabilité au cours de la conservation.....	38
5.10. Etude des produits d'hydrolyse par chromatographie sur couche mince.....	38
5.11. Caractérisation électrophorétique des cellulases sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate (SDS-PAGE).....	39
5.12. Mise en évidence de l'activité cellulasique par la technique du zymogramme.....	40
6. Analyse statistique.....	41

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Criblage des souches d'actinomycètes productrices de cellulases.....	42
2. Etude taxonomique des souches sélectionnées.....	44
2.1. Etude des caractères morphologiques.....	44
2.2. Analyse des constituants cellulaires et pariétaux.....	48
2.3. Identification du genre.....	49
2.4. Etude physiologique.....	49
2.5. Identification de l'espèce.....	50
3. Optimisation de la production de cellulases.....	53
3.1. Effet de la concentration de CMC.....	53
3.2. Effet de l'extrait de levure.....	54
3.3. Effet du sulfate de magnésium.....	55
3.4. Effet du chlorure d'ammonium.....	55
3.5. Effet du chlorure de sodium.....	56
3.6. Effet de la température.....	57
3.7. Effet du pH initial.....	58
3.8. Effet des sources de carbone.....	59
3.9. Effet des sources d'azote.....	60
3.10. Effet du temps d'incubation.....	61

4. Caractérisation de cellulases dans le surnageant de culture.....	62
4.1. Effet de la température.....	62
4.2. Effet du pH.....	63
4.3. Thermostabilité.....	64
4.4. Effet des ions métalliques.....	66
4.5. Effet des agents dénaturants.....	67
4.6. Effet du glucose.....	67
4.7. Effet de la CMC.....	68
4.8. Stabilité à 4°C.....	69
4.9. Spécificité vis-à-vis des substrats.....	69
4.10. Etude des produits d'hydrolyse de CMC.....	70
4.11. SDS-PAGE et zymogramme.....	71
Conclusion.....	73
Références bibliographiques.....	74
Annexes	

INTRODUCTION

La biomasse lignocellulosique, constituée principalement de cellulose, d'hémicellulose et de lignine, représente aujourd'hui une des ressources renouvelables les plus abondantes sur terre. La cellulose, polymère linéaire constituée d'unités de D-glucopyranose reliées par des liaisons β (1-4), constitue la première ressource en carbone et d'énergie renouvelable pratiquement inépuisable et peu exploitée à ce jour.

Elle offre les meilleures perspectives en terme de réduction des coûts de production par son abondance et son prix potentiellement inférieur aux autres substrats et ce malgré la complexité des procédés de transformation. La cellulose constitue des enjeux importants dans la recherche notamment en matière de biocarburants. Ces recherches visent l'amélioration des rendements de conversion de la biomasse végétale en utilisant des enzymes capables de dégrader la cellulose et par ailleurs sa valorisation a aussi un impact écologique très intéressant qui consiste à réduire les émissions de gaz à effet de serre (Howard et *al.*, 2003).

Les principales enzymes capables de dégrader les celluloses sont des hydrolases appelées enzymes cellulolytiques. En raison de la complexité structurale des celluloses, leur dégradation complète implique tout un système comprenant une variété d'enzymes dont les endoglucanases qui hydrolysent au hasard les liaisons internes β (1-4) de la chaîne cellulosique, les exoglucanases attaquent les deux extrémités de la chaîne cellulosique, et les β -glucosidases hydrolysent la liaison β -glucosidique du cellobiose.

Divers microorganismes, notamment différentes espèces d'actinomycètes présentent des capacités de biodégradation des molécules organiques aussi variées que récalcitrantes. Cette fonction de biodégradation est due à la variété d'enzymes qu'elles peuvent synthétiser telles que les cellulases, les xylanases, les amylases et les lipases (Mc Carthy et *al.*, 1992).

Les actinomycètes constituent un groupe de microorganismes procaryotes Gram positifs, avec un coefficient de Chargaff (GC) supérieur à 55% ; elles sont universellement répandues dans presque tous les écosystèmes, avec toutefois une préférence pour les sols grâce à leurs capacités d'adaptation aux différentes conditions environnementales et leurs variabilités métaboliques. Malgré la lenteur de leur croissance, leur aptitude considérable à produire de nombreuses substances métaboliques leur confère un rôle essentiel dans la décomposition de la matière organique et le recyclage des éléments dans les sols et dans la lutte biologique contre les maladies des plantes (Lamari, 2006).

Pour ces raisons, la recherche de nouvelles souches productrices de cellulases performantes reste un domaine de recherche privilégié. A ce titre, notre étude porte sur une contribution à l'étude des cellulases, principalement des carboxyméthylcellulases produites par des souches d'actinomycètes collectionnées au niveau du laboratoire de Biochimie Microbienne.

Dans le présent travail, 80 souches d'actinomycètes isolées à partir d'échantillons de sol riches en matières organiques, ont fait l'objet d'un criblage dans cette optique.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une présentation bibliographique sur les actinomycètes en général ainsi qu'un aperçu sur les cellulases.

La seconde partie du document développe les méthodes utilisées et les résultats obtenus relatifs aux différentes étapes de ce travail à savoir:

- Criblage des souches productrices de cellulases.
- Identification des souches choisies.
- Optimisation de production de cellulases.
- Caractérisation de cellulases dans le surnageant brut.

CH I : LES ACTINOMYCETES

1. Généralité sur les actinomycètes

Cohn, dès 1875 décrit le premier actinomycète et deux années plus tard, Harz (1877) isola *Actinomyces bovis*, agent responsable des actinomycoses du bétail (Lechevalier et Lechevalier, 1970). Depuis, les actinomycètes ont été isolés des sols, des matières organiques en décomposition, des eaux, de presque tous les habitats où la vie est possible (Theilleux, 1993 ; Bergey's manual, 2007).

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif, dont le coefficient de Chagaff (C+G) est supérieur à 55%, généralement compris entre 60 et 75% (Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun et *al.*, 1997). Ils comprennent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium*, ou très évoluées, comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant. Les formes évoluées possèdent un mycélium du substrat, surmonté par un mycélium aérien sporulant qui leur confère un aspect fongique d'où l'expression « ray fungi » ou « champignons rayonnants », utilisée parfois entre 1930 et 1960.

En général, les actinomycètes sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique (Ensign et *al.*, 1993), certaines ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés. Ils colonisent fréquemment les substrats insolubles (Crawford et *al.*, 1993) et peuvent dégrader les protéines, la cellulose et d'autres matières organiques et les résidus des plantes dans le sol (Lacey, 1997).

Les actinomycètes sont généralement aérobies, anaérobies facultatifs tels que : *Oerskovia*, ou microaérophiles tels que *Actinomyces* et *Agromyces* ; mésophiles ou parfois thermophiles comme *Thermoactinomyces* et neutrophiles (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983; Tracy et *al.*, 2002 ; Badji, 2006). Ils préfèrent un pH neutre ou peu alcalin.

Les actinomycètes sont généralement saprophytes, mais quelques uns sont pathogènes pour les plantes tel que *Streptomyces scabies*, agent de la galle de la pomme de terre (Loria, 1986) ou encore pathogènes pour l'homme (comme *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*) (Peltola et *al.*, 2001) et pour les animaux (*Actinomyces bovis*) (Goodfellow et Williams, 1983).

2. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont des germes très ubiquitaires, rencontrés sur tous les substrats naturels (Williams et *al.*, 1984). Ils constituent une part importante de la microflore tellurique : 10 à 20 % ou parfois plus (Dommergues et Mengenot, 1970 ; Ishizawa et Arargi, 1976).

Ils sont présents dans des sols polaires gelés en permanence tout comme dans les sols désertiques chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec les métaux lourds ou le pétrole, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés et mêmes dans des sédiments océaniques situés à plus de 4000 m de profondeur (Cross, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983) (tableau I).

Tableau I : Répartition des actinomycètes dans la nature (Goodfellow et Williams, 1983).

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Sacchromonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

Le sol est la source d'une diversité étonnante de microorganismes. Il présente une grande densité de population actinomycétale. Plus de 40 genres des actinomycètes aérobies sont décrits presque chaque année. Numériquement, ils sont moins prédominants que les autres bactéries mais bien plus que les champignons (Harvey, 1999).

Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols et divers autres substrats. Il représente 80 à 95% du total des actinomycètes. (Lacey, 1973 ; Williams, 1978 ; Elwan et al., 1985). Après *Streptomyces*, les genres les plus fréquents sont *Nocardia* et *Micromonospora* (Dommergues et Mangenot, 1970). Les autres genres ne constituent qu'une fraction minime et sont parfois peu fréquents ou même assez rares. Ces microorganismes ont la capacité de produire une grande variété d'hydrolases extracellulaires qui leur donnent un rôle important dans la décomposition de la matière organique dans le sol (Valois et al., 1996).

Dans les sols sahariens, Les actinomycètes constituent entre 15 et 60% de la totalité des

microorganismes et peuvent même dépasser les 85% dans les horizons profonds des sols des palmeraies (Badji, 2006). Les genres prédominants dans ces sols, sont *Streptomyces* suivi de *Micromonospora* et *Nocardia*. Cependant, les sols sahariens sont caractérisés par une très grande diversité générique de telle sorte que l'on retrouve en quantité très appréciable (et parfois abondante) des genres pourtant peu fréquents, voir même assez rares dans le monde, comme *Actinomadura*, *Nocardioides*, *Nocardiosis*, *Saccharothrix*, *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Planomonospora*, *Oerskovia*, *Saccharomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*, etc. (Sabaou et al., 1998).

Les actinomycètes ont été également mentionnés dans les milieux marins. L'opinion selon laquelle des actinomycètes coloniseraient le milieu marin est très controversée. Selon les uns, les souches d'actinomycètes isolées de tels milieux ne seraient que des formes terricoles adaptées à la salinité de l'eau de mer ; selon d'autres, il existerait bien une flore d'actinomycètes propre aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale faible ; ainsi, certaines souches nocardioformes isolées à plus de 2000m de profondeur se développent sous les pressions hydrostatiques de 500 bars en présence d'eau de mer à 18°C (Weyland, 1981).

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport (Gazeko et al., 1998 ; Reponen et al., 1998). Les spores de certains actinomycètes se développent dans des matériaux détériorés provoquant, lorsqu'elles sont inhalées, des maladies respiratoires. Les spores d'actinomycètes thermophiles sont produites en grande quantité et sont facilement mises en suspension dans l'air, lors de manipulations de matériaux détériorés et leur dissémination se fait facilement grâce au mouvement de l'air (Mazodier, 1974).

3. Taxonomie des actinomycètes

3.1. Evolution de la taxonomie des actinomycètes

Au cours des années, la taxonomie des actinomycètes a connu plusieurs remaniements pour répondre à l'évolution progressive des critères de classification qui n'ont cessé de changer et qui ont permis de clarifier progressivement les ambiguïtés existantes dans la position taxonomique de plusieurs espèces et genres. Au cours de cette évolution, la systématique des actinomycètes a été caractérisée par quatre périodes distinctes :

Durant la première période, seuls les critères macro et micro morphologiques permettaient de différencier les genres entre eux. Ceci donna lieu à la création de nombreux genres dont les limites entre eux n'étaient pas toujours nettes ce qui créa beaucoup de confusion (Waksman,

1943 ; Couch et Bland, 1974). Cette période s'est étendue jusqu'au début des années 60, (Pridham et *al.*, 1958 et Tresner et *al.*, 1961).

La seconde période, qui a débuté à partir des années 60, a vu le développement de l'utilisation de la chimiotaxonomie basée sur la composition tels que les acides aminés (Becker et *al.*, 1964), les sucres cellulaires (Lechevalier et Lechevalier, 1970 a), les acides mycoliques, (Mordarska et *al.*, 1972), les phospholipides membranaires (Lechevalier et *al.*, 1977 ; Minnikin et *al.*, 1977), les ménaquinones (Collins et Jones, 1981) et les acides gras (Grund et Kroppenstedt, 1990). Le métabolisme cellulaire était négligé durant cette période et seulement environ une dizaine de tests physiologiques étaient impliqués dans la différenciation des espèces. Les critères chimiques, combinés aux descriptions morphologiques, se sont révélés jusqu'à l'heure actuelle, très efficaces pour l'identification des genres d'actinomycètes.

La troisième période, qui a débuté dans les années 70, avec une apogée entre 1980 et 1990, est caractérisée par l'avènement de la taxonomie numérique assistée par ordinateur, dans le but de clarifier l'identification des espèces de chaque genre. Contrairement à la période précédente, ici, le métabolisme cellulaire est d'une grande importance ; le principe consiste à traiter avec un logiciel approprié les résultats de plusieurs dizaines de tests physiologiques et biochimiques ; ce qui permet d'obtenir un dendrogramme montrant les pourcentages de similitude entre les espèces dont la position taxonomique a été clarifiée pour plusieurs d'entre elles (Goodfellow, 1971 ; Athalye et *al.*, 1985 ; Goodfellow et *al.*, 1990 et Grund et Kroppenstedt, 1990).

La dernière période, qui a débuté durant les années 80, consiste à l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires. L'hybridation ADN-ADN, le séquençage de l'ARN ribosomique 16S et 23S et la détermination du coefficient de Chargaff ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes (Stackebrandt et Kroppenstedt, 1987 ; Kinoshita et *al.*, 1999 et Hu et *al.*, 2004). Grâce au séquençage de l'ARN ribosomique 16S, certains genres bactériens non mycéliens furent inclus dans l'ordre des *Actinomycetales*, tandis que d'autres en furent exclus.

Actuellement, le phylum *Actinobacteria* tel qu'il figure dans le Manuel de Bergey (2007), renferme une seule classe : *Actinobacteria*. Cette classe est subdivisée en 5 sous classes, 6 ordres, 13 sous ordres dont 9 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*. On y trouve également 48 familles, 210 genres dont 188 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*) et près de 1711 espèces. Le genre *Streptomyces* à lui seul comprend 519 espèces (Justin et *al.*, 2003).

3.2. Critères actuels d'identification

3.2.1. Caractères morphologiques

Les caractères culturels contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinomycètes entre eux. Parmi ces caractères culturels importants :

La production d'un mycélium aérien (MA) ou non (ex *Actinoplanes*, *Micromonospora* et *Rhodococcus*) :

La présence ou non de mycélium du substrat (MS) et la couleur du MA et du MS.

La production et la couleur de pigments diffusibles dans le milieu de culture.

La fragmentation ou non des mycéliums.

La présence des spores (forme, mobilité, surface, disposition sur les hyphes, nombre) origine exogène ou endogène des spores (sporangies, des sporophores, des sclérotites ou de synnemata).

La micromorphologie de quelques genres principaux est schématisée dans la figure 1.

3.2.2. Critères chimiotauxonomiques

La chimiotauxonomie est un système de classification et d'identification basé sur des caractères chimiques permettant de grouper et de distinguer des microorganismes. Ces déterminations chimiques se montrent surtout efficaces pour délimiter des groupes et des genres. (O'donnell, 1982).

Les acides aminés pariétaux taxonomiquement importants, l'acide diaminopimélique (DAP), qui peut être sous deux formes isomériques, LL ou DL (*méso*), et la glycine qui est, soit présente ou absente (Lechevalier et Lechevalier, 1970a). Cependant, chez quelques genres d'actinomycètes, le DAP peut être remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diaminobutyrique (DAB) (Becker et *al.*, 1965 ; Yamagushi, 1965).

L'étude de la composition des parois cellulaires en glucides permet la séparation des actinomycètes en différents groupes. Les sucres diagnostiqués d'après Lechevalier et Lechevalier, (1970a) sont principalement les couples arabinose – galactose, arabinose – xylose, rhamnose galactose, ainsi que le madurose (ou 3-O-méthylgalactose) (Lechevalier et Gerber, 1970).

Chez certains genres d'actinomycètes, la composition en acides aminés et en sucres n'est pas suffisante pour leur identification. Pour cette raison, il est indispensable d'utiliser d'autres critères chimiques, essentiels pour la reconnaissance des genres, notamment la composition en lipides cellulaires. Les plus importants chez les actinomycètes sont les phospholipides, leur analyse a permis de distinguer plusieurs genres ayant entre eux même morphologie et le même

type pariétal (Lechevalier *et al.*, 1977). Les acides mycoliques, les ménaquinones et les acides gras ont permis de confirmer les résultats obtenus sur les phospholipides et ainsi de distinguer de plusieurs genres entre eux (Lechevalier *et al.*, 1986).

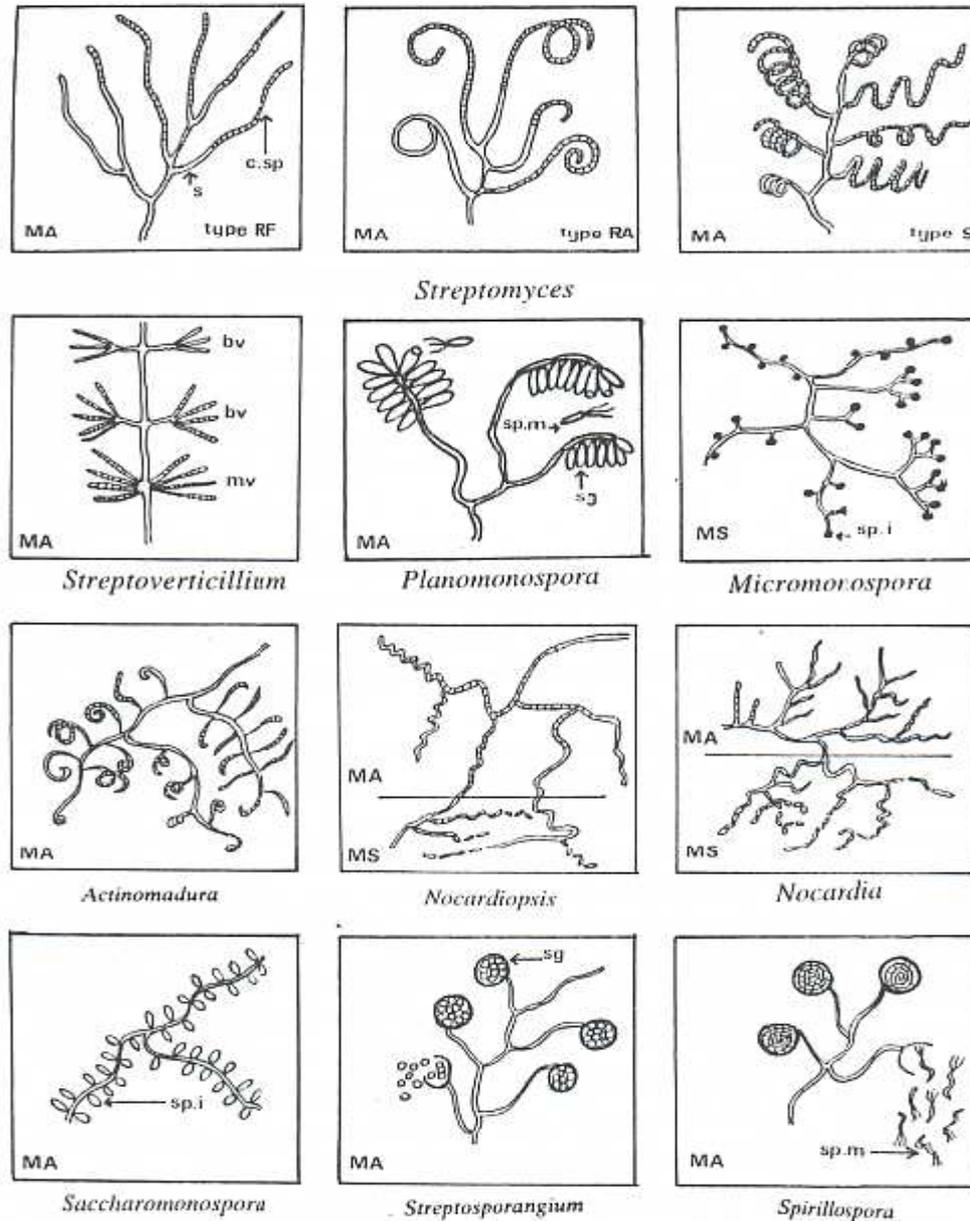


Figure 1 : Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes (Zitouni, 2005).

MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat; RF, *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses); RA, *Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles fermées); S, *Spira* (chaînes spiralées); s, sporophore; c. sp.; chaînes de spores; sp. i.; spores isolées; sp. m.; spores mobiles; sg., sporanges.

3.3.3. Critères physiologiques

En plus des caractères morphologiques, la détermination des espèces se base sur les caractères physiologiques. Ces derniers consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques, polymères complexes, etc. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, salinité, etc.).

Bien que les tests physiologiques aient été utilisés depuis très longtemps, en même temps que la description morphologique, leur efficacité réelle n'est apparue que lorsqu'ils sont utilisés dans le cadre d'une taxonomie numérique (Athalye et *al.*, 1985) qui a permis de surmonter les difficultés inhérentes aux interprétations des grands résultats obtenus. Ces caractères physiologiques discriminants permettent de différencier les espèces appartenant à un même genre. Cependant, ils ne sont pas suffisants pour l'identification des espèces, car ils doivent être complétés par des études moléculaires (Goodfellow, 1971).

3.3.4. Critères moléculaires

Les analyses moléculaires sont très importantes pour retracer les parentés phylogénétiques des souches et pour la détermination des espèces. Ces analyses ont permis de regrouper ou de séparer ces espèces entre elles, et de proposer la création de nouvelles espèces (Lamari, 2006). Les principales techniques utilisées sont, le séquençage de l'ADN ribosomique 16S, l'hybridation ADN-ADN, et le pourcentage en guanine-cytosine.

4. Importances industrielles des actinomycètes

Des procédés exploitant certaines caractéristiques de microorganismes ont été développés, soit pour dégrader de nombreuses molécules organiques ou minérales pour la dépollution, soit pour la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires ayant des valeurs ajoutées et des activités biologiques très importantes. Pour cette raison, les actinomycètes suscitent un intérêt particulier dans divers domaines dues à leur capacité de synthétiser de nombreux métabolites secondaires biologiquement actifs et enzymes (Tableau II) (Oskay et *al.*, 2004), cet intérêt incite les chercheurs et spécialistes à les isoler afin d'obtenir de nouvelles molécules intéressantes.

Tableau II : Nombre approximatif de produits microbiens bioactifs (2002) d'après Berdy (2005).

Source	Antibiotiques	Autres métabolites bioactifs	Total des métabolites bioactifs	Métabolites utilisés (en thérapie humaine)	Métabolite inactifs
Bactéries (autres)	2900	900	3800	10-12 (8-10)	3000 à 5000
Actinomycétales	8700	1400	10100	100-120 (70-75)	5000 à 10000
<i>Streptomyces sp.</i>	6550	1080	7630		
Actinomycétales rares	2250	220	2470		
Champignons	4900	3700	8600	30-35 (13-15)	2000 à 15000
Total	16500	6000	22500	140-160 (100)	20000 à 25000

Depuis plusieurs décennies, les actinomycètes représentaient une source importante de divers métabolites antimicrobiens. Approximativement deux-tiers d'antibiotiques naturels ont été isolés des actinomycètes, et environ 75% sont produits par des souches appartenant au genre *Streptomyces*. (Saadoun et Gharaibeh, 2003 ; Oskay et al., 2004 ; Anansiriwattana et al., 2006 et Boudjella et al., 2007). Il est à l'origine de la majorité: plus de 50 % du total des antibiotiques et près de 80 % de ceux sécrétés par les actinomycètes (Hayakawa et al., 2004 ; Oskay et al., 2004).

Par ailleurs 80% des antibiotiques commercialisés proviennent de ce genre (Thakur et al., 2007) à savoir: la streptomycine, la novobiocine, la nystatine, etc.

L'hétérogénéité métabolique des actinomycètes et leur diversité écologique assez exceptionnelle font d'eux des producteurs potentiels de nouvelles activités et spécificités enzymatiques (Peaczinska-czoch et Mordarski, 1988). Après les antibiotiques, les enzymes représentent le second grand groupe de produits industriels synthétisés par les actinomycètes. En effet, ce sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que des protéases, des chitinases (Tanaka et Omura, 1990 ; Vonothini et al., 2008), des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (Park et al., 2002).

A titre d'exemple : la D-xylose isomérase, plus connue sous le nom de glucose isomérase, produite par l'espèce *Actinoplanes missouriensis* et plusieurs espèces de *Streptomyces*, est utilisée pour obtenir des sirops riches en D-fructose.

Un complexe amylasique issu de *Streptomyces hydroscopicus* et *S. praecox* a été exploité pour préparer des sirops riches en maltose.

Les protéases d'actinomycètes sous forme libre ou immobilisées sont employées dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, en tannerie et comme additifs dans les détergents (ex : pronase de *S. griseus*) (Theilleux, 1993).

Par ailleurs, les actinomycètes produisent de fortes quantités de chitinases et de β -1-3 glucanases et causent des plasmolyses et des lyses des parois cellulaires des pathogènes (Conn, 2005). D'après Park et *al.* (2002), les chitinases produites et sécrétées par les actinomycètes agissent sur les cuticules des nématodes adultes et provoquent ainsi leur mort. Notamment l'espèce *Streptomyces coelicolor* qui sécrète de nombreuses hydrolases incluant : 60 protéases/peptidases, 13 chitinases/chitosanases, 8 cellulases/endoglucanases, 3 amylases et 2 pectates lyases (Bentley et *al.*, 2002).

Les inhibiteurs d'enzymes ont également reçu une attention toute particulière pour leur utilisation potentielle en pharmacologie. Sivakumar et *al.* (2007), ont rapporté que Imada, (2004) a mis en évidence de nombreux types d'inhibiteurs d'enzymes tels que ceux de la β -glucosidase et de l' α -amylase.

Certaines enzymes produites par les actinomycètes sont utilisées dans la dégradation des hydrocarbures (Dixit et *al.*, 2000), le phénol dans les industries textiles et des teintures (Bhathena et *al.*, 2002), le traitement des emballages (ex.: pimaricine) et d'autres pour la protection de certains fromages (Vandamme, 1985).

CH II : LES CELLULASES

1. La cellulose

La cellulose est le matériel structural de base des parois cellulaires des végétaux supérieurs. C'est la substance naturelle la plus abondante sur terre, dont la production mondiale est estimée à 20 milliards de tonnes (Arnaud et Guiraud, 1999).

La cellulose est un polymère linéaire, constitué d'unités de D-glucopyranose reliées par des liaisons β (1-4) (Figure 2). Elle présente une configuration chaise, permettant aux groupements hydroxyles de se trouver en position équatoriale avec une stabilité du polymère. La grandeur de la chaîne moléculaire est habituellement caractérisée par le degré de polymérisation (DP), correspondant au nombre de motif de β -D- glucose, qui est de l'ordre de 10000 (Arnaud et Guiraud, 1999).

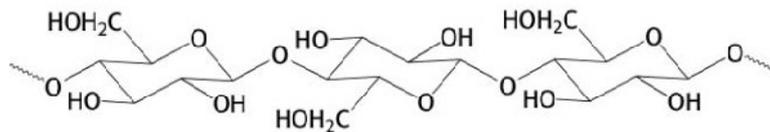


Figure 2 : Structure chimique partielle de la cellulose

La composition de différents matériaux lignocellulosique en cellulose est présentée dans le tableau suivant.

Tableau III : Composition en cellulose de différents matériaux lignocellulosiques (Howard et *al.*, 2003).

Matériaux lignocellulosiques	Cellulose %	Hémicellulose %	Lignine %
Bois dur	40-45	24-40	18-25
Bois tendre	45-50	25-35	25-35
Coquille de noix	25-30	25-30	30-40
Epis de maïs	45	35	15
Papier	85-99	0	0-15
Paille de blé	30	50	15
Paille de riz	32.1	24	18
Papier de journal	40-55	25-40	18-30
Gazon	25-40	25-50	10-30

La présence de nombreux groupements hydroxyles confère à la chaîne de cellulose une grande tendance à former des liaisons hydrogènes intramoléculaires à l'intérieur d'une même chaîne ou intermoléculaires entre deux chaînes différentes constituant ainsi des micro-domaines hautement organisés. Ces liaisons d'hydrogènes sont responsables de la formation des microfibrilles rigides et insolubles (Hasper et *al.*, 2002).

Cette chaîne de cellulose est constituée de deux types de structures (Baumgartner, 1949) :

- Des structures cristallines de chaînes associées, par des liaisons hydrogènes difficiles à rompre
- Des structures amorphes, sans cohésion et plus faciles à hydrolyser.

Certains auteurs estiment que la cellulose peut se présenter sous différents états (Bisaria et Chose, 1981) et classent la structure de la cellulose en deux groupes:

-La cellulose I : appelée aussi native, qui est une molécule synthétisée par les êtres vivants. Les chaînes de cette cellulose s'organisent parallèlement d'une manière à ce que toutes les extrémités réductrices des molécules soient organisées d'une façon antiparallèle, elle est présente dans le coton et le bois.

La cellulose II : correspond à une réorganisation des chaînes par des traitements chimiques ou thermiques de la cellulose native.

Parmi la grande variété des dérivés cellulosiques, on peut distinguer deux groupes principaux en fonction du type de substituant : ce sont les dérivés esters et les dérivés éthers.

- Les esters de cellulose sont formés par estérification des groupements hydroxyles libres de la cellulose au moyen d'un plusieurs acides.

-Les éthers de cellulose sont obtenus par la substitution des groupements hydroxyles par des groupements éthers.

La carboxyméthylcellulose (C.M.C) est l'éther de cellulose dont la production est la plus importante. La réaction se produit entre l'alcali-cellulose et le chloroacétate de sodium ou l'acide chloroacétique. Les principales propriétés de la C.M.C qui déterminent son utilisation ultérieure résident dans son caractère hydrophile, sa forte viscosité en solutions aqueuses, ses bonnes propriétés à former des films, son innocuité et son excellent comportement comme colloïde et adhésif (Alais et Linden, 1997).

2. Les cellulases

L'intérêt porté aux cellulases a considérablement augmenté ces dernières années à cause de l'utilisation de ces enzymes pour l'hydrolyse du matériel cellulosique prétraité en sucre, qui peut

être à son tour fermenté en d'autres produits comme le bioéthanol. La plupart des cellulases utilisées dans la biotechnologie dérivent des bactéries et moisissures mésophiles (Wang *et al.*, 2009).

Les cellulases sont des enzymes extracellulaires inductibles synthétisés par les microorganismes durant leur croissance sur le matériel cellulosique (Kim *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2006). Elles ont une action sur les substrats cellulosiques, solubles et insolubles.

Les cellulases sont les seules enzymes qui peuvent briser les liaisons β -(1, 4) des polysaccharides de cellulose en glucose. Elles donnent un grand rendement de saccharification 90 - 98 % et leur utilisation peut produire des effluents favorables pour l'environnement (Aftab et Vermette, 2008).

2.1. Structure des cellulases

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (Beldman *et al.*, 1985). Elles ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts : Le site catalytique et le site de fixation du substrat ou CDB (cellulose binding domain). Ces sites sont habituellement reliés entre eux par un peptide glycosylé flexible riche en Ser / Pro et Thr appelé « linker » (Figure 3) (Cavako-Paulo, 1998 ; Receveur *et al.*, 2002 ; Hasper *et al.*, 2002). La présence du domaine de fixation est essentielle pour la dégradation de la cellulose cristalline de coton, car elle augmente la concentration de l'enzyme autour du substrat et de ce fait améliore la catalyse enzymatique (Din *et al.*, 1991 ; Boraston *et al.*, 1998).

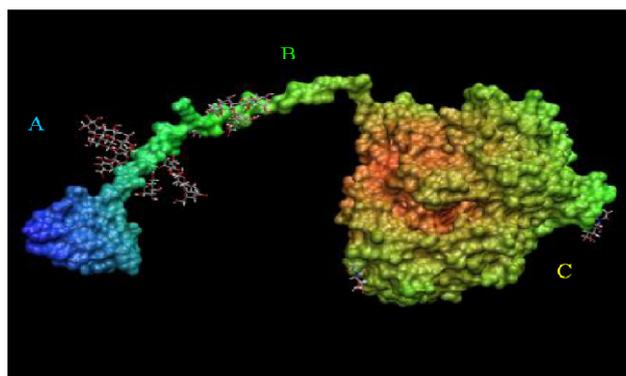


Figure 3 : Exocellulase CBH I (Cel7A) de *Trichoderma reesei* (John *et al.*, 2005)

A : le site de fixation, B : le « linker » glycosylé, C : le site catalytique.

Le modèle « domaine catalytique-domaine de fixation à la cellulose » ou CBM (carbohydrate binding module) est le plus souvent rencontré pour les systèmes excrétés. Les CBM facilitent l'hydrolyse de la cellulose en assurant l'ancrage du site catalytique sur le substrat. Leur rôle est particulièrement important pour l'initiation de l'action des cellobiohydrolases et leur processivité. Ils sont localisés aux extrémités de la protéine. Les CBM interviennent aussi dans la déstructuration des fibrilles de cellulose. Ils sont souvent uniformes avec une face hydrophile et une face hydrophobe.

Les sites catalytiques ont une configuration en crevasse pour les endoglucanases et en tunnel pour les exoglucanases afin de permettre le déplacement de l'enzyme le long de la chaîne de cellulose. Les microorganismes cellulolytiques possèdent plusieurs enzymes de types endo et exo afin de pouvoir agir sur les zones amorphes et cristallines (Ballerini et Alazard-Toux, 2006).

2.2. Classification des cellulases

Les cellulases appartiennent aux O-glycoside hydrolases (EC 3.2.1.-), qui sont des groupes d'enzymes largement répandues hydrolysant les liaisons glycosidiques entre deux ou plus de carbohydrates ou entre un carbohydrate et une fraction non-carbohydrate. L'IUB de la nomenclature d'enzymes (EC-number) est basée sur le type de réaction que les enzymes catalysent et sur leurs substrats spécifiques. Il y a deux sortes de mécanismes de découpage pour les glycosides hydrolases, conduisant à une rétention d'ensemble ou d'une inversion de la stéréochimie au point de clivage; le mécanisme semble être conservé au sein de chaque famille. Ainsi les domaines catalytiques des GHs dans une famille ont la même fraction tridimensionnelle et manifeste la même stéréospécificité de l'hydrolyse. La classification initiale regroupait les cellulases et les xylanases en 6 familles (A-F) (Henrissat et al., 1989) puis s'est élargie à 77 familles en 1999 (1-77). Actuellement, Il y a 100 familles de GHs, avec les cellulases qui se trouvent parmi les 13 premiers (Voget et al., 2006).

2.3. Les systèmes enzymatiques

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose, appelées communément cellulases, sont soit sécrétées dans le milieu, soit associées à la surface externe des microorganismes formant des systèmes complexes appelés cellulosomes (cas des bactéries anaérobies).

Les cellulases ont d'abord été classées selon leur mode d'action catalytique. Elles sont maintenant aussi classées selon leur structure, comme toutes les enzymes agissant sur les sucres (Ballerini et Alazard-Toux, 2006).

Toutes ces enzymes travaillent synergiquement pour hydrolyser la cellulose en créant de nouveaux sites accessibles pour chacune d'entre elles en enlevant les obstacles et réduire les produits d'inhibition (Zhou et *al.*, 2009).

2.3.1. Les Endoglucanases

Les endoglucanases (EG) (EC 3.2.1.4, EG I, EG II, EG III, EG IV, et EG V) ou 1,4- β -D-glucanases ou carboxyméthylcellulases sont capable d'hydrolyser au hasard les liaisons internes β (1-4) de la chaîne cellulosique au niveau des régions amorphes, en créant de nouvelles extrémités non réductrices qui deviennent à leur tour des sites réactifs pour les cellobiohydrolases (Hasper et *al.*, 2002).

Ce sont donc les premières enzymes qui attaquent la matière cellulosique, en coupant les longues chaînes de cellulose en chaînes plus courtes en produisant du cellobiose, des cellodextrines et du glucose. Elles sont très actives sur la cellulose soluble dont l'activité est d'autant plus importante que le degré de polymérisation est élevé. Par contre, son activité est très faible sur la cellulose cristalline (Hasper et *al.*, 2002).

Il s'agit d'une enzyme à large spectre, qui peut hydrolyser un large éventail de différents matériaux cellulosique tels que la cellulose, l'hémicellulose et la carboxyméthylcellulose (CMC) (Arja, 2004).

2.3.2. Les Exoglucanases

Les Exoglucanases (EC 3.2.1.91), également connues sous le nom de cellobiohydrolases (CBH, CBH I et CBH II), sont des enzymes processives qui attaquent les deux extrémités de chaque chaîne courte de polysaccharide de la région cristalline de la cellulose en provoquant une réduction lente du DP. Le produit final serait encore hydrolysé en cellobiose, un dimère de glucose. La structure des exoglucanases a deux domaines fonctionnels, le domaine catalytique et le domaine de liaison-cellulose, qui sont reliés par les liaisons peptidiques. CBH I attaque les extrémités réductrices de la cellulose, et CBH II attaque les extrémités non-réductrices (Arja, 2004 et Lee et *al.*, 2006). Les poids moléculaires de nombreux cellobiohydrolases purifiées se situent dans la gamme de 41 à 65 KDa, et leur point isoélectrique est acide (Hasper et *al.*, 2002). l'hydrolyse enzymatique de la cellulose par les cellobiohydrolases est schématisée dans la figure 4.

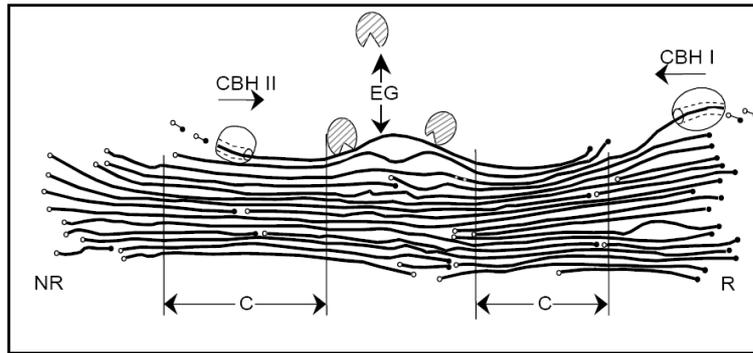


Figure 4 : l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Les deux Cellobiohydrolases (CBH) attaquent les surfaces cristallines aux deux extrémités opposées et les Endoglucanases attaquent au milieu dans les régions désordonnées de cellulose (Arja, 2004).

R : représente les extrémités réductrices, NR : représente les extrémités non réductrices.

C : indique les régions cristallines fortement organisée.

2.3.3. Les β -glucosidases

Les β -glucosidases (EC 3.2.1.21, BGL I et BGL II) appelée également 1,4- β -D-glucanases ou β -D- glucoside glucohydrolases, hydrolysent la liaison β - glucosidique du cellobiose et libèrent deux molécules de glucose. Elles peuvent avoir une action de conversion sur les unités de glucose en formant les alcools, ainsi que les oligosaccharides supérieurs : cette propriété peut être importante dans l'induction des cellulases ou dans la biosynthèse de dérivés de sucres spéciaux. La plupart des β -glucosidases sont fortement inhibés par le glucose et par l'excès de substrat. L'inhibition par les produits finis peut être compétitive ou non compétitive, tout dépend de la source inhibitrice (Arnaud et Guiraud, 1999).

Comme les enzymes de β -glucosidases sont les seules enzymes du système de cellulases qui peuvent hydrolyser le cellobiose, ils ont un rôle vital à jouer dans la dégradation de la cellulose. La plupart des β -glucosidases purifiées ont été identifiées comme étant des glycoprotéines avec des poids moléculaires allant de 40 à 400 kDa (Candace et Weimer, 1991).

2.4. Source et origines des cellulases

Les cellulases sont largement répandues dans la nature. Bien que retrouvées chez certains animaux et plantes, parasites de végétaux ou saprophytes dans le sol, les cellulases sont largement distribuées chez les microorganismes. De plus, les cellulases microbiennes sont très variées, avec de grandes différences dans leur structure, leurs propriétés physicochimiques et leurs activités catalytiques.

Les cellulases ont été retrouvées chez les levures, les moisissures et les bactéries, mais plus fréquemment chez ces deux dernières. Chez les moisissures les cellulases sont fréquemment

isolées à partir des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma*. Chez les bactéries, elles sont souvent isolées à partir de *Streptomyces* chez les actinomycètes et les genres *Bacillus* et *Clostridium* chez les autres bactéries (Candace et Weimer 1991).

Tableau IV : Les microorganismes producteurs de cellulases

Microorganismes	Masse moléculaire KDa	pH	Température T° (C)	Référence
<i>Bacillus subtilis</i> YJ1	32.5	6	60	Yin et al., 2010
<i>Bacillus sp.</i> KD1014	32	6	60	Lee et al., 1999
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DL-3	54	7	50	Lee et al., 2008
<i>Sinorhizobium fredii</i>	94	7	35	Chen et al., 2004
<i>Streptomyces omiyaensis</i>	85	6.5	45	Alam et al., 2004
<i>Stachybotrys sp</i>	170	5	50	Amouri et Gargouri, 2006
<i>Penicillium purpurogenum</i>	37	5	70	Mi Lee et al., 2010
<i>Penicillium verruculosum</i>	32	4	40	Yang et al., 1996
<i>Aspergillus aculeatus</i>	45	5	40	Naika et al., 2007
<i>Mucor circinelloides</i>	27	4-6	55	Saha, 2004

2.5. Mécanisme d'action

L'hydrolyse enzymatique des liaisons glycosidiques s'effectue par un mécanisme acide-base, impliquant deux résidus catalytiques. Le premier résidu catalytique donne un proton à l'oxygène de la liaison glycosidique, le second intervient comme nucléophile (Sinnott, 1990).

La grande majorité des cellulases agissent selon un mécanisme de double déplacement permettant la formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme qui est ensuite hydrolysé par l'ion oxocarbone. La réaction se poursuit par la formation d'un groupe hydroxyle à partir d'une molécule d'eau sur l'intermédiaire carbonium, et d'un proton sur le nucléophile. Ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat (Gebler et al., 1992).

Généralement, l'hydrolyse des liaisons glycosidiques β (1-4) de la cellulose se fait avec rétention de la configuration du carbone anomérique (Gebler et al., 1992). Les produits d'hydrolyse peuvent avoir comme conséquence l'inversion ou la conservation (double mécanisme de rechange) de la configuration anomérique du carbone-1 à l'extrémité réductrice (Birsan et al., 1998 ; Ooshima et al., 1990 et Withers, 2001).

La nature insoluble de la cellulose représente un défi pour les systèmes cellulases. Pour s'y adapter la plupart des cellulases ont une structure modulaire facilitant la fixation de l'enzyme à la surface de la cellulose afin amorcer l'hydrolyse de la cellulose. Le système de cellulases montre une activité collective plus élevée que la somme des activités de différentes autres enzymes, un phénomène connu sous le nom de synergie (Lynd et *al.*, 2002).

Bien qu'il y a eu des recherches considérables sur les cellulases depuis la fin de la 2^{ème} guerre mondiale, il y'a toujours des vides sur les connaissances des mécanismes d'hydrolyse de la cellulose cristalline notamment le mécanisme par lequel la cellulase coince les segments des chaines de microfibrilles de cellulose dans leurs sites actifs. La connaissance de cette étape est très importante pour créer des cellulases avec une forte activité sur les substrats réels de cellulose (Wilson, 2009). le mécanisme d'hydrolyse de la cellulose est présenté dans la figure 5.

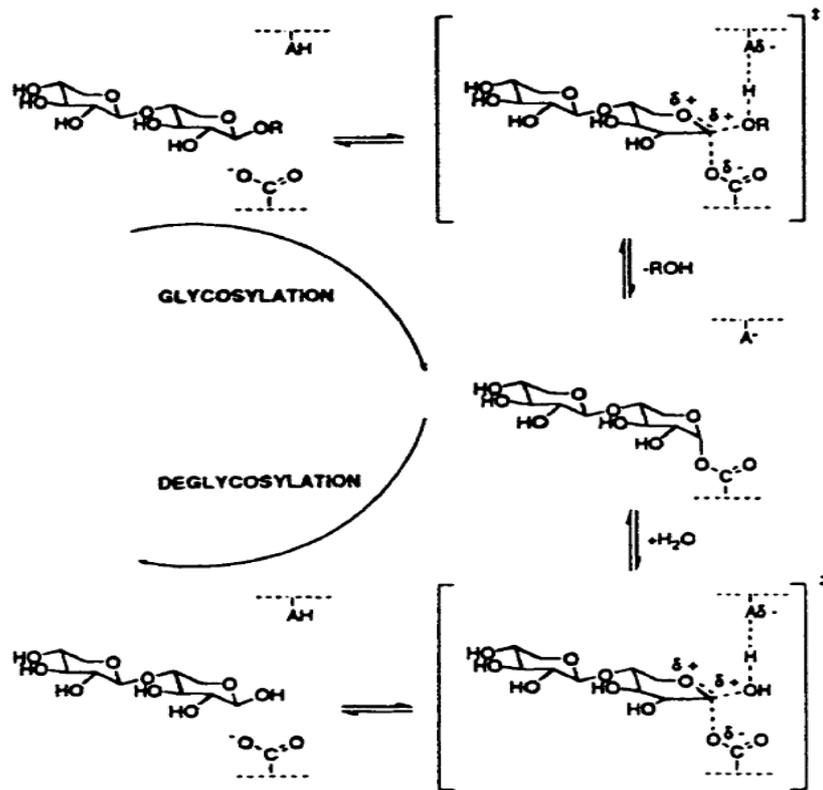


Figure 5: Mécanisme d'hydrolyse proposé pour les glycosyl hydrolases (Lawson et *al.*, 1996).

3. Méthodes et techniques d'étude

Le choix des méthodes et des techniques, dans la recherche de nouvelles cellulases, est guidé par le souci de réunir des conditions physicochimiques similaires à celles de l'industrie cible. Ceci conduit à exercer une pression sélective pour isoler et sélectionner des souches productrices de cellulases hautement actives dans ces conditions.

3.1. Mesure de l'activité enzymatique

La mesure de l'activité cellulase a été utilisée pour quantifier la vitesse de l'hydrolyse de la cellulose dans différents systèmes biologiques (Miller, 1959). Cette activité est mesurée par la production des groupes terminaux des sucres réducteurs, et qui est une indication de l'efficacité de la réaction d'hydrolyse de la cellulose (Lai *et al.*, 2006).

Pour quantifier les activités des cellulases, les essais enzymatiques ont été faits en général sur la cellulose pure ou ses dérivés. Les valeurs de l'unité enzymatique sont basées sur la conversion limite du substrat. Le cellobiose et la carboxyméthylcellulose sont utilisés comme substrats quand on quantifie l'activité de la β -glucosidase et l'endoglucanase. Le coton et les cellodextrines peuvent être utilisés comme substrats quand on mesure l'activité des exoglucanases (Ghose et Sahai, 1997).

L'action des cellulases sur une solution de cellulose aboutit à la libération de sucres réducteurs. Ces derniers donnent lieu en réduisant certains réactifs chimiques à des produits chromogènes. L'intensité de la couleur formée, qui est fonction de la quantité des sucres libéré, est traduite par des mesures spectrophoto-métriques en activité enzymatique (Ghose et Sahai, 1997). Deux méthodes sont couramment utilisées ; la méthode à l'acide dinitrosalicylique (Sumner, 1921 ; Miller, 1959 et Baily *et al.*, 1992) et la méthode au réactif de Folin-Cieucaltea (Somogyi, 1951).

3.2. Propriétés physicochimiques des cellulases

Les propriétés physicochimiques des cellulases sont celles qui sont requises pour leur applications dans l'industrie ciblée. Les principales propriétés étudiées sont l'activité et la stabilité enzymatique à différents pH et températures, l'activité en présence de différents ions, la spécificité de substrat et les propriétés moléculaires (poids moléculaire et point isoélectrique) (Ratanakhanokchai *et al.*, 1999). Les mêmes méthodes de mesure d'activité cellulase sont utilisées dans cette caractérisation.

Les cellulases montrant des propriétés requises pour une éventuelle application dans l'industrie cible feront l'objet d'études sur leur production et leur application. A ce stade de recherche, des considérations d'ordre économique, à savoir le coût de production de ces enzymes et les avantages économiques tirés de leur application, déterminent en grande partie les possibilités d'application effective de ces enzymes en industrie.

3.3. Production de cellulases

3.3.1. Les conditions de culture affectant la production de cellulase

La production de cellulase est un facteur majeur dans l'hydrolyse de matières cellulosiques. Il est donc essentiel de rendre le procédé économiquement viable. Beaucoup de travaux ont été fait pour la production de cellulases à partir de la matière lignocellulosique (Adsul *et al.*, 2007).

Les conditions de culture ont différents caractères qui peuvent influencer la production de cellulase. La différence entre les facteurs intrinsèques : le pH, la température, la vitesse d'agitation, la concentration en oxygène dissout et l'état du substrat sont inhérents au processus.

- **Techniques de culture**

Premièrement, l'état du substrat modifie la propriété de solution. Le substrat pourrait être sous forme solide ou liquide lorsqu'il est appliqué dans le processus. Par exemple, le matériel cellulósique solide était couramment utilisé à la fois comme source de carbone - substrat énergétique et la source d'inducteurs pour le processus de fermentation.

Toutefois, l'utilisation de substrats solides, peut être la cause de certains problèmes pour le fonctionnement et la productivité dans le processus de production de cellulases. Les solides alourdissent la charge de l'agitation et la viscosité élevée est préjudiciable à l'efficacité de l'approvisionnement en oxygène dans les bioréacteurs. Un manque d'alimentation en oxygène, à son tour, réduit la concentration des cellules aptes à la productivité. Les substrats solubles et les inducteurs par contre peuvent favoriser la production de cellulases en fournissant de meilleures conditions à l'égard de la culture en respectant notamment la demande en oxygène dissout et la viscosité.

- **L'effet du pH**

Le pH est connu pour sa grande influence sur les enzymes et sur le métabolisme des cellules. A cause de la sensibilité des enzymes intracellulaires au pH, il est nécessaire d'avoir un

pH intracellulaire constant pour que la catalyse des réactions par les enzymes.

Durant le processus de fermentation le pH diminue, dans ce cas on doit le contrôler régulièrement. Une variation sensible du pH du milieu peut modifier le pH cytoplasmique, ce qui pourrait causer la dénaturation de la fonction des protéines intracellulaires et diminution du taux d'hydrolyse de la cellulose et, par conséquent, sur la production de cellulase.

- **La concentration en oxygène dissout**

L'oxygène dissout est un autre élément clé de la production de cellulases. Il est exigé pour la croissance des cellules de la plupart des Eucaryotes. C'est un électron accepteur pour la respiration lors de l'utilisation des sucres. Le transfert d'oxygène est toujours limité dans les cultures filamenteuses. Lorsqu'il y a une insuffisance d'oxygène, les cellules cessent de croître et de produire des cellulases. Par la suite, les cellules seront asphyxiées, et meurent rapidement. En outre, la morphologie des cellules varie lorsque la quantité de l'oxygène dissout change. Par exemple, à faible teneur à moins de 30% en oxygène dissout, les cellules peuvent prendre une forme granulée, qui donne une mauvaise production de la cellulase. En anaérobiose, le manque d'oxygène peut également provoquer la sporulation. Ceci est une condition défavorable à la production de cellulases.

D'autres part, l'apport excessif en oxygène peut causer une hyper oxydation, qui engendre beaucoup de radicaux d'oxygène ou les espèces d'oxygène tel que : HO_2 , H_2O_2 , HO .

- **La vitesse d'agitation**

L'agitation mécanique est nécessaire, elle conditionne directement la croissance des cellules et la production de cellulases en régulant l'apport d'oxygène et la distribution uniforme des nutriments. Une meilleure distribution des nutriments qui ne se fait pas en absence de celle-ci, permet à chaque cellule d'avoir les mêmes chances d'avoir ses nutriments, et il n'y a pas d'espace mort ou de cellules séparées dans le bioréacteur. Dans ces conditions, on aura un même taux de production de cellulases et la même vitesse de croissance pour chaque cellule. Par ailleurs, la grande force générée par l'agitation va provoquer, la rupture des bulles d'air, pour donner de petites de bulles ce qui augmente le taux de transfert de la masse d'oxygène.

3.4. Composition du milieu de culture

La composition du milieu de culture influence le taux de croissance de la souche et la production de cellulases. Différentes sources de carbone, d'azote, de phosphore, de fer et d'oligoéléments (Mg^{3+} , Ca^{2+} ,...) peuvent être testées à différentes concentrations. Un milieu optimal de production de cellulases est celui permettant une production accrue de ces enzymes à moindre coût. Les sources de carbone couramment testées sont les hexoses et pentoses (maltose, arabinose, glucose, galactose,...), les polysaccharides (cellulose, amidon, xylane,...). Les sources d'azote testées sont certaines sources organiques (peptones, extrait de levure, caséine,...) ou minérales (Jaradat et *al.*, 2008).

4. Applications industrielles des cellulases

L'intérêt que porte la biotechnologie à la cellulase s'explique par ces vastes applications. En effet, son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermenté permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques d'où l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases (Receveur et *al.*, 2002).

- **Industries alimentaires**

Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993). Les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes, le plus souvent en association avec les pectinases pour la digestion qui précède les extractions pour améliorer la qualité des produits (protéines de soja, amidon de pomme de terre ou de maïs, jus de fruits, huiles végétales etc.) (Odier et Rouau, 1985). Les cellulases améliorent également l'arôme des jus de fruits et du vin (Riccio et *al.*, 1999).

- **Industries des textiles et des détergents**

Depuis 1990, les textiles et les détergents constituent les plus grands marchés mondiaux pour l'utilisation des cellulases. Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements de type Jean après lavage et améliore l'apparence des tissus par élimination des tâches. Elles sont utilisées aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (Maurer, 1997 ; Cavako-Paulo, 1998) des fibres et dans la préparation de « stone washed jeans » (Scriban, 1993; Ando et *al.*, 2002). Elles sont actuellement additionnées aux détergents pour enlever les fibres endommagées (poils, peluche) des tissus de coton ainsi que la crasse attachée fortement aux poils (Wilson, 2009).

- **Papeterie**

Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1993). Elles contribuent également à l'amélioration de la qualité du papier (Odier et Rouau, 1985).

- **Nutrition animale**

C'est un autre marché pour ces enzymes utilisées comme additifs dans l'alimentation animal. L'addition des cellulases, aux aliments pour volailles ou porcins, améliore leur digestibilité, réduit l'excrétion de la cellulose non digérée, diminue par la même la charge polluante des excréta et améliore la valeur nutritive de l'aliment (Kolarova et Farkas, 1981 ; Odier et Rouau , 1985).

- **Production du bioéthanol**

La conversion de la lignocellulose en bioéthanol est devenue une priorité mondiale pour produire de l'énergie renouvelable à un prix raisonnable. Le bioéthanol peut être utilisé pour oxygéner le carburant en élevant son contenu en oxygène, permettant ainsi une meilleure oxydation des hydrocarbures et une réduction des gaz à effet de serre dans l'atmosphère. Le bioéthanol produit à partir de matières organiques, abondantes et inépuisables, telles que la biomasse lignocellulosiques, est l'une des alternatives proposées (Gray *et al.*, 2006).

Dans ce processus de production, l'éthanol est issu de la fermentation des sucres fermentescibles résultant de la dégradation des matières lignocellulosiques. La production de ce biocarburant se déroule en trois étapes (Fig. 6). Dans un premier stade, les matières lignocellulosiques subissent un prétraitement thermochimique qui détruit leur structure rigide. Des cellulases sont utilisées dans une deuxième étape pour hydrolyser la cellulose et libérer du glucose. Ce dernier sera, dans une troisième étape, fermenté en éthanol par des microorganismes (Gray *et al.*, 2006).

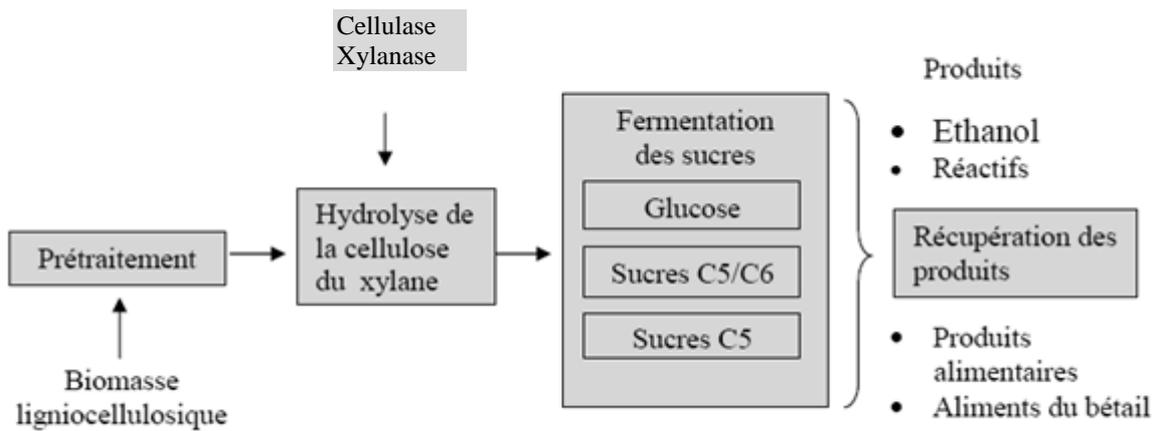


Figure 6 : Processus de production du bioéthanol (Gray *et al.*, 2006).

- **Domaine thérapeutique**

Certaines cellulases sont utilisées dans des formules médicamenteuses comme aides digestives .Ainsi, des cellulases de *Trichoderma viridae* sont utilisées en association avec des amylases fongiques, pour éviter les dyspepsies et fermentations intestinales (Rivière, 1975). (Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1993).

CH I : MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériel biologique

Les isolats d'actinomycètes étudiés (80 souches) proviennent de la collection du laboratoire de Biochimie microbienne de l'université A/MIRA de Bejaia.

Ils sont isolés à partir de 6 échantillons de sol dont trois sur le site de la décharge de Boulimat (Bejaia), deux à partir de sols forestiers au niveau de deux sites : Boulimat (Bejaia) et Tikdjda (Bouira) et un échantillon à partir d'un sol saharien (Boussaâda).

Les souches d'actinomycètes, ont été conservées sur gélose inclinée dans le milieu Williams (M2) à une température de 4°C (Bouhachiche et *al.* 2005). Puis Les souches ont été repiquées dans le milieu William par la méthode des stries serrées à la surface de la gélose, et incubées à 28°C pendant 8 jours.

La composition de ce milieu est donnée en annexe.

2. Criblage des souches d'actinomycètes productrices de cellulases

2.1. Sur milieu solide

L'activité cellulasique des isolats a été évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur un milieu contenant le Carboxyl Methyl Cellulose (CMC) comme seule source de carbone. Composition du milieu (g/l) : CMC 7 ; NaNO₃ 1.2 ; KH₂PO₄ 3.0 ; K₂HPO₄ 6.0 ; MgSO₄,7H₂O 0.2 ; CaCl₂ 0.05 ; MnSO₄,7H₂O 0.01 ; Zn SO₄,7H₂O 0.001, extrait de levure 1.0 ; NH₄CL 2 ; NaCl 2.

Cette méthode consiste à ensemercer les souches à tester sur milieu Williams (modifié) et incubé pendant 5 jours à 28°C. Après incubation, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètres sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte pièce et déposés à la surface du milieu CMC. La révélation de l'activité CMCcase est réalisée après incubation des boîtes dans les mêmes conditions avec une solution de rouge Congo à 0.1% (p/v) pendant 20 min suivi de lavage avec une solution de NaCl à 1M pendant 15 min (Ninranjane et *al.*, 2007).

La visualisation des halos oranges claires autour des cylindres sur un fond rouge correspond aux zones d'hydrolyse de la CMC.

2.2. Sur milieu liquide

Pour chaque souche, une préculture est préparée dans des tubes à essai contenant 2 ml de milieu CMC.

Cette préculture sert à ensemer 20 ml du même milieu liquide contenu dans des erlenmeyers de 100 ml. Après 5 jours d'incubation à 28°C, dans un bain marie agité (Memmert), les surnageants des cultures sont récupérés par centrifugation (8000 g pendant 10 min, 4°C) (Grigorevski de Lima *et al.*, 2005).

L'activité cellulase est mesurée dans les surnageants.

2.3. Mesure de l'activité cellulasique

L'activité cellulase est déterminée en présence de CMC préparée dans une solution tampon. La CMC est mise en suspension à raison de 2 % (m/v) dans du tampon phosphate de sodium (50 mM) à pH 7. Le mélange réactionnel est composé de 1ml d'extrait brut auquel est ajouté 1ml de CMC à 2% à pH 7. Ce mélange est incubé à 50°C pendant 10 mn (Grigoresvski de Lima *et al.*, 2005).

Le dosage des sucres réducteurs est effectué selon la méthode de Miller (1959). la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 1.5 ml d'une solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS), puis le mélange est porté à ébullition pendant 5 mn.

Le témoin correspond à la solution de cellulose incubée sans l'extrait brut à 50°C pendant 10 mn, puis on ajoute 1.5 ml de DNS et 1 ml de l'extrait brut.

Après refroidissement dans la glace, la lecture des absorbances est effectuée à 570 nm (spectrophotomètre Shimadzu UVmin-1240V).

Une unité d'activité cellulase est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une μ mole de sucres réducteurs (équivalent en glucose), par minute, dans un ml l'extrait brut ou de l'enzyme pure, et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus.

Les courbes d'étalonnage sont réalisées avec une solution de glucose (Sigma) à 2 mg/ml. La concentration des sucres réducteurs a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage, et L'activité cellulase est calculée d'après la relation suivante (Bailey *et al.*, 1992) :

$$\text{Activité cellulase (U/ml)} = \frac{P. V. 10^3}{180 .Ve}$$

« International Streptomyces Project » (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP7) (Shirling et Gottlieb, 1966) et sur le milieu GYEA, Bennett, Williams et gélose nutritive (Athalye *et al.*, 1981).

La composition de ces milieux est donnée en annexe.

- **Micromorphologie**

Les isolats obtenus sur les différents milieux cités précédemment sont observés à l'aide d'un microscope optique (Optika-180) à deux grossissements (x40 et x10) après 7 à 14 jours d'incubation.

Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour étudier les mycéliums en place sans en altérer les structures. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique des souches sélectionnées ainsi que la fragmentation du mycélium du substrat (Williams *et al.*, 1989).

3.2. Etude chimiotaxonomique

Cette étude complète les études morphologiques, pour l'identification du genre. Les analyses sont effectuées sur des hydrolysats ou des extraits cellulaires, par chromatographie sur papier pour la détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique ou DAP (forme LL ou DL) et la présence ou non de glycine au niveau pariétal et par chromatographie sur couche mince, pour connaître la composition cellulaire en sucres.

- **Biomasse mycélienne**

Les isolats sélectionnés sont ensemencés dans des tubes contenant 10 ml de milieu Williams liquide modifié et incubés dans un bain marie agité (Memmert) à 28°C pendant 10 à 14 jours, le mycélium est récupéré par filtration, lavé à l'eau distillée puis séché.

- **Analyse des acides aminés**

Il s'agit dans ce cas de déterminer l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) et de rapporter la présence ou l'absence de la glycine.

La méthode utilisée est celle préconisée par Becker *et al.* (1964). 10 mg de mycélium sec sont hydrolysés pendant 18h à 100°C avec 1 ml de HCL 6N dans des tubes à vis hermétiquement fermés. Après refroidissement, les hydrolysats sont filtrés sur membranes en verre pour éliminer les débris mycéliens. Les filtrats sont évaporés à sec dans un bain de sable chaud. Des lavages à l'eau distillée sont effectués jusqu'à l'élimination complète du HCL et l'obtention d'un pH compris entre 5.5 et 7.

Le résidu sec est repris dans 0.3 ml d'eau distillée. 15µl sont déposés sur des plaques de chromatographie en couche mince de gel de silice dans un système de solvant composé d'un mélange méthanol- eau- HNL 6N-pyridine (40/13/2/5 en volumes).

10 µl d'une solution à 0.01 M d'acide diaminopimélique (mélange des isomères LL ou DL) et d'une solution de glycine à 0.2% (p/v) sont utilisés comme standards.

La révélation s'effectue avec une solution à 0.2% (p/v) de Ninhydrine dissoute dans l'acétone, suivie d'un chauffage à 100°C pendant 5 min.

Les taches de DAP apparaissent de couleur brun olive virant au jaune vif. La forme LL migre plus rapidement que la forme DL ; par contre la glycine et la lysine apparaissent de couleur violette et migrent plus rapidement que les isomères de l'acide diaminopimélique (DAP)

- **Analyse des sucres cellulaires**

La méthode d'analyse est celle de Lechevalier et Lechevalier (1970b). 50 mg de mycélium sec sont hydrolysés par 2 ml de H₂ SO₄ 1N dans des tubes hermétiquement fermés, pendant 2h à 100°C. Après refroidissement, l'acide est neutralisé avec une solution saturée d'hydroxyde de baryum. Le précipité blanc obtenu est éliminé par centrifugation (7500 g durant 20 min). Le surnageant est recueilli, évaporé à sec puis dissout dans 0.3 ml d'eau distillée. 20 µl d'hydrolysats sont déposés sur plaque de gel silice, de même que 15 µl de solution aqueuse standard à 0.1% des sucres suivant : arabinose, galactose, glucose, mannose, ribose, rhamnose.

Les plaques subissent une chromatographie ascendante dans un système de solvant de *n*-butanol- eau distillée- pyridine- toluène (5/3/3/4 V/V).

Les chromatogrammes sont séchés à température ambiante puis révélés par une solution de diphénylamine aniline. Après chauffage à 100°C pendant 5 min, les taches apparaissent de couleur rose pour les pentoses et violettes à bleues pour les hexoses.

3.3. Etude physiologique

- **Production de pigments mélanoides**

La mise en évidence de la production de pigments mélanoides par les isolats est réalisée sur milieu gélosé IPS7 dont le virage, du milieu, au brun marron est reconnaissable (Shirling et Gottlieb, 1966).

Les souches sont ensemencées en spot ou en touche à la surface de la gélose, et incubées à 20°C. L'observation est effectuée après 2, 3 et 4 jours.

- **Hydrolyse de l'amidon**

Ce test est réalisé sur milieu nutritif gélosé contenant 10% d'amidon soluble selon la méthode de Marchal et Bourdon (1987). Après 14 jours d'incubation à 28°C, la gélose est recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

- **Dégradation de la gélatine**

Les souches sont ensemencées sur gélose nutritive contenant 0.4% de gélatine, puis incubées 14 jours à 28°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique à 15% est versée sur la gélose. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine (Williams et Cross, 1971).

- **Dégradation de la tyrosine**

La dégradation de cet acide aminé est réalisée selon la méthode préconisée par Gordon et *al.* (1974). 0.4 g de tyrosine est solubilisé dans 10 ml de l'eau distillée puis stérilisé à l'autoclave 120°C/20 min. la suspension est ensuite complétée à 100 ml de gélose nutritive, refroidi à 45°C et distribuée dans des boîtes de Pétri stériles. Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C, la lecture est effectuée après 2, 5, 7 et 12 jours, et se traduit par l'apparition de zones claires, synonymes de dégradation de la tyrosine.

- **Dégradation de la caséine de lait**

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de Gordon et *al.* (1974). 10g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100ml d'eau distillée (pH7.5), puis stérilisés à l'autoclave. 100ml d'eau distillée (pH7.5) contenant 3.6g d'agar sont parallèlement autoclavés.

Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées dans des boîtes de Pétri stériles. Les souches testées sont ensemencées en touches ou en stries à la surface de la gélose et incubées à 28°C pendant 7 jours. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies témoigne la dégradation de la caséine.

- **Dégradation du tween 80**

Les souches d'actinomycètes sont ensemencées en spots sur milieu contenant du tween 80 (annexe). La lecture est effectuée après 3, 5 et 7 jours d'incubation à 208°C.

L'apparition d'une auréole opaque autour des colonies est synonyme de dégradation du tween 80 par ces dernières (Sierra, 1957).

- **Croissance à différentes concentrations de NaCl**

Une colonie d'actinomycète est ensemencée sur le milieu M2 solide à différentes molarités de NaCl. Les concentrations étudiées sont 0, 1.5, 3, 5, 7, 10, 13 et 15g /l de NaCl. Les cultures sont incubées à 28°C et la croissance est suivie par observation des colonies chaque 24h (Athalye et *al.*, 1985).

- **Croissance à différents pH**

Ce test est réalisé sur milieu gélosé M2 ajusté à différents pH (5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11). Les souches sont ensemencées et incubées à 28°C. La croissance est observée et notée après 7, 14 et jours (Athalye et *al.*, 1985).

- **Température de croissance**

Les souches d'actinomycètes sont ensemencées sur le milieu de culture M2, à raison de trois boîtes de Pétri, par souche pour chaque température d'incubation. La croissance est estimée pendant 21 jours d'incubation à 20, 25, 30, 30, 35, 37, 40, 45 et 50 °C (Athalye et *al.*, 1985).

3.4. Tests biochimiques

- **Utilisation des composés glucidiques comme seule source de carbone**

Ce test consiste à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence de composés glucidiques en utilisant le milieu ISP 9 préconisé par Pridham et Gottlieb (1948).

Les glucides testés comme seule source de carbone sont les suivants : adonitol, arabinose, cellobiose, inositol, mannitol, raffinose, rhamnose, ribose, xylose, glucose, lactose, galactose, mannose, saccharose, tréhalose, fructose, maltose, sorbitol, levulose, glycérol et salicine.

Après ensemencement et incubation de 3 semaines à 28°C, la croissance est estimée sur les boîtes contenant les différentes sources de carbone par rapport à celles obtenues sur ISP9 sans source de carbone (témoin négatif) et sur ISP9 contenant le glucose (témoin positif).

- **Utilisation des acides aminés comme seule source de carbone**

Ce test vise à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence des acides aminés en utilisant le milieu ISP 9 préconisé par Pridham et Gottlieb (1948).

Les acides aminés testés comme seule source de carbone sont les suivants : cystéine, alanine, asparagine, histidine, tyrosine, sérine, lysine, arginine, glycine et leucine

Après ensemencement et incubation de 3 semaines à 28°C, la croissance est estimée sur les boîtes contenant les différentes sources de carbone par rapport à celle obtenue sur ISP9 sans source de carbone (témoin négatif).

- **Utilisation des sels de sodium comme seule source de carbone**

Les souches d'actinomycètes sont ensemencées sur milieu contenant des sels de sodium comme seule source de carbone (annexe).

Les sels de sodium testés sont les suivants : acétate de sodium, citrate de sodium, oxalate de sodium et tartrate de sodium et potassium.

La dégradation de ces sels est notée positivement après virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol) du jaune au rouge-rose (Gordon et *al.*, 1974).

- **Production de nitrate réductase**

Le test de la nitrate réductase est effectué sur bouillon nitraté (Marchal et Bourdon, 1987). La réduction des nitrates est constatée par la mise en évidence des nitrites formés à l'aide de deux réactifs NR1 et NR2. Après 7 à 10 jours d'incubation, Le test positif se manifeste par l'apparition d'un halo de couleur rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés s'il ya :

- Apparition de la couleur rouge : les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche.
- Absence de coloration : les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites.

- **Recherche de la production d'indole**

4.5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes du milieu urée-Indole sont ensemencés abondamment par la culture. La lecture est effectuée après 48h d'incubation à 28°C. 2 à 3 gouttes de Kovacs sont ajoutés à la culture. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface (Kitouni, 2005).

- **Recherche de l'uréase**

4.5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes du milieu urée-Indole sont ensemencés abondamment par la culture. La lecture est effectuée après 48h d'incubation à 28° C (Kitouni, 2005).

- Si la couleur du milieu vire vers le rouge donc uréase positive.
- Si la couleur du milieu reste jaune donc uréase négative.

- **Recherche de la catalase**

Ce test est réalisé selon la méthode sur lame. La souche est dissociée dans une goutte de peroxyde d'hydrogène 30% (v/v), sur une lame d'observation microscopique. La présence d'une catalase se caractérise par la formation immédiate de bulles d'oxygène (Kitouni, 2005).

- **Sensibilité aux antibiotiques**

La sensibilité aux antibiotiques est effectuée sur le milieu Muller Hinton (Athalye *et al.*, 1985). Les souches testées sont ensemencées en stries à la surface de la gélose. Chaque disque d'antibiotique est déposé à l'aide d'une pince afin de s'assurer de son application. Puis elles sont incubées pendant 5 jours à 28°C. Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenues autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. Les charges d'antibiotiques testés, leurs abréviations sont données dans le tableau.

Tableau V: les antibiotiques testés à l'égard des souches d'actinomycètes

Antibiotiques	Charge (µg)	familles
Ticarcilline (TIC)	75	B-lactamines
Gentamicine (CN)	15	Aminosides
Acide nalidixique (NA)	30	Quinolones
Colistine (CS)	50	polypeptides
Amikacine (AK)	10	Aminosides
Trimethoprime-sulfamethoxazole (SXT)	1,25 + 23,75	Sulfamides

- **Sensibilité aux différents agents chimiques**

Ce test consiste à ensemencer les souches en stries sur des milieux de GYEA préconisé par Athalye *et al.* (1985) additionnés du composant à tester, puis incubé pendant de 3 semaines à 28°C.

Les agents chimiques testés sont :

- crystal violet (0.001%)
- azide de sodium (0.001% et 0.01%)
- phénol (0.01% et 0.05%)
- tellurite de potassium (0,01% et 0,05%).

4. Optimisation de la production de cellulases

4.1. Le milieu de culture

Les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyer de 100 ml contenant 20 ml du milieu CMC liquide ajusté à pH 7.00. Les concentrations des différents composants du milieu sont testées comme suit :

- CMC (1 à 11 mg/ml)
- Extrait de levure (0.5 à 4 mg/ml ;
- Sulfate de magnésium (0 à 0,7 mg/ml)
- Chlorure d'ammonium (0 à 8 mg/ml)
- Chlorure de sodium (0 à 5 mg/ml)

Le milieu de culture liquide, estensemencé avec 2ml de préculture puis incubé à 28 °C dans un bain marie agité (Mettler) pendant 5 jours, l'activité cellulosique est testée dans les surnageants de culture.

La croissance est déterminée par mesure de la densité optique du milieu. Les longueurs d'ondes (λ) ont été déterminées par un balayage entre 350nm et 750 nm (limites du visible) pour chacune des souches étudiées.

L'activité cellulase dans les surnageants, récupérés par centrifugation (10000 r.p.m) pendant 15 min, 4°C), est mesurée à 50°C et à pH 7.

4.2. Effet de la température

Les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyer de 100 ml contenant 20 ml du milieu de culture liquide ajusté à pH 7,0. Les Erlenmeyer sontensemencés avec 2ml d'une préculture de souches d'actinomycètes sélectionnées puis incubés un bain marie agité (Mettler) pendant 5 jours à des températures de 25 °C à 50°C (Gautam et al., 2010).

La biomasse et l'activité cellulosique sont mesurées

4.3. Effet du pH

L'étude de l'effet du pH initial est réalisée dans les conditions citées ci-dessus, les cultures sont incubées à température ambiante. Le pH initial des cultures varie de 3 à 10 (Gautam et al., 2010).

4.4. Effet des sources de carbone

La croissance et la production de cellulase est mesurée en milieu liquide au pH optimum et à la température optimale de chaque souche en utilisant différentes sources de carbone à 0,7%

(m/v). Le maltose, l'arabinose, le glucose, le cellobiose, l'amidon, l'avicel, le xylane et le carboxyméthyl-cellulose sont testés. Après 5 jours d'incubation, la croissance et l'activité cellulasique sont mesurées (Jaradat et *al.*, 2008).

4.5. Effet des sources d'azote

C'est la mesure de la croissance et de la production de cellulase en milieu liquide aux conditions optimales de pH et de température, en utilisant différentes sources d'azotes à raison de 0.2% (m/v). La peptone, l'extrait de malt, l'urée, le sulfate d'ammonium, le nitrate de potassium, le nitrate d'ammonium et chlorure d'ammonium sont testés. Après 5 jours d'incubation, la croissance et l'activité cellulasique sont mesurées (Jaradat et *al.*, 2008).

4.6. Effet du temps d'incubation

Ce test vise à étudier l'effet du temps d'incubation sur la production enzymatique. La croissance et la production de cellulases est mesurée en milieu liquide au pH optimum et à la température optimale de chaque souche dans les intervalles de temps suivants : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 jours (Gautam et *al.*, 2010).

5. Caractérisation des cellulases dans le surnageant

Les propriétés des cellulases de deux souches sélectionnées P₄D₁₀ et P₃D₂₈ ont été étudiées en cultivant les deux souches dans des Erlenmeyer de 500ml contenant le milieu optimisé afin de recueillir 1 litre de culture. Après cinq jours d'incubation, les surnageants de culture sont centrifugés à 10,000×g pendant 20 min. Le surnageant est concentré à moitié par évaporation sous vide. Le résidu obtenu est conservé à 4 °C.

5.1. Effet de la température

L'activité cellulasique est mesurée à différentes températures pour déterminer la température optimale de l'enzyme.

Le mélange réactionnel contenant 1 ml de l'extrait brut concentré et 1 ml de la solution de CMC à 2 % dans le tampon de phosphate 0.1 M à pH 7 est incubé pendant 10 min à des températures allant de 20 à 80°C (Lee et *al.*, 2008).

5.2. Effet du pH

Pour étudier l'effet du pH sur l'activité cellulasique, on prépare des mélanges réactionnels composés de 1ml d'extrait brut concentré et 1 ml de la solution de CMC à 2 % dans un tampon

approprié à des pH allant de 3 à 11. Après incubation à la température optimale pendant 10 min on mesure l'activité enzymatique (Lee et al., 2008).

Trois tampons différents à 50 mM sont utilisés. Le tampon citrate à des pH de 3 à 6; le tampon phosphate pour les pH de 6 à 8 et le tampon Tris-HCl pour les pH de 8 à 11.

5.3. Mesure de la thermostabilité

La mesure de la thermostabilité en présence du substrat est déterminée en incubant le mélange réactionnel contenant 1ml de l'extrait brut concentré et de 1ml de la solution de CMC à 2% à des températures de 60 et 70°C à des intervalles de temps définis (30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 6h).

Pour mesurer de la thermostabilité en absence du substrat, l'extrait brut est incubé seul aux mêmes temps (Yin et al., 2010).

5.4. Effet des ions métalliques

L'activité CMCase est mesurée en présence de différents ions métalliques à 1mM. Ces ions métalliques sont ajoutés sous forme de sels : MgSO₄, NaCl, KCl, CaCl₂, HgCl₂, MnCl₂, FeCl₃, CoCl₂, AgSO₄ et ZnSO₄ (Lee et al., 2008).

Les ions sont additionnés au mélange réactionnel contenant la CMC à 2% et le surnageant de culture concentré puis incubé à 50°C pendant 10. L'activité relative à 100% est exprimée comme étant l'activité observée en absence des ions métalliques.

5.5. Effet des agents dénaturants

Pour tester l'effet des réactifs chimiques sur l'enzyme, on ajoute au mélange réactionnel contenant l'extrait brut et la solution de CMC, 0.1 ml des agents dénaturants avec une concentration de 0.1% et on incube à 50°C pendant 10 min.

Les réactifs chimiques testés sont : l'éthylène diamine acétate (EDTA), le sodium dodécyl sulfate (SDS), du triton x-100, du tween 80, le glycérol et l'urée (Yin et al., 2010).

L'activité relative à 100% est exprimée comme étant l'activité observée en absence des agents

5.6. Effet du glucose

Ce test est réalisé pour voir si la concentration de glucose, qui est un produit d'hydrolyse enzymatique, affecte l'activité enzymatique. Pour cela on ajoute au mélange réactionnel

contenant l'extrait brut et la solution CMC à différentes concentrations de glucose à savoir : 0.25Mm, 0.5mM, 1mM, 1.5mM et 2mM. On incube à 50°C pendant 10 min (Kotchoni et *al.*, 2006).

5.7. Effet de la concentration de CMC

Dans le but d'étudier l'effet du substrat (CMC) sur l'activité enzymatique, nous avons testé les concentrations de CMC suivantes : 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% et 3% (Lee et *al.*, 2010).

5.8. Spécificité vis-à-vis des différents substrats

La spécificité vis-à-vis des substrats est réalisée en testant le xylane de bouleau, l'avicel, le cellobiose et la CMC à une concentration de 2% dans un tampon phosphate 50mM à pH optimum de l'enzyme, le test d'activité cellulasique est ensuite réalisé (Lee et *al.*, 2008).

5.9. Stabilité au cours de la conservation

La stabilité des CMCases au cours de la conservation à 4°C a été déterminée en mesurant l'activité des extraits concentrés chaque semaine pendant un mois (Lee et *al.*, 2008).

5.10. Etude des produits d'hydrolyse par chromatographie sur couche mince

On prépare un mélange réactionnel composé de CMC (5ml) et de l'extrait brut (5ml). Ce mélange est incubé à 50°C, un aliquote de 1ml est prélevé à des temps d'incubation différents : 30min, 1h, 2h, 3h, 4h et 5h. Le témoin est composé de CMC déposé à t= 0min.

L'analyse des produits d'hydrolyse de la CMC est effectuée par chromatographie sur couche mince. Le support utilisé est le gel de silice (Woelm 9F-DC 04645) avec le système de solvant butanol-acétone-eau (4/5/1, v/v/v) (Audigie et *al.*, 1995).

A l'aide d'une micropipette, on dépose 10µl de chaque échantillon avec des séchages intermédiaires au sèche cheveux.

Après la migration, le chromatogramme est séché et les spots sont révélés avec le réactif aniline-diphénylamine (annexe) qui révèle les sucres en bleue violet (De Mot et Verachtert, 1985).

Les étalons utilisés sont : le glucose et le cellobiose à une concentration de 5mg/ml.

La distance de migration des sucres est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Rapport frontal} = \frac{\text{Distance de la migration de la substance}}{\text{Distance de la migration du solvant}}$$

5.11. Caractérisation électrophorétique des cellulases sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate (SDS-PAGE)

Dans le but d'estimer le poids moléculaire de la protéine ou de ses sous unités constitutives, une plaque électrophorétique est préparée selon le protocole de Laemmli (1970).

• Protocol expérimental

Le dispositif d'électrophorèse (thermo scientific P8DS, USA) utilisé est conçu pour les mini gels, il s'agit d'une cuve ayant une contenance de 600ml et d'une panoplie d'accessoires (peigne, espaceurs, dispositif pour couler le gel).

Une plaque électrophorétique est préparée selon la procédure de Laemmli, une moitié du gel sert pour la réalisation de la SDS-PAGE et l'autre moitié est utilisée pour l'analyse du zymogramme qui a pour but de détecter l'activité cellulase.

Le gel de séparation à 15% d'acrylamide (annexe), contient 0.5% (m/v) de CMC qui est le substrat des CMCase. Il est dégazé à l'aide d'une pompe (EDWARDS). La réaction de polymérisation est initiée par addition de 500µl de persulfate d'ammonium à 10% et accéléré par ajout de 50µl de TEMED. Le mélange est versé entre deux plaques de verre (10 x 10cm) séparées avec des espaceurs. Le gel de séparation occupe deux tiers de la plaque. On verse 1ml de n-butanol saturé avec de l'eau à 10%. Après polymérisation du gel, le n-butanol est éliminé et rincé à l'eau distillée.

Le gel de concentration à 4% d'acrylamide (annexe) est versé après dégazage. Le gel de concentration est coulé au dessus du gel de séparation et un peigne est inséré immédiatement après le coulage, au moment de l'emploi le peigne est retiré et les puits sont lavés avec du tampon d'électrophorèse (annexe).

75µl du surnageant concentré est mélangé avec 25 µl du tampon d'échantillon (annexe). Les marqueurs protéique BIO-RAD prêts à l'emploi sont chauffés à 100°C pendant 2mn alors que l'échantillon est chauffé à 100°C pendant 5 mn.

Les dépôts sont de l'ordre de 20µl et les marqueurs utilisés à une concentration de 1mg/ml sont les suivant : β-amylase (200 kDa) conalbumine (75 kDa), albumine du sérum bovin (67 kDa), ovalbumine (43 kDa).

Le courant électrique est véhiculé par le tampon d'électrophorèse, la migration se fait à 150V pendant 3h jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à 1 cm du bord inférieur de la plaque.

La visualisation du profil de migration se fait après le traitement du gel comme suit :

- le gel est rincé à l'eau distillée et coupé en deux portions, le premier gel sert pour la réalisation de la coloration au bleu de Coomassie R250 et le deuxième gel pour la réalisation du zymogramme.

Pour la coloration au bleu de Coomassie le gel subi les traitements suivants :

- Immersion pendant une heure dans une solution d'acide trichloroacétique (TCA) (annexe) ;
- Rinçage à l'eau distillée puis coloration dans la solution de bleu de Coomassie R250 (annexe) sous faible agitation pendant 1h 30mn ;
- Lavage à l'eau distillée puis trempage dans la solution de décoloration (annexe) avec un changement de bain (2 à 3 fois).

Les masses moléculaires des xylanases sont déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage

« $R_f = f(\log PM)$ ».

Le rapport frontal est calculé selon la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la protéine}}{\text{Distance de migration du bleu de bromophénol}}$$

5.12. Mise en évidence de l'activité cellulastique par la technique du zymogramme

C'est une méthode capable de détecter l'activité enzymatique sur gel de polyacrylamide. Les zymogrammes résultants contiennent des bandes transparentes sur fond opaque (Royer et Nakas, 1990).

La moitié du gel destiné à la réalisation du zymogramme, subit les traitements suivants :

- Immersion dans une solution de Triton X-100 à 2.5% (m/v) pendant 30mn ;
- Le gel est débarrassé du Triton X-100 par rinçage à l'eau distillée puis une incubation dans du tampon phosphate 50mM à pH 7 à 50°C pendant 20mn ;
- Coloration au rouge de Congo (0,1%) pendant 15 mn ;

- Lavage avec une solution de NaCl à 1M ;
- Immersion dans de l'acide acétique à 0,5% (m/v) pour stopper la réaction et augmenter le contraste (Gallardo et *al.*, 2004).

6. Analyse statistique

Une étude statistique des données est réalisée à l'aide du logiciel EX stat version 2011.3.01, afin de mettre en évidence les différences significatives concernant l'optimisation de la production de CMC_{Case} et l'activité enzymatique, une analyse de variance (ANOVA ; SNK) à un facteur a été impliquée.

CH II : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Criblage des souches d'actinomycètes productrices de cellulases

Au total, 80 souches d'actinomycètes provenant de la collection du laboratoire de Biochimie Microbienne de l'université A/MIRA de Bejaia, isolées à partir de 6 échantillons de sols sur milieu Williams, ont été étudiées. De ce fait, deux milieux ont été mis au point pour permettre le criblage des souches cellulolytiques.

Ces souches ont fait l'objet d'une purification sur milieu Williams puis sont conservées à 4°C.

- **Criblage sur milieu de culture solide**

La capacité des souches à assimiler la CMC sur un milieu gélosé comme seule source de carbone et d'énergie se traduit dans le milieu solide par la formation de zones claires autour des cylindres d'agar (Fig.8)

Cette observation s'explique probablement par la sécrétion d'enzymes cellulolytiques dans le milieu extracellulaire caractérisant ainsi la production de cellulases extracellulaires.



P₄D₁₀

P₃D₂₈

Figure 8 : Observation de zones claires sur milieu solide, après 5 jours d'incubation à 28°C.

20 souches parmi les 80 sont positives à ce test et ont été sélectionnées. Elles se répartissent comme suit : 7 souches du sol de la décharge de Boulimat (site P₁ et P₃), 6 souches du sol saharien de Boussaâda (site P_B), 6 souches du sol forestier de Boulimat (site P₄) et une souche du sol forestier de Tikdjda (site T₁) (tableau VI).

Parmi celles-ci, 8 souches : **P₁D₃**, **P₃D₂₈**, **P_BD₈**, **P_BP₁₄**, **P_BP₂₁**, **P_BP₂₄**, **P₄P₁₀** et **T₁D₁** révèlent des activités enzymatiques intéressantes avec des diamètres d'hydrolyse supérieurs à 30 mm.

Tableau VI : Diamètres des zones d'hydrolyse des 20 souches sélectionnées

Souche	Diamètre de la zone d'hydrolyse	Souche	Diamètre de la zone d'hydrolyse
P ₁ D ₇	22.08	P _B D ₂₄	34.37
P ₁ D ₃	34.63	P _B D ₂₆	20.95
P ₂ D ₁₄	26.12	P _B D ₂₈	28.08
P ₃ D ₂₃	21.95	P ₄ D ₂	20.67
P ₃ D ₂₄	26.37	P ₄ D ₃	25.06
P ₃ D ₂₆	27.69	P ₄ D ₄	26.56
P ₃ D ₂₈	38.82	P ₄ D ₁₀	39.88
P _B D ₈	31.63	P ₄ D ₁₃	18.38
P _B P ₁₄	30.49	P ₄ D ₁₆	16
P _B D ₂₁	31.72	T ₁ D ₁	34.11

- **Criblage sur milieu de culture liquide**

Les activités cellulases des 8 souches sélectionnées sont rassemblées dans le tableau VII.

Les souches P₃D₂₈, P₄D₁₀, et T₁D₁ révèlent des activités relativement importantes et la souche P₃D₂₈ présente une activité la plus élevée (1.667 U/ml)(tableau VII).

Considérant les performances de ces souches, notre choix s'est opté sur deux isolats P₃D₂₈ et P₄D₁₀.

Tableau VII: Activités cellulases mesurées à 50°C, à pH 7.

Souche	Activité cellulaire (UI/ml)
P ₁ D ₃	0.282 ± 0.010
P ₃ D ₂₈	1.667 ± 0.085
P _B D ₈	0.306 ± 0.015
P _B D ₁₄	0.445 ± 0.034
P _B D ₂₁	0.678 ± 0.046
P _B D ₂₄	0.644 ± 0.063
P ₄ D ₁₀	1.211 ± 0.052
T ₁ D ₁	0.755 ± 0.023

2. Etude taxonomique des souches sélectionnées

2.1. Etude des caractères morphologiques

- **Caractéristiques culturelles**

Les caractères cultureux des deux isolats P₃D₂₈ et P₄D₁₀ sur les neuf milieux de culture gélosés après les 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours d'incubation à 28°C sont rapportés dans les tableaux VIII et IX.

Les colonies des deux souches apparaissent au bout de 2 à 3 jours et se développent sur tous les milieux utilisés à différents degrés, allant d'une croissance faible à une croissance abondante.

Souche P₃D₂₈

La souche P₃D₂₈ présente une croissance et une sporulation abondante sur les milieux Williams, ISP3, ISP4, et ISP5 et relativement bonne sur ISP1, ISP2 et GYEA. La croissance est relativement moyenne sur Bennett et aussi sur gélose nutritive mais sans production de mycélium aérien. L'isolat P₃D₂₈ cultivé sur les différents milieux, forme des colonies circulaires de 1 à 4 mm de diamètre d'aspect pâteux et de couleur blanche.

Le mycélium aérien produit est de couleur blanche et celui de substrat varie selon le milieu utilisé, jaune pâle, crème, orange à jaune, marron clair et aucun pigment diffusible n'a été constaté sur les milieux de culture utilisés.

Souche P₄D₁₀

La croissance et la sporulation sont abondantes sur les milieux Williams, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, Bennett et GYEA. Elle est relativement moyenne sur milieu ISP1, faible sur le milieu gélose nutritive et ne produit pas de mycélium aérien.

Les colonies sont sèches, poudreuses, à bords plats et centres élevés et se présentent sous forme circulaire avec un diamètre de 2 à 5mm.

La production de mycélium aérien est observée sur tous ces milieux, le mycélium aérien est beige, tandis que celle du mycélium du substrat varie de jaune à marron selon le milieu utilisé. La production de pigments diffusibles sur ces milieux n'a pas été également observée.

- **2.1. 2. Micromorphologie**

L'observation au microscope optique (Fig.9) des deux isolats P₄D₁₀ et P₃D₂₈ montre que les filaments des mycéliums du substrat (MS) sont fins et non fragmentés. Ils se développent en surface et pénètrent dans la gélose, puis donnent naissance à un mycélium aérien, long, non cloisonné, et très ramifié. Il porte de longues chaînes de spores sphériques et/ou bâtonnets. Les chaînes de spores sont droites de type rectiflexible (RF). Les spores isolées ne présentent aucune mobilité.



P₄D₁₀



P₃D₂₈

Figure 9 : Micromorphologie de deux souches cultivées pendant 21 jours à 28°C, vu au microscope optique aux grossissements 10 x 40.

Tableau VIII: Résultats de la croissance de l'isolat **P₃D₂₈** sur différents milieux

Isolat	Temps d'incubation	Milieux de culture	Croissance	Sporulation	Pigmentation		Pigments diffusibles
					Mycelium aérien	Mycelium du Substrat	
P₃D₂₈	7^{ème} jours	ISP1	+++	++	Blanc	Jaune pâle	-
		ISP2	+++	++	Blanc	Orange	-
		ISP3	++++	+++	Blanc	Marron clair	-
		ISP4	++++	++++	Blanc	Crème	-
		ISP5	++++	++++	Blanc	Jaune-crème	-
		Bennett	++	+	Blanc	Jaune orangé	-
		GN	++	-	-	Jaune pâle	-
		GYEA	+++	++	Blanc	Jaune	-
		Williams	++++	++++	Blanc	jaune	-
	14 et 21^{ème} jours	ISP1	+++	+++	Blanc	Jaune	-
		ISP2	+++	+++	Blanc	Orange	-
		ISP3	++++	++++	Blanc	Marron	-
		ISP4	++++	++++	Blanc	Crème	-
		ISP5	++++	++++	Blanc	crème	-
		Bennett	+++	++	Blanc	Jaune orangé	-
		GN	++	-	-	Jaune pâle	-
		GYEA	+++	++	Blanc	Jaune	-
		Williams	++++	++++	Blanc	jaune	-

Note: croissance et sporulation : ++++ : abondante, +++ : bonne, ++ : moyenne, + : faible et, - : nulle

Tableau IX : Résultats de la croissance de l'isolat **P₄D₁₀** sur différents milieux

Isolat	Temps d'incubation	Milieux de culture	Croissance	Sporulation	Pigmentation		Pigments diffusibles
					Mycelium aérien	Mycelium du Substrat	
P₄D₁₀	7^{ème} jours	ISP1	+	-	Blanc	Jaune	-
		ISP2	+++	++	Beige	Orange clair	-
		ISP3	++++	+++	Beige	Marron brun	-
		ISP4	++++	+++	Beige	Marron clair	-
		ISP5	++++	+++	Beige- blanc	Beige -blanc	-
		Bennett	++++	++	Beige	Jaune orangé	-
		GN	-	-	-	-	-
		GYEA	++++	++	Beige	Marron	-
		Williams	++++	+++	Beige	Jaune pâle	-
	14 et 21^{ème} jours	ISP1	++	+	Blanc	Jaune pâle	-
		ISP2	++++	++++	Beige	Marron orangé	-
		ISP3	++++	++++	Beige	Marron brun	-
		ISP4	++++	++++	Beige	Marron -orange	-
		ISP5	++++	++++	Beige	Crème	-
		Bennett	++++	++++	Beige	Marron-orange clair	-
		GN	+	-	-	Jaune orangé	-
		GYEA	++++	++++	Beige	Marron foncé	-
		Williams	++++	++++	Beige	Crème jaunâtre	-

Note: croissance et sporulation : ++++ : abondante, +++ : bonne, ++ : moyenne, + : faible et, - : nulle

2.2. Analyse des constituants cellulaires et pariétaux

L'étude chimique des constituants cellulaires de deux isolats a permis de mettre en évidence la présence, dans la paroi, de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique, ainsi que de la glycine et l'absence de lysine.

L'analyse de sucres cellulaires taxonomiquement importants n'a détecté aucun sucre caractéristique dans les deux hydrolysats testés.

Les résultats obtenus après extraction et séparation des acides aminés et des sucres des hydrolysats cellulaires sont mentionnés dans les tableaux X et XI.

Tableau X : Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat P₃D₂₈ par chromatographie sur couche mince

Isolat P ₃ D ₂₈				
Constituants	Couleur des taches	Rapport frontal (Rf)	Révélateur	Identification des composés
Acides aminés	violette	Rf = 0.8	Ninhydrine	Glycine
	brune virant au jaune	Rf = 0.7		Acide LL-diaminopimélique
Sucres	ND	ND	Diphenylamine-Aniline	Pas de sucres caractéristiques

Tableau XI: Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat P₄D₁₀ par chromatographie sur couche mince

Isolat P ₄ D ₁₀				
Constituants	Couleur des taches	Rapport frontal (Rf)	Révélateur	Identification des composés
Acides aminés	violette	Rf = 0.8	Ninhydrine	Glycine
	brune virant au jaune	Rf = 0.69		Acide LL-diaminopimélique
Sucres	ND	ND	Diphenylamine-Aniline	Pas de sucres caractéristiques

2.3. Identification du genre

Les colonies matures de la souche P₄D₁₀ sont sèches, poudreuses, à bords plats et centres élevés tandis que celles de la souche P₃D₂₈ sont pâteuses. Ces formes sont caractéristiques des colonies du genre *Streptomyces* (Cavalla et Eberlin, 1994 ; Petrosyan et al., 2003). Compte tenu de la pigmentation du mycélium aérien sporulé, la souche P₄D₁₀ peut être classée dans la série des beiges et P₃D₂₈ dans la série des blanches (Saadoun et Al moumani, 1997).

Les résultats de l'analyse cellulaire des 2 souches rattachent les isolats au chimiotype IC (Lechevalier et Lechevalier, 1970). Selon Zerizer et al. (2006), cette composition permet d'attribuer les deux souches soit aux genres: *Streptomyces*, *Intrasporangium*, *Streptoverticilium*, *Kiniosporia*, *Sporichthya* appartenant tous au groupe des *Streptomycetes* et genres apparentés, soit aux genres *Terrabacter* et *Nocardioide* appartenant au groupe des Nocardioformes.

Ou enfin au genre *Kitasatospora* appartenant au groupe des genres non classées.

Cependant, la combinaison entre les caractères morphologiques et la composition chimique des cellules permet de conclure que les deux souches sont des actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces*.

2.3.1. Etude physiologique

Les résultats des différents caractères, physiologiques et biochimiques des souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ sont réunis dans le tableau XII.

P₃D₂₈

La souche P₃D₂₈ utilise un certain nombre de composés organiques, comme la gélatine, la tyrosine, la caséine, l'amidon, le xylane, la cellulose, le tartrate de sodium, le citrate de sodium, l'acétate de sodium et le tween 80, mais elle ne dégrade pas l'oxalate de sodium. Elle est capable d'utiliser tous les composés glucidiques comme seule source de carbone et la plupart des acides aminés à l'exception de la glycine et de l'arginine. La présence de nitrate réductase signifie qu'elle peut réduire les nitrates. Elle hydrolyse l'urée et elle produit l'indole.

Les pigments mélanoides ne sont pas produits sur les milieux ISP7 et ISP1, conçus spécialement pour la production de ces pigments. Elle croît à des températures comprises entre 28 et 50°C, elle est capable de se développer en présence de concentrations élevées de NaCl qui peuvent atteindre 7 %, par conséquent elle est thermophile halotolérante modérée.

Elle pousse à des pH compris entre 7 et 11 et en présence de cristal de violet (0.001%), de tellurite de potassium (0.05%), de phénol (0.05%) et une absence totale de développement est observée en présence de l'azide de sodium à 0.01%.

Elle est résistante à la triméthoprime-sulfaméthoxazole, la Ticarcilline et la gentamicine, et sensible à la colistine, amikacine et l'acide nalidixique.

P₄D₁₀

La souche P₄D₁₀ est capable d'utiliser de nombreux composés organiques tels que l'amidon, la gélatine, la tyrosine, la caséine, le xylane, le tartrate de sodium, le citrate de sodium, l'acétate de sodium, l'oxalate de sodium et le tween 80. Elle est capable d'utiliser la plupart des composés glucidiques à l'exception du sorbitol et les acides aminés excepté la glycine, la cystéine et l'arginine. Elle réduit les nitrates en nitrites, elle hydrolyse l'urée et elle produit l'indole. Aucun pigments mélanoides n'est produit sur les milieux ISP7 et ISP1.

Elle pousse à des températures comprises entre 20 et 40°C, elle tolère une concentration de NaCl jusqu'à 10%, et par conséquent elle est mésophile halotolérante modérée.

Elle présente une bonne croissance à pH 5 et 8 et en présence de cristal de violet (0.001%), de tellurite de potassium (0.05%), de phénol (0.05%) et une absence totale de développement est observée en présence de l'azide de sodium à 0.01%.

Elle est résistante à la triméthoprime-sulfaméthoxazole, l'acide nalidixique, la Ticarcilline et la gentamicine, et sensible à la colistine et amikacine.

2.5. Identification de l'espèce

La comparaison des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques ne permettent pas de rattacher les souches à des espèces données, et ce en raison du faible nombre de tests réalisés comparés à ceux rapportés dans le Bergey's Manuel (1989). Néanmoins, d'autres tests physiologiques (comme la dégradation de l'esculine, de la xanthine, la résistance à d'autres antibiotiques, au lysozyme ainsi qu'à d'autres agents chimiques, etc.), biochimiques (analyse des lipides membranaires et les acides gras) et les techniques d'analyses de biologie moléculaire s'avèrent être essentiels afin de pouvoir affilier chacun des isolats à l'espèce correspondante (Zerizer *et al.*, 2006).

Tableau XII: Caractéristiques physiologiques et biochimiques des deux isolats P₃D₂₈ et P₄D₁₀

Tests	Résultats	
	P ₃ D ₂₈	P ₄ D ₁₀
Coloration de Gram	+	+
Dégradation de :		
Amidon	+	+
Gélatine	+	+
Caséine de lait	+	+
Tyrosine	+	+
Tween 80	+	+
Xylane	+	+
Dégradation des sucres		
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Lactose	+	+
Mannitol	+	+
Mannose	+	+
Maltose	+	+
Arabinose	+	+
Xylose	+	+
Sorbitol	+	-
Raffinose	+	+
Ribose	+	+
Glycérol	+	+
Inositol	+	+
Levulose	+	+
Adonitol	+	+
Tréhalose	+	+
Salicine	+	+
Rhamnose	+	+
Cellobiose	+	+
Fructose	+	+
Dégradation des acides aminés		
Sérine	+	+
Histidine	+	+
Leucine	+	+
Alanine	+	+
Cystéine	+	-
Asparagine	+	+
Lysine	+	+
Glycine	-	-
Arginine	-	-
Décarboxylation des sels de sodium		
Acétate	+	+
Citrate	+	+
Oxalate	-	+
Tartrate	+	+
Croissance en présence du NaCl		
0%	++	++

Tableau XII: (suite)

1.5%	+++	+++
3%	++	+++
5%	++	+++
7%	+	++
10%	-	+/-
13%	-	-
15%	-	-
Croissance à		
pH4	-	+
pH 5	+/-	+
pH 6	+	++
pH 7	++	+++
pH 8	++	+++
pH 9	+++	++
pH 10	+++	+
pH 11	++	+/-
Croissance à		
20°C	-	+
25°C	+/-	+
28°C	++	+++
30°C	+++	+++
35°C	+++	++
37°C	+++	+
40°C	+++	+/-
45°C	+++	-
50°C	+/-	-
55°C	-	-
Croissance en présence de		
Tellurite de K (0.01%)	+	+
Tellurite de K (0.05%)	+	+
Cristal violet (0.001%)	+	+
Phénol (0.005%)	+	+
Phénol (0.05%)	+	+
Azide de sodium (0.001%)	+	+
Azide de sodium (0.01%)	-	-
Production de :		
Pigments mélanoides	-	-
Nitrate réductase	+	+
Catalase	+	+
Indole	+	+
Urée	+	+
Sensibilité aux antibiotiques : diamètre des zones d'inhibition		
Ticarcilline (TIC)	R	R
Gentamicine (CN)	R	R
Acide nalidixique (NA)	12.6	R
Colistine (CS)	18.0	11.9
Amikacine (AK)	31.2	35.3
Trimethoprime-sulfamethoxazole (SXT)	R	R

+++ : croissance abondante ; ++ : croissance bonne ; + : croissance moyenne ; +/- : croissance faible ; - : croissance nulle.

3. Optimisation de la production de cellulases

3.1. Effet de la concentration de CMC

Les résultats présentés dans la figure (Fig.10) indiquent que la souche P₄D₁₀ montre une meilleure croissance et une activité enzymatique élevée et quasi stable à des concentrations de CMC comprises entre 7 et 11 g/l avec une valeur maximale de 1.093 UI/ml à 11 g/l. En revanche, l'activité enzymatique et la biomasse de la souche P₃D₂₈ sont maximales avec 5 g/l (1.751 UI/ml).

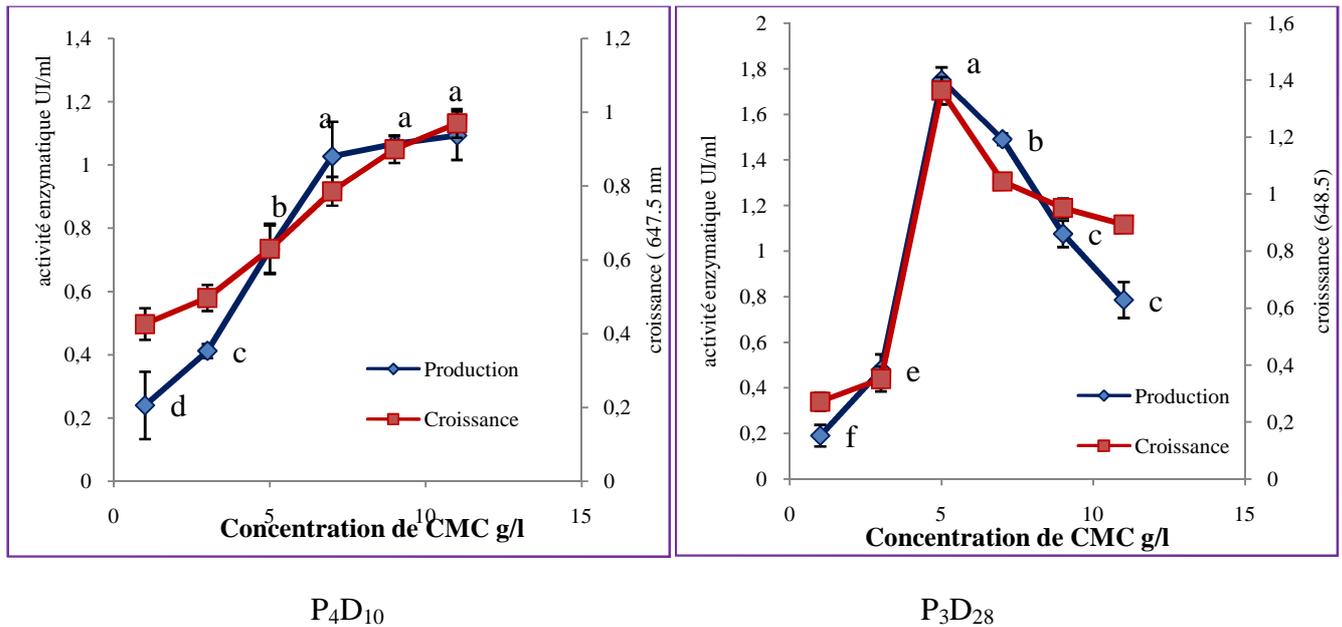


Figure 10: Effet de CMC sur la production de cellulases

Note : les concentrations de CMC portant les mêmes lettres ne présentent pas une différence significative

L'analyse de la variance (ANOVA ; SNK) a permis de conclure que les différentes concentrations de CMC ont un effet significatif sur la production de cellulases pour les deux souches.

Les résultats obtenus peuvent s'expliquer par le fait qu'au-delà de 0.5% (5g/l), le milieu devient visqueux et influence le mélange des composants de milieu ainsi que le transfert d'oxygène. Ceci se répercute sur la production de cellulases. Ce constat peut être aussi dû probablement à un excès en sucres qui réprime l'expression de la cellulase (Scriban, 1993).

Des études effectuées dans ce sens avec des souches de *Bacillus alcalophilus* S39, *Bacillus amyloliquefaciens* C23 (Abou-Taleb et al., 2009) ; *Bacillus* sp (Fukumori et al., 1985; Kawai et al., 1988 et Shikata et al., 1990) *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* (Gautam et al., 2010) et *Aspergillus terreus* AV49 (Vyas et al., 2005) ont montré que la production maximale est obtenue avec 1% de CMC.

D'autres travaux par contre sur *Streptomyces drozdowiczii* ont montré une production maximale dans un milieu contenant CMC à 10 % (Grigorevski de Lima et al., 2005).

Concernant la souche P₄D₁₀, notre choix s'est fixé sur 7g/l comme concentration optimale en raison de la viscosité du milieu qui influence la production de cellulases.

3.2. Effet de l'extrait de levure

La production de cellulases augmente proportionnellement jusqu'à atteindre des valeurs maximales de 0.942 UI/ml à 2g/l pour la souche P₄D₁₀ et de 1.311UI/ml à 2.5g/l pour la souche P₃D₂₈ (Fig.11). Au-delà de ces concentrations l'activité enzymatique décroît considérablement. Cela peut être expliqué par le fait que ces deux souches utilisent préférentiellement l'extrait de levure à la place de CMC et de toutes les façons, économiquement cela n'est pas intéressant.

Par ailleurs, la croissance des deux souches évolue en fonction de la concentration de l'extrait de levure.

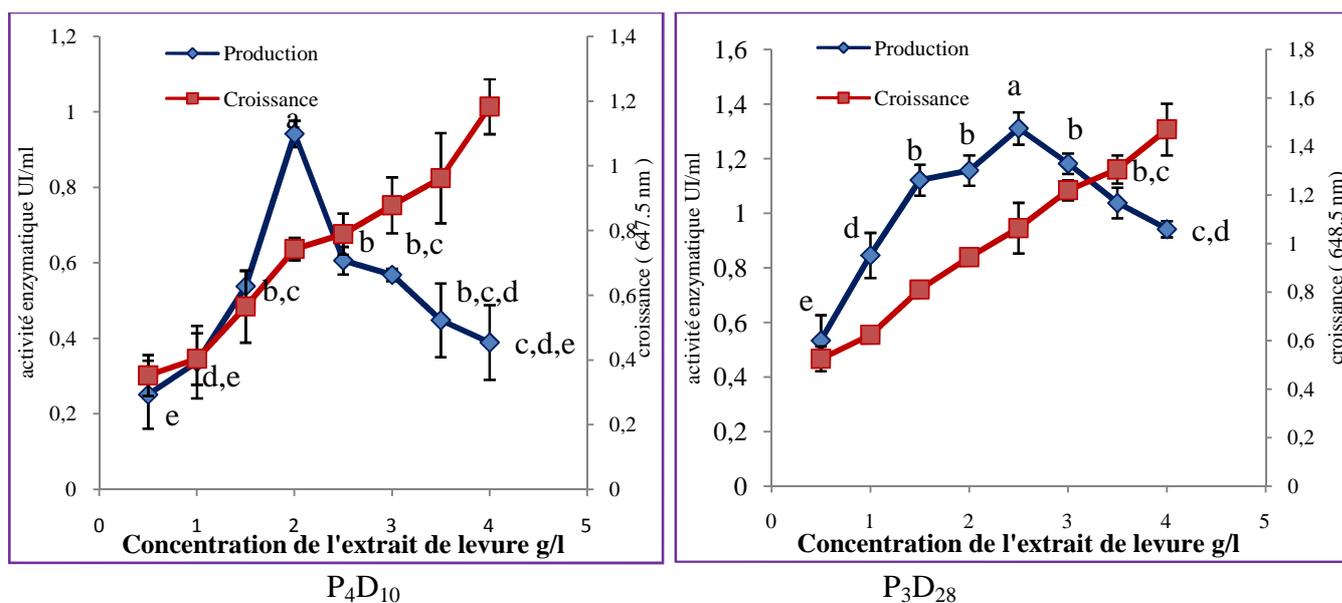


Figure 11: Effet de l'extrait de levure sur la production de cellulases

Les tests statistiques (ANOVA ; SNK) montrent que les différentes concentrations de l'extrait de levure influencent significativement la production de cellulases des souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈.

Gautam et al. (2010) ont étudié les activités cellulases à différentes concentrations d'extrait de levure dans des cultures de *Trichoderma sp* et *Aspergillus niger* ; Ils ont rapporté des activités respectives de 2.28 et 1.68 UI/ml avec 1% de l'extrait de levure.

D'autres travaux ont montrés qu'une production maximale de CMCases chez *Streptomyces drozdowiczii* (Grigorevski de Lima et al., 2005), *Bacillus alcalophilus* S39 et *Bacillus amyloliquefaciens* C23 (Abou-Taleb et al., 2009) a été obtenue avec respectivement 0.3, 0.4 et 0.7 % de l'extrait de levure.

3.3. Effet du sulfate de magnésium

Une production importante de cellulases est obtenue avec des concentrations en sulfate de magnésium situées entre 0.3 et 0.5g/l. Le maximum d'activité enzymatique et de biomasse sont obtenus lorsque les deux souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ se développent à une concentration de 0.5 g/l et 0.4 g/l respectivement (Fig.12).

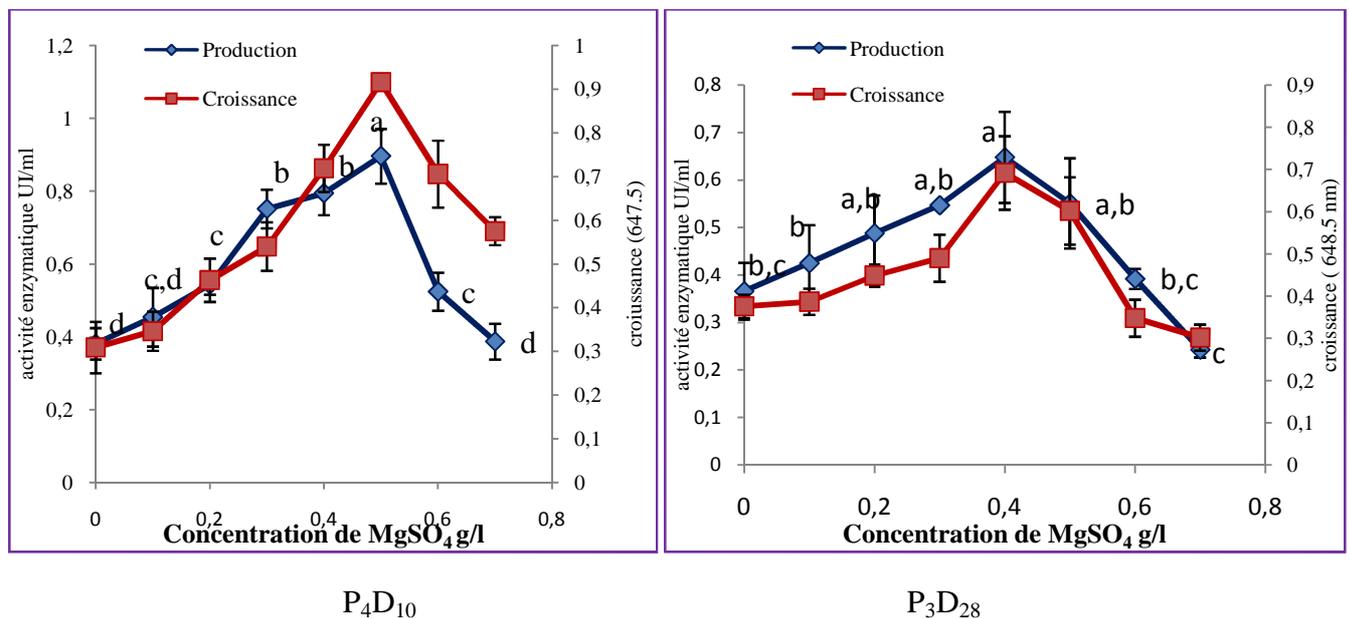


Figure 12: Effet du sulfate de magnésium sur la production de cellulases

L'analyse de la variance atteste que les résultats obtenus montrent que la concentration en MgSO₄ affecte d'une manière significative la production de cellulases chez les deux souches étudiées.

Par ailleurs, on a comparé nos résultats concernant la souche P₄D₁₀ à ceux de Gautam et al. (2010) qui ont étudié l'effet de la concentration de MgSO₄ sur la production de cellulases de *Trichoderma viridae*. Ils ont enregistré une activité enzymatique maximale proche de nos résultats avec une concentration de MgSO₄ de 0.58 g/l.

Par ailleurs, les résultats d'une étude effectuée par El-Sersy et al. (2010) ont révélé chez une souche de *Streptomyces ruber* une production maximale de cellulase avec 0.1g/l de MgSO₄.

3.4. Effet du chlorure d'ammonium

D'après les résultats illustrés dans la figure 13, la croissance et la production de cellulases sont maximales à des concentrations de 4g/l et 2g/l pour les souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ respectivement. Au-delà de ces concentrations on observe une diminution rapide de l'activité enzymatique et de la croissance.

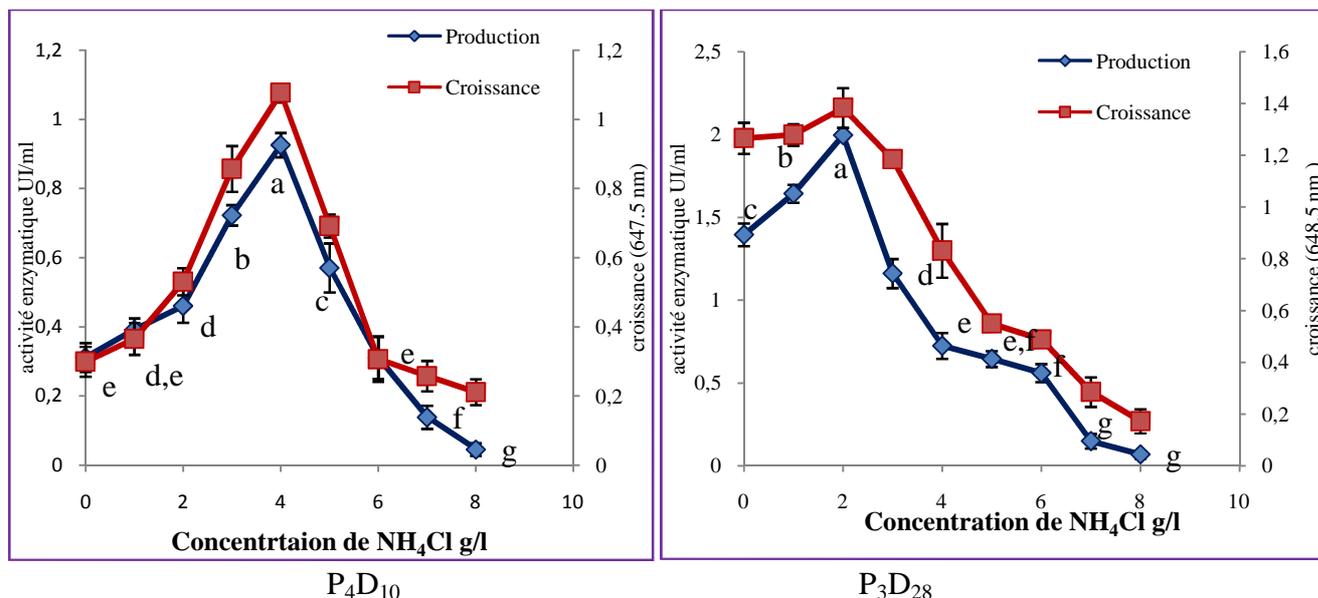


Figure 13: Effet du Chlorure d'ammonium sur la production de cellulases.

L'analyse de la variance indique que les différentes concentrations en NH₄Cl affectent également d'une manière significative la production de cellulases chez les souches étudiées.

Les résultats de la souche P₃D₂₈ sont en accord avec ceux obtenus par Jaradat et al. (2008) sur l'effet de la concentration de NH₄CL sur la production de cellulases avec la souche *Streptomyces sp J2*.

3.5. Effet du chlorure de sodium

A des concentrations de 4g/l et de 3g/l, on observe une biomasse importante et une bonne production de cellulases avec des activités enzymatiques respectives de 1.456 UI/ml et de 1.124 UI/ml pour les souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ (Fig.14). Avec *Trichoderma viride* par contre, un maximum d'activité CMC_{Case} à 1.37 UI/ml est observé en présence d'une faible concentration en NaCl (10 mM ≈ 0.58 g/l) (Gautam et al., 2010).

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse de la variance, cette dernière a permis de conclure que le NaCl affecte la production des cellulases chez les deux souches étudiées.

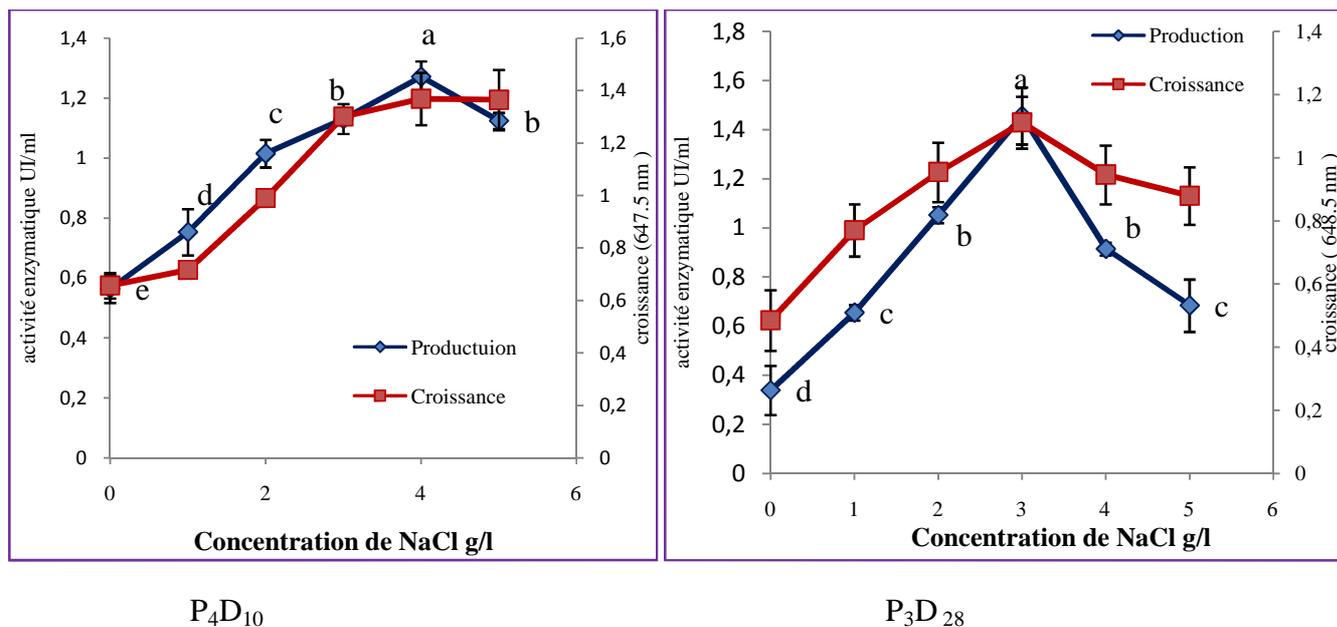


Figure 14: Effet de NaCl sur production de cellulases

Une étude menée par El-Sersy et *al.* (2010) a démontré que la concentration de NaCl a un effet important sur la production de cellulases de la souche *Streptomyces ruber* où la production maximale est obtenue avec une concentration de 1.5g/l.

Les résultats d'une autre étude réalisée par Murugan et *al.* (2007), en étudiant l'effet de la concentration de NaCl sur la production de cellulases d'une souche actinomycète isolée à partir d'un poisson *Mugil cephalus*, ont montré qu'une meilleure production est obtenue avec 1 et 2% de NaCl.

3.6. Effet de la température

Les résultats (Fig.15) montrent que la production et la croissance des souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ sont fonction de la température où les maxima d'activités sont obtenus à 28°C et 45°C respectivement.

L'analyse de la variance a permis de conclure que la température a un effet significatif sur la production de cellulases sur les deux souches étudiées.

Certaines recherches révèlent que l'effet température est lié de l'origine de l'enzyme et à la nature du substrat mis en jeu. En effet, la température optimale des cellulases fongiques varie entre 40 et 70 °C alors que celle des bactéries varie entre 50 et 100°C, ce qui explique leur utilisation en industrie du textile (Ando et *al.*, 2002).

Concernant la souche P₄D₁₀, des résultats similaires ont été observés par Narasimha et *al.* (2006) avec *Aspergillus niger* où une production maximale de 0.775UI/ml est obtenue à 28°C

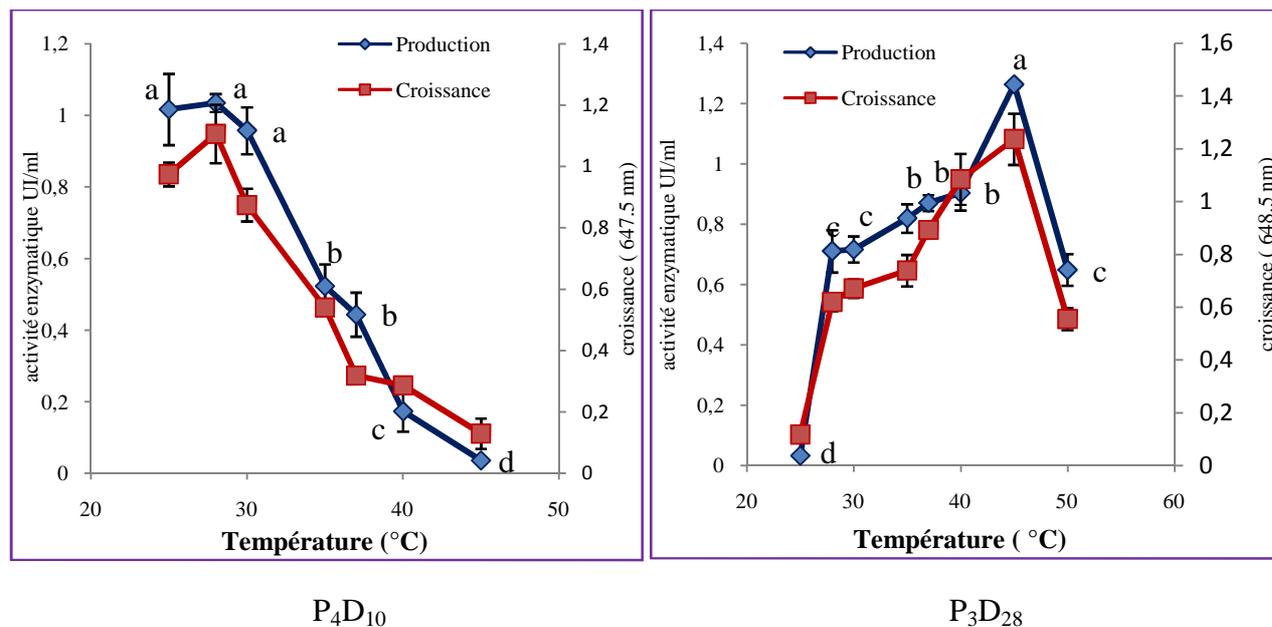


Figure 15: Effet de la température sur la production de cellulases.

plusieurs auteurs ont rapporté des optima de production avec un intervalle de température de 30 à 55°C avec des souches de *Streptomyces omiyaensis* (Alam et al., 2004) ; *Streptomyces sp J2* (Jaradat et al., 2008) ; *Streptomyces ruber* (El-Sersy et al., 2010). *Streptomyces lividans*, *Streptomyces flavogrisus*, *Streptomyces nitrosporus* (Mc Carthy, 1987) et *Streptomyces reticuli* (Schrempf et Walter, 1995)

3.7. Effet du pH initial

Les résultats (fig.16) indiquent que la production de cellulases chez les deux souches dépend du pH.

La souche P₄D₁₀ révèle une croissance et une activité cellulase importante entre pH7 et 9 avec un optimum à pH 8. En revanche, la souche P₃D₂₈ se développe dans une gamme de pH allant de 6 à 10, avec un optimum de production à pH 9.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec une souche d'actinomycète thermophile (Aboul-Enein et al., 2010) et une souche de Streptomyces alcaline (Solingen et al., 2001).

Avec *Aspergillus niger* les optima de production de CMCases sont observée avec des pH de 4 et 6 (Acharya et al., 2008 ; Mc Cleary et Glemie-Holmes, 1985 et Gautam et al., 2010).

Par ailleurs, l'analyse de la variance montre que les différentes valeurs de pH influencent significativement la production de CMCases des deux souches.

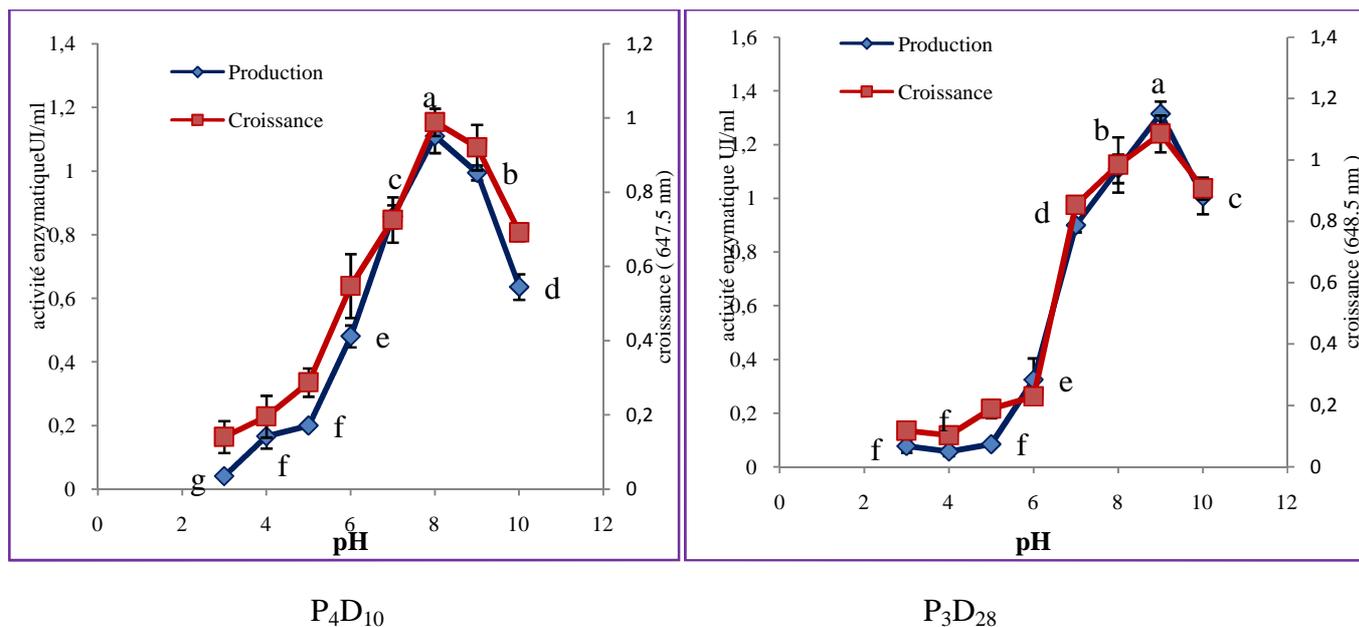


Figure 16: Effet du pH initial sur la production de cellulases.

La faible production aux pH acides est due à l'effet inhibiteur, le pH influence le transport de différents types d'enzymes à travers la membrane cellulaire, et limite la croissance et la production enzymatique en réduisant l'accessibilité de substrat à son enzyme.

3.8. Effet des sources de carbone

La figure 17 montre des activités enzymatiques et des croissances variables avec les sources de carbone testées. Cependant l'activité enzymatique la plus élevée est observée avec la source de carbone CMC pour les deux souches.

On a remarqué aussi une production appréciable de cellulases dans les cultures avec le xylane, le cellobiose, le maltose, l'amidon et le glucose, et une très faible activité avec l'arabinose et l'avicel. Ceci révèle que les deux souches dégradent préférentiellement les substrats de type lignocellulosiques.

L'analyse de la variance confirme les différences significatives observées.

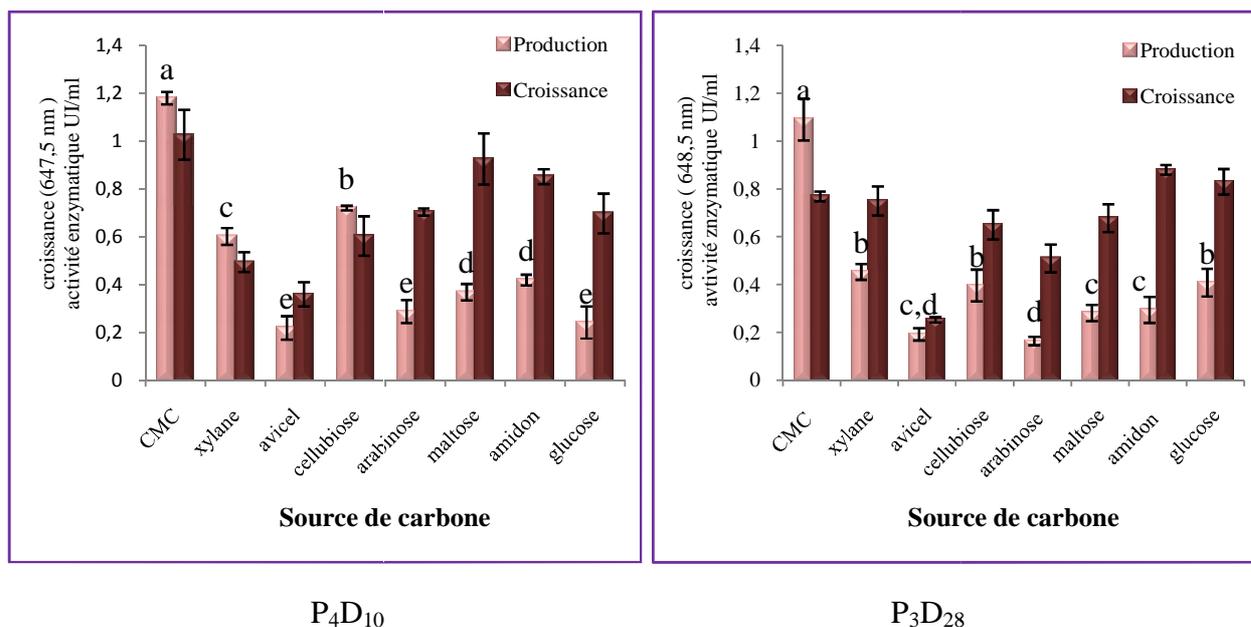


Figure 17: Effet des sources de carbone sur la production de cellulases.

La CMC comme source de carbone préférentielle a été rapportée par plusieurs auteurs, (Narasimha et al., 2006 ; Niranjane et al., 2007 et Abou Taleb et al., 2009) par contre d'autres travaux indiquent des productions maximales avec de la paille de riz (Lee et al., 2010) avec une souche de *Penicillium purpurogenum* ou de la cellulose avec une souche de *Streptomyces sp* J2 (Jaradat et al., 2008).

3.9. Effet des sources d'azote

Parmi ces sources d'azote, organiques et inorganiques, le chlorure d'ammonium s'est révélé comme étant le meilleur stimulant des cellulases de la souche P₄D₁₀ (1.114 UI/ml) suivi par la peptone puis la nitrate d'ammonium (Fig.18).

Par ailleurs, une production accrue de cellulases par la souche P₃D₂₈ est observée dans les cultures en présence des sources minérales d'azote, notamment avec le nitrate de potassium (1.393 UI/ml) et chlorure d'ammonium (1.314 UI/ml).

En revanche, l'extrait de malt s'est avéré comme étant le meilleur stimulant de la croissance des deux souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈. Ce dernier constitue également une source de carbone.

Les résultats rapportés par la littérature ont variables. Certains rapportent sur des souches de *Bacillus subtilis* et *Bacillus circulans* des productions meilleures avec des sources d'azote organiques tel que la peptone (Ray et al., 2007 et Lee et al., 2010) et d'autres avec des sources inorganiques l'urée (Narasimha et al., 2006), et sulfate d'ammonium (Vyas et al., 2005 et Acharya et al., 2008) comme seule source d'azote.

Toutefois Concernant la souche P₄D₁₀, nos résultats concordent avec ceux rapportés par Jaradat et al. (2008) avec une souche de *Streptomyces sp*J2.

A la lumière de ces résultats, il s'avère que les souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ ne présentent pas d'exigences particulières en matière de sources d'azote pour la production de cellulases.

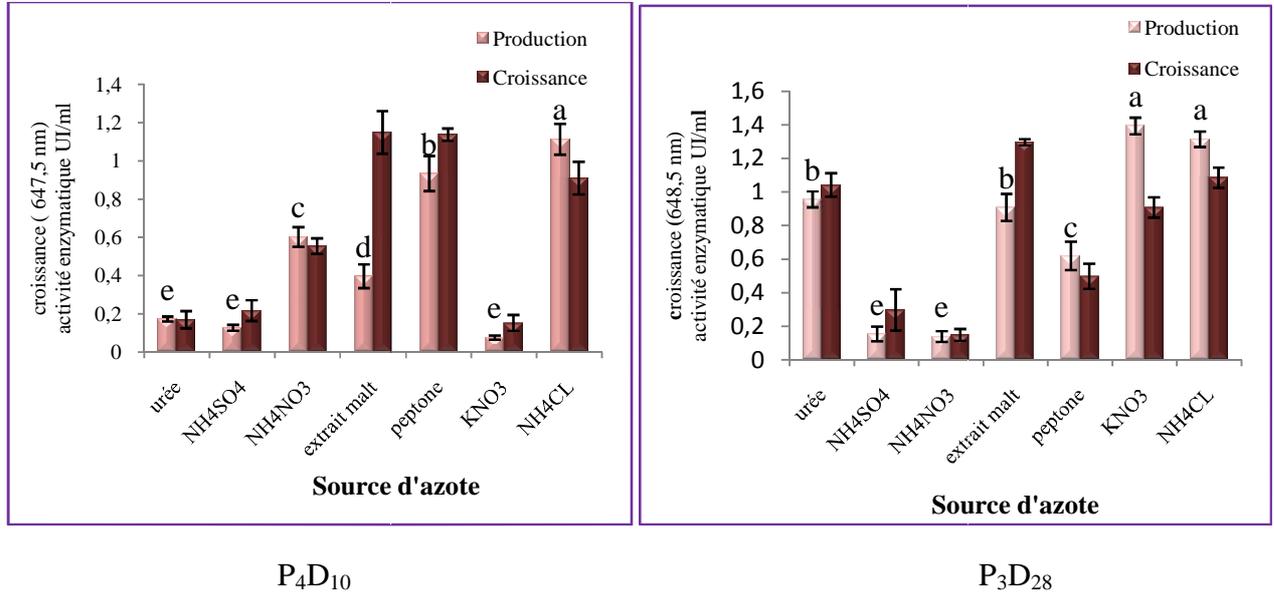


Figure 18: Effet de source d'azote sur la production de cellulases.

5.6. Effet du temps d'incubation

La figure 19 montre que les souches se développent de façon exponentielle pendant 4 jours d'incubation, puis entrent en phase stationnaire et déclinent.

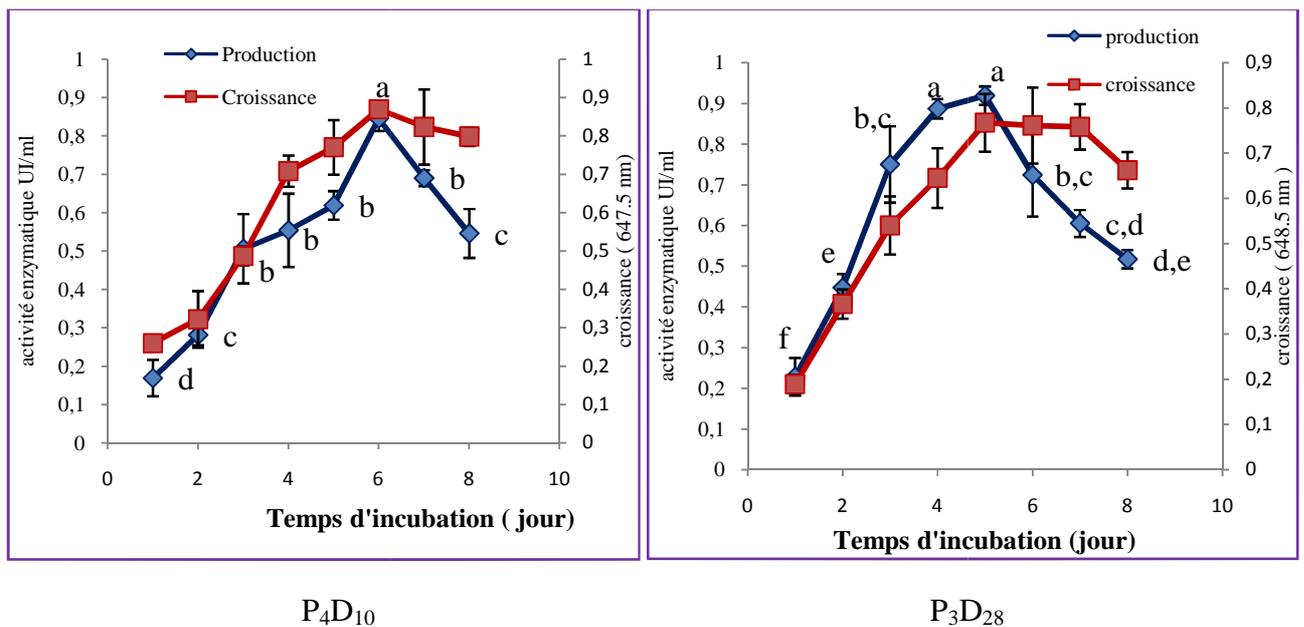


Figure 19: Effet du temps d'incubation sur la production de cellulases.

Des maxima d'activité (0.845 UI/ml et 0.919 UI/ml) et de croissance (Do 0.869 et 0.767) sont atteints au bout de 6 et 5 jours d'incubation respectivement pour les souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈. La production d'enzymes est probablement liée aux variations morphologiques et physiologiques de la souche durant la culture. Puis, une diminution considérable de l'activité enzymatique est constatée. Cette diminution est corrélée avec l'épuisement du milieu en nutriments nécessaires à la croissance (Roméro et al., 1999).

La littérature rapporte également des temps d'incubation très variables selon les souches utilisées et dont certains concordent avec nos résultats notamment concernant la souche P₄D₁₀ (Gautam et al., 2010).

Des maxima d'activité cellulase sont observés à 4 jours d'incubation avec des souches *Trichoderma harziam*, *Trichoderma ssp* et *phanerochaete chrysosporium* (Khan et al., 2007), à 3 jours avec *Streptomyces sp J2* et *Streptomyces flavogriseus* (Jaradat et al., 2008 ; Ishaque et Kluepfel, 1980) et 12 heures avec *Aspergillus flavus* (Ojumu et al., 2003).

4. Caractérisation de cellulases dans le surnageant

4.1. Effet de la température

L'effet de la température sur l'activité enzymatique est illustré dans la Figure 20. On constate que les températures optimales sont de 50 °C et 60°C. A 80°C les activités relatives sont de 8.2 et 19.43% respectivement pour les souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈.

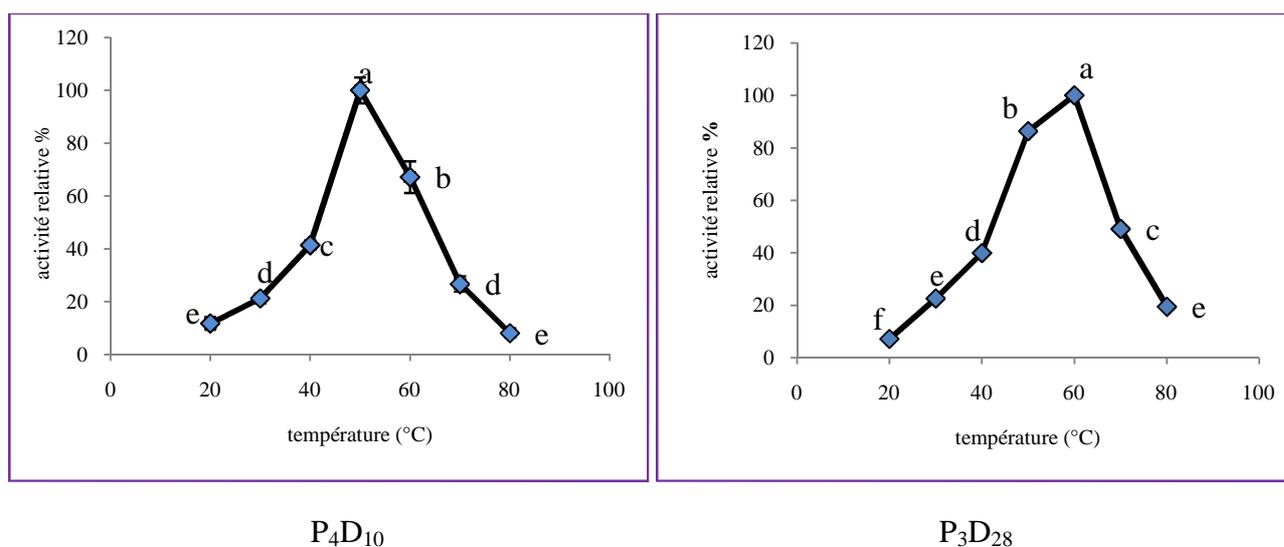


Figure 20: Effet de la température sur l'activité enzymatique

Certains travaux ont rapportés des températures optimales qui peuvent atteindre 60, 65 et 70°C, pour les endoglucanases de *Thermococcus aurantiacus*, *Sporotrichum thermophilie* (Raza et Ur-Rehmane, 2008) et *Chaetomium thermopgile* (Grajek, 1987). En revanche, une activité maximale à 35°C est constatée par Chen et al. (2004), avec l'extrait enzymatique de *Sinorhizobium fredii*.

Concernant la souche P₄D₁₀, nos résultats concordent avec ceux obtenus par, Hurst et al. (1977), Coral et al. (2002) et Li et al. (2009) avec des extraits de *Trichoderma viride*,

Par ailleurs, les résultats obtenus avec la souche P₃D₂₈ sont aussi comparables avec ceux obtenus par (Aboul-Enein et al., 2010) avec une souche d'actinomycète thermophile et d'autres travaux avec *Bacillus sp* KD1014 (Lee et al., 1999), *Bacillus subtilis* YJ1 (Yin et al., 2010) et *Streptomyces sp*J2 (Jaradat et al., 2008).

Sur des endoglucanases et β - glucosidases, purifiées il a été observé des activités enzymatiques optimales à 50°C et 70°C (Kim et al., 2009 ; Workman et al., 1982 et Gao et al., 2008).

4.2. Effet du pH

L'activité enzymatique de la souche P₄D₁₀ est importante entre 6 et 8 avec un optimum à pH 7. En revanche, les cellulases de la souche P₃D₂₈ sont actives aux pH de 7 à 11 avec un maximum d'activité à pH10 (Fig. 21). Les tests statistiques confirment l'effet significatif de ces résultats.

Les pH acides ou alcalins modifient la charge du substrat en diminuant l'affinité et l'efficacité catalytique de l'enzyme, et dénaturent les structures secondaires ou tertiaires des cellulases et par conséquent le site actif (Begum et Absar, 2009).

Plusieurs études réalisées sur la CMCase purifiée révèlent des activités maximales entre pH 5 et 6 (Grigorevski de Lima et al., 2005 ; Lee et al., 1999 ; Begum et Absar, 2009 ; Yin et al., 2010 ; Amouri et Gargouri, 2006 et Jaradat et al., 2008).

Solingen et al. (2001) rapportent une 'activité CMCcase maximale à pH 8 avec une souche alcaline *Streptomyces sp*.

A la lumière de ces résultats, les cellulases des souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ présentent des propriétés potentiellement intéressantes pour une application dans l'industrie de papeterie.

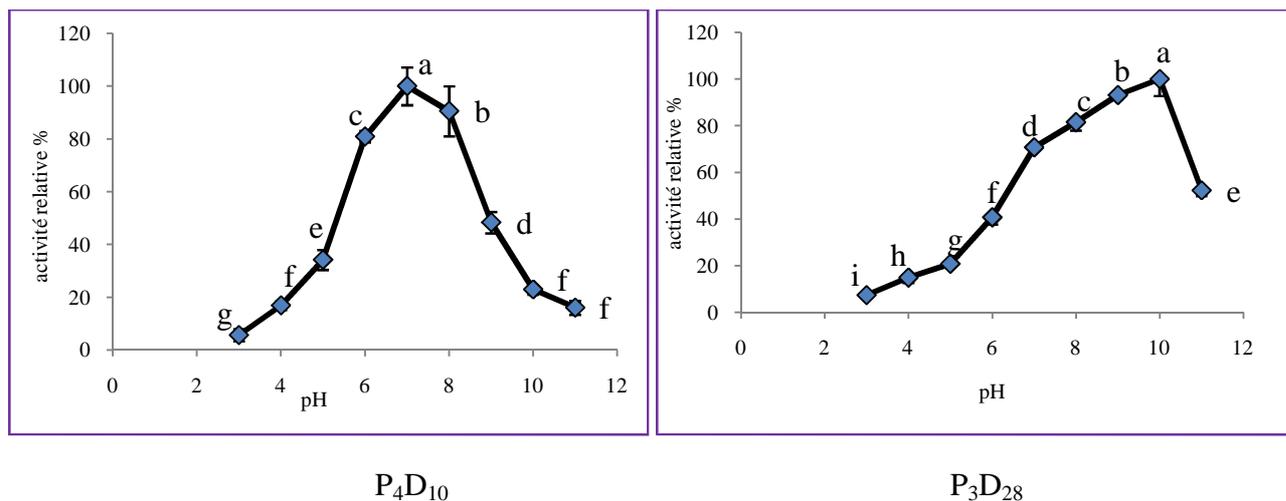


Figure 21: Effet du pH sur l'activité enzymatique

4.3. Thermostabilité

- **En absence du substrat :**

Les enzymes des 2 souches montrent une bonne stabilité à 50 et 60°C.

Les temps de demi-vie de la souche P₃D₂₈ sont de plus de 6h à 50 et 60°C et l'activité relative est de 11.63% après 6h d'incubation à 70°C (Fig.22).

L'enzyme de la souche P₄D₁₀ révèle un temps demi-vie de 4h à 50°C et entre 2 et 3 h à 60°C. Sa stabilité diminue à 70°C avec une activité relative de 5.23% constatée à 6h d'incubation.

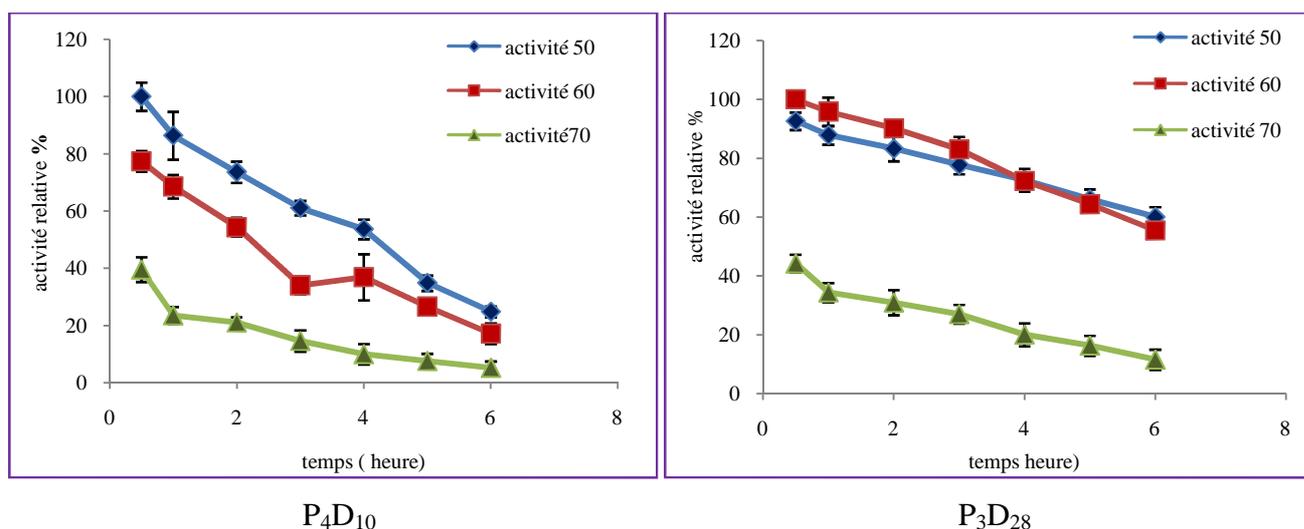


Figure 22: Thermostabilité des cellulase en absence du substrat (CMC).

- **En présence du substrat :**

L'activité enzymatique de la souche P₄D₁₀ est relativement stable à 50°C entre 30min et 2h, elle présente un temps de demi-vie de 4h. Par contre, l'activité enzymatique à 60°C et 70°C diminue jusqu'à atteindre 13.7 et 6.56%. En revanche, l'enzyme de la souche P₃D₂₈ montre une bonne stabilité à 50 et 60°C avec un temps de demi-vie de plus de 6h. A 70°C la stabilité diminue pour atteindre une activité relative de 15.01% (Fig.23).

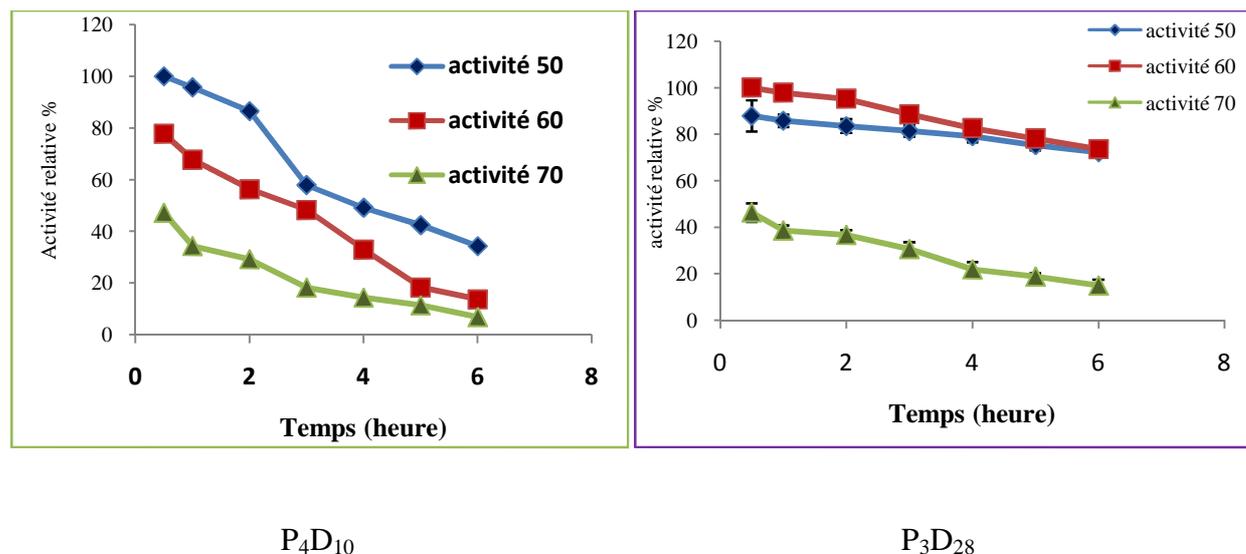


Figure 23: Thermostabilité des cellulases en présence du substrat.

Les résultats de la thermostabilité en présence et en absence du substrat laissent supposer que le substrat (CMC) exerce un effet protecteur sur l'enzyme ce qui la rend plus thermostable.

Généralement, la thermostabilité des enzymes s'explique également par la présence de certaines liaisons (hydrogènes, hydrophobes, interactions ioniques, liaisons avec métaux et ponts disulfures) dans leurs structures secondaires et tertiaires. Ces liaisons déterminent des séquences particulières en acides aminés situés à des endroits stratégiques pour permettre aux enzymes de résister à la dénaturation thermique (Scriban, 1999).

La thermostabilité est un des critères de sélection des enzymes destinées à la biotechnologie (Tuncer et al., 1999).

La cellulase de la souche *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 exhibe une thermostabilité élevée où plus de 80% de l'activité enzymatique est maintenue à une gamme de température de 50 à 70 après 20 heures d'incubation à pH 8 (Lee et al., 2008).

4.4. Effet des ions métalliques

Les résultats de l'effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique sont présentés dans la figure 24.

les cellulases de la souche P₄D₁₀ sont fortement inhibées en présence des ions Zn²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Hg²⁺ et Fe²⁺. Alors que, l'ion Co²⁺ stimule l'activité enzymatique de 16.34%.

Concernant la souche P₃D₂₈, on note une inhibition appréciable de la cellulase en présence des ions Hg²⁺ et Fe²⁺ ainsi qu'une stimulation de 10.35% de l'activité cellulasique.

Des résultats similaires sont observés sur des cellulases produites par *Chalara paradoxa* (Lucas et al., 2001) et *Acetivibrio cellulolyticus* (Mackenzie et Bilous, 1982).

On suppose que les ions Co²⁺ et Mn²⁺ réagissent avec certains résidus d'acides aminés du site actif, ce qui engendre un changement de conformation favorable à une activité plus élevée

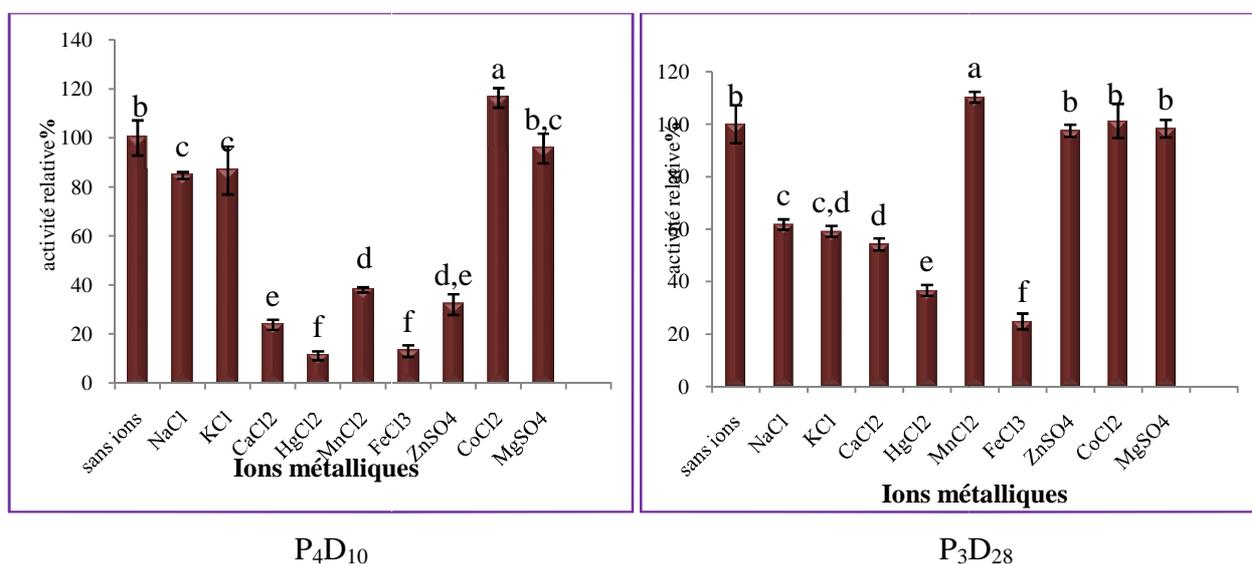


Figure 24: Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique

L'inhibition de l'activité cellulase par l'addition des métaux de transition (Fe²⁺ et Zn²⁺) pourrait être expliquée par l'établissement de liaisons covalentes entre les résidus du site actif de l'enzyme et les métaux. Il est évident qu'une telle action doit se répercuter sur la conformation de l'enzyme.

L'inhibition de l'activité enzymatique par les ions Hg²⁺ pourrait être due à la présence des groupements thiol dans le site catalytique (Korich, 2003).

Les résultats expérimentaux effectués par Grigorevski de Lima et al. (2005) indiquent que l'activité CMCase de la souche *Streptomyces drozdowiczii* est fortement stimulée par les ions Mg²⁺, Ba²⁺, Fe²⁺, K⁺ et faiblement par l'ion Na⁺, et elle est inhibée par la présence de l'ion Cu²⁺ dans le mélange réactionnel.

4.5. Effet des agents dénaturants

Les agents dénaturants tels que le tween 80 et le glycérol ne présentent aucun effet sur l'activité enzymatique de la souche P₃D₂₈, par contre le triton X-100 et le SDS diminuent respectivement l'activité de 19.66% et 21.68% (Fig.25).

Par ailleurs, une faible réduction de l'activité enzymatique de la souche P₄D₁₀ est remarquée en présence du glycérol, du SDS et du tween 80 avec des pourcentages de 25.24%, 21.68% et 25.24%, et aucun effet n'est obtenu en présence du triton X-100.

Les tests statistiques concluent que les résultats obtenus avec les agents dénaturants ont un effet significatif sur l'activité enzymatique des souches étudiées.

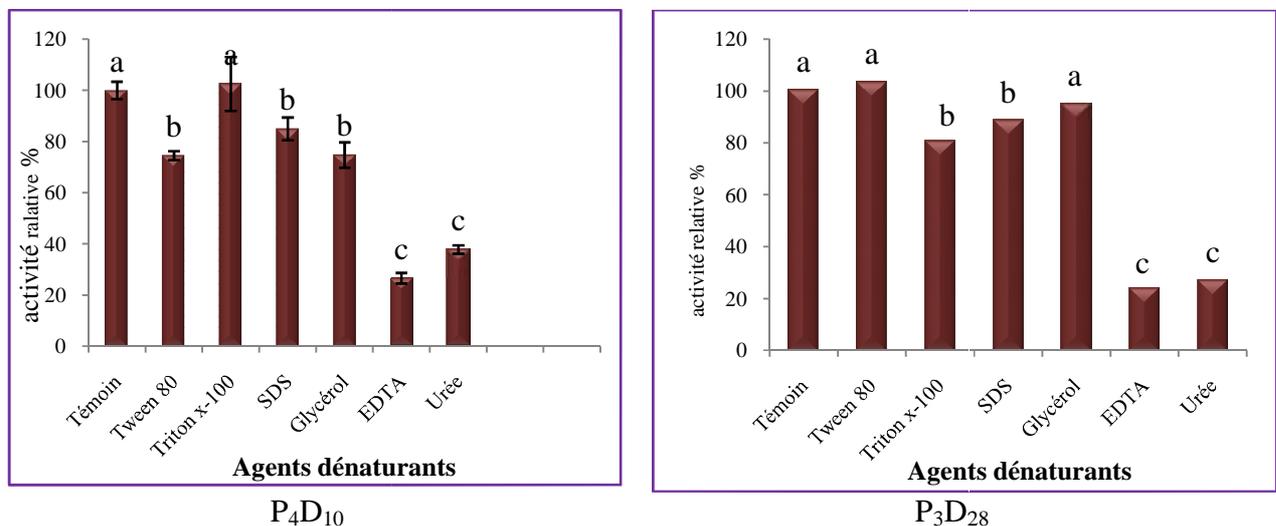


Figure 25: Effet des agents métalliques sur l'activité enzymatique.

L'inhibition observée par l'effet chélateur de l'EDTA signifie que les enzymes des souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ sont de nature métalloprotéique. En outre, l'inhibition par l'urée peut être due à la rupture des liaisons hydrogènes intramoléculaires et l'affaiblissement des interactions hydrophobes dans les protéines provoquant la solubilisation des chaînes apolaires.

4.6. Effet du glucose

Les activités cellulaisiques des souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ augmentent en fonction de la concentration de glucose jusqu'à atteindre des valeurs maximales à 1 mM et 0.5 mM respectivement (Fig.26). Les tests statistiques attestent l'effet significatif des résultats obtenus

Comme le glucose est un produit final d'hydrolyse enzymatique, sa faible concentration joue un rôle stimulateur de l'activité enzymatique, par contre sa forte concentration exerce un effet inhibiteur.

Des résultats rapportés par Kotchoni et *al.* (2006) sur l'activité CMCase d'un mutant de *Bacillus pumilus* montrent que l'activité CMCase est affectée seulement à partir de 10Mm de glucose.

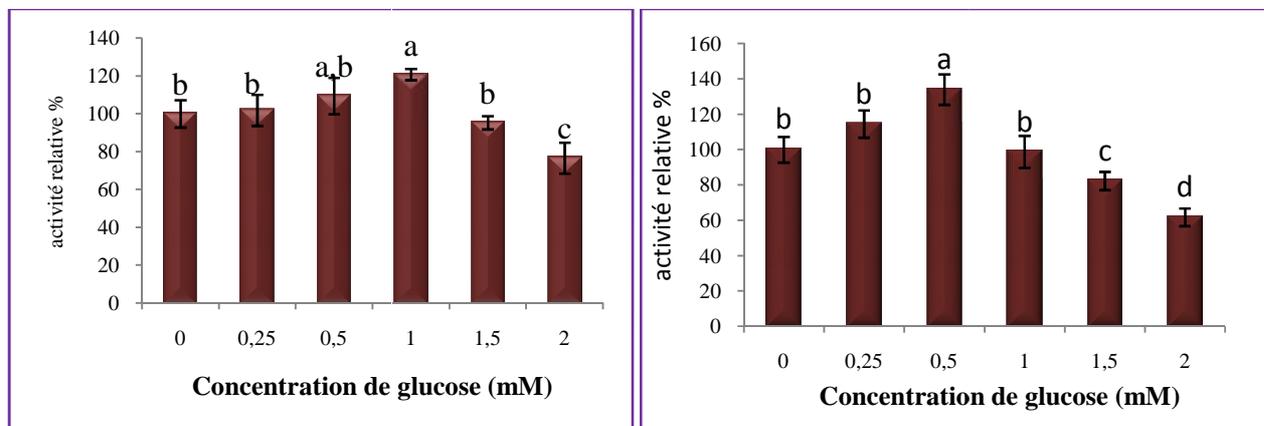
P4D₁₀P3D₂₈

Figure 26: Effet de concentration du glucose sur l'activité enzymatique.

4.7. Effet du CMC

Les résultats (Fig.27), montrent que les activités maximales des cellulases des souches P4D₁₀ et P3D₂₈ sont obtenues avec des concentrations de 1.5% et 2 % de CMC respectivement. L'augmentation de la concentration de CMC exerce probablement une inhibition par excès de substrat sur l'activité enzymatique. Une l'inhibition de CMCase a été obtenue par Lee et *al.* (2010) avec 0.6 % de CMC sur une souche de *Penicillium purpurogenum*.

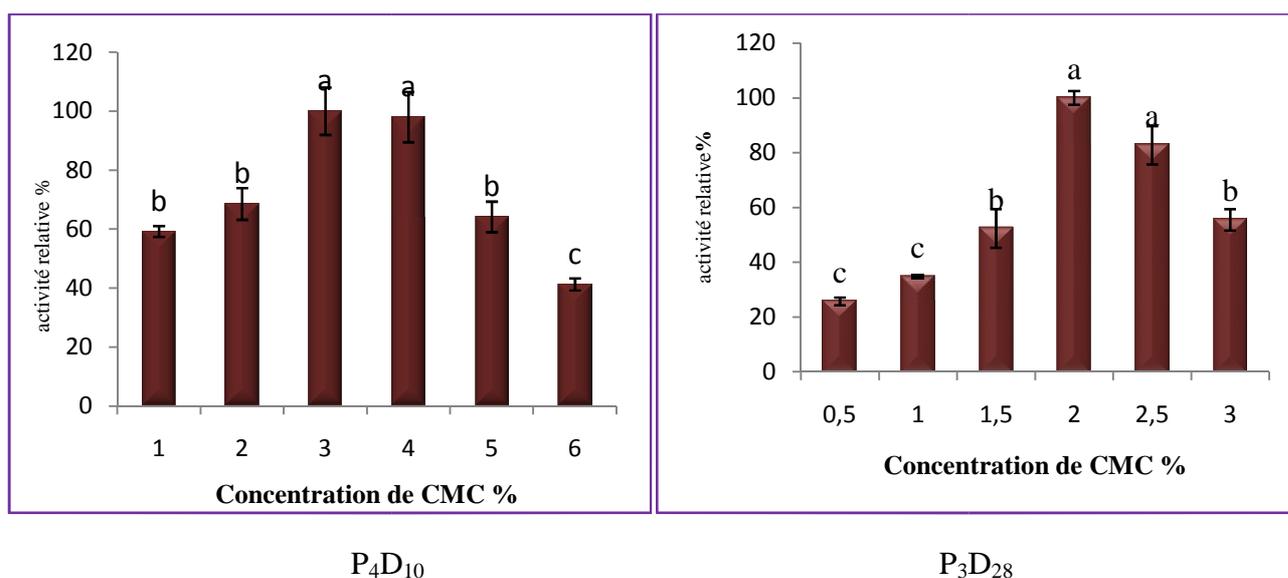
P4D₁₀P3D₂₈

Figure 27: Effet des concentrations de CMC sur l'activité enzymatique.

4.8. Stabilité à 4°C

Les activités enregistrées montrent que la cellulase de la souche P₃D₂₈ est relativement stable durant deux semaines, puis une diminution de l'activité est notée, tandis que celle de la souche P₄D₁₀ perd son activité dès la première semaine (Fig. 28).

L'instabilité des enzymes à 4°C s'explique par la prépondérance des liaisons hydrophobes, et une proportion importante de groupes non polaires dans la séquence de la protéine. Les liaisons hydrophobes sont déstabilisées à basse températures contrairement aux liaisons hydrogènes qui sont plus stables.

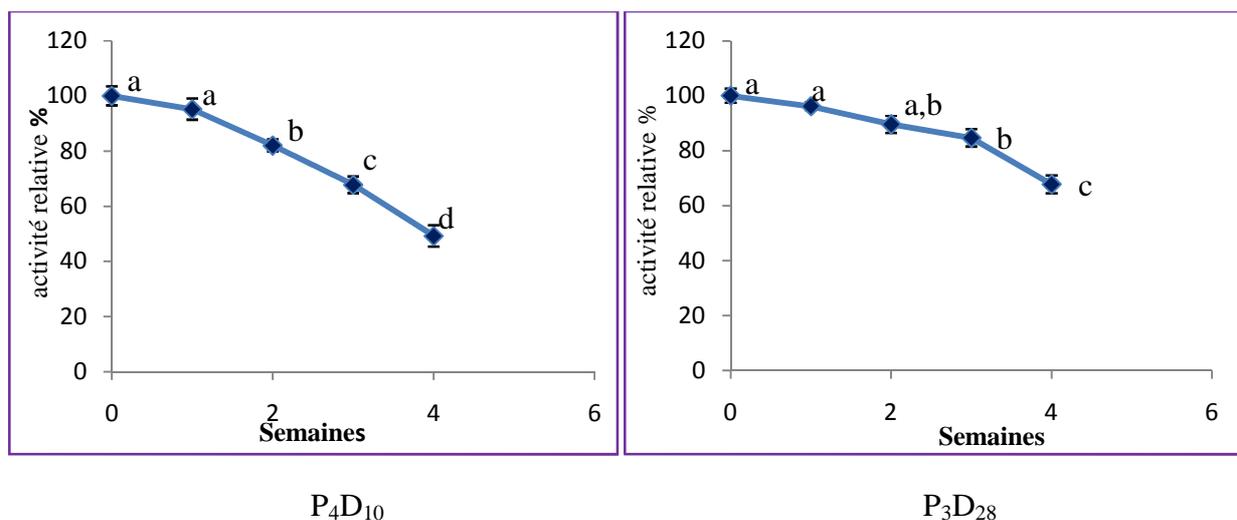


Figure 28: Stabilité à 4°C des activités enzymatiques.

4.9. Spécificité vis-à-vis des substrats

Les cellulases des souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ dégradent tous les substrats testés. Cependant une affinité très élevée est observée pour la CMC avec une activité relative de 100%. Pour les 2 souches (1.411 UI/ml et 1.403 UI/ml) (Fig.29).

Les résultats obtenus concordent avec plusieurs travaux réalisés dans ce contexte qui étudient la spécificité des cellulases aux différents substrats et qui montrent une meilleure affinité vis-à-vis de CMC (Begum et Absar, 2009 ; Yin et *al.*, 2010 et Lee et *al.*, 2008).

Néanmoins, des cellulases d'une souche de *Penicillium purpurogenum*, ont montré une forte affinité vis-à-vis de lichenane (Lee et *al.*, 2010).

La détermination des paramètres cinétiques à savoir la vitesse maximale et la constante de Michaelis pourraient donner une information plus précise sur l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat.

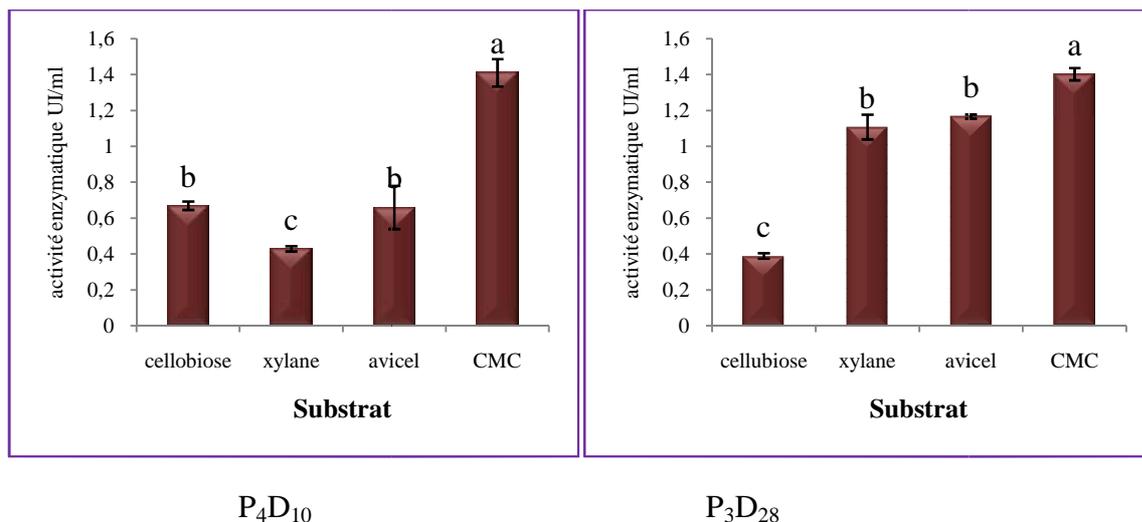


Figure 29: Spécificité vis-à-vis de différents substrats.

4.10. Etude des produits d'hydrolyse de CMC

Les produits d'hydrolyse de CMC révélés sont essentiellement le glucose pour la souche P₄D₁₀ et glucose et cellobiose pour la souche P₃D₂₈

Le témoin de CMC sans l'extrait enzymatique brut n'a pas migré.

Tenant compte de la spécificité vis-à-vis des substrats, ces résultats révèlent la présence d'une β -glucosidase et une endo ou exo glucanase dans le surnageant de la souche P₄D₁₀.

Le surnageant de la souche P₃D₂₈ contient par contre, un seul type d'enzyme qui présente un mode d'action endohydrolytique. Mais pour confirmer avec certitude ces résultats, il est nécessaire d'inclure dans l'analyse les produits d'hydrolyse : cellobiose, cellotriose, cellotetrasoe, et cellopentose.

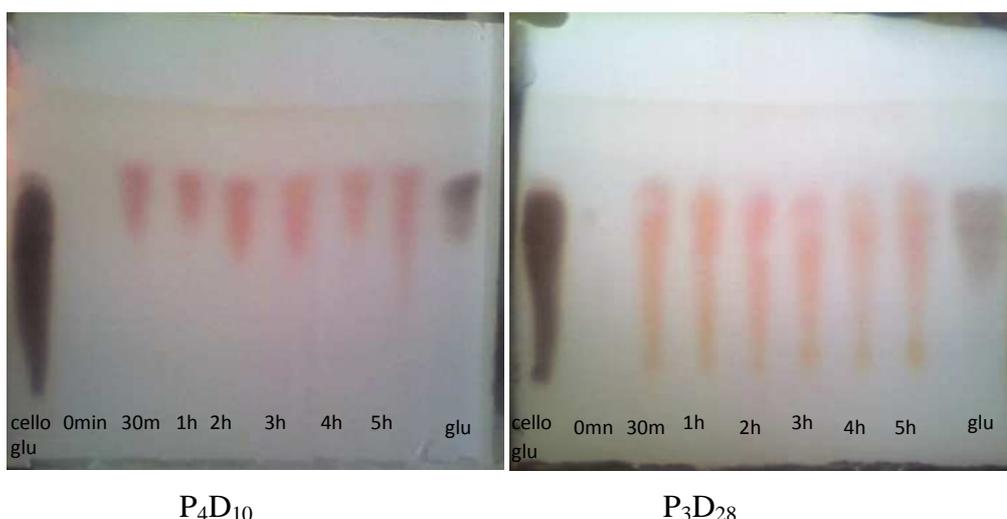


Figure 30: Produits d'hydrolyse de CMC analysés par CCM.

11. SDS-PAGE et zymogramme

La masse moléculaire de la CMCase est déterminée par extrapolation sur la courbe d'étalonnage préétablie avec des marqueurs protéiques de masses moléculaires connues.

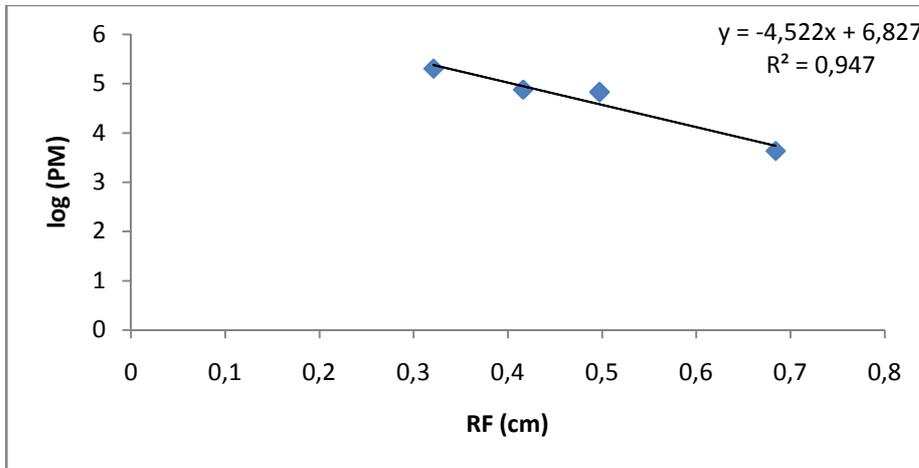


Figure 31 : Courbe d'étalonnage des marqueurs protéiques pour l'estimation du poids moléculaires

Les résultats de SDS-page révèlent deux bandes pour la souche P₄D₁₀ et une seule bande bien distincte pour la souche P₃D₂₈.

Les bandes de la souche P₄D₁₀ présentent des masses moléculaires de 150 KDa et 79 KDa, et celle de la souche P₃D₂₈ de 166.5 KDa. Ces résultats indiquent la présence de deux sous unités ou isoenzymes pour la souche P₄D₁₀. Mais ces résultats restent préliminaires et pour les confirmer il est nécessaire d'effectuer une électrophorèse en conditions natives.

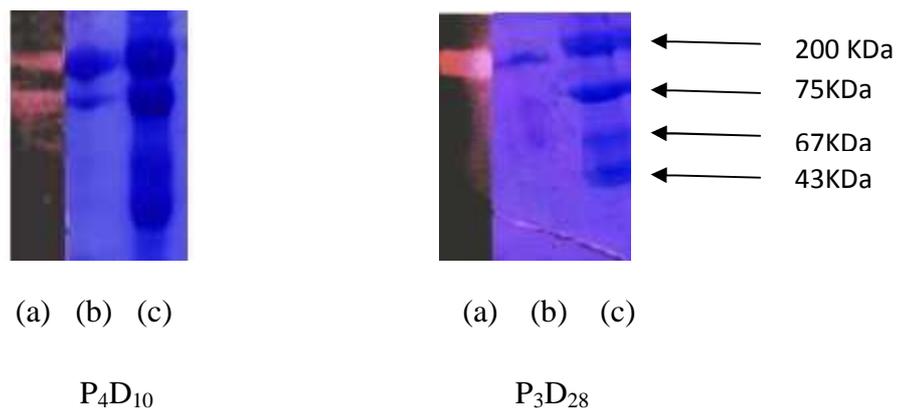


Figure 32 : Profil de migration des protéines du surnageant des souches (SDS-PAGE) et Zymogramme.

(a) : zymogramme du surnageant concentré, (b) : Surnageant concentré et (c) : Marqueurs

Les résultats du zymogramme réalisé selon la technique de Gallardo et *al.* (2004) montrent que la souche P₄D₁₀ produit deux cellulases et la souche P₃D₂₈ une seule.

Ces résultats nous montrent que les masses moléculaires obtenues dans les extraits bruts des souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ restent dans la gamme des masses moléculaires obtenues dans la littérature.

Certaines cellulases d'écrites révèlent des masses moléculaires entre 150 et 170 KDa (Kotchoni et *al.*, 2006 ; Huang et Monk, 2004 ; Amouri et Gargouri, 2006 et Yoshimasu et *al.*, 1990), et d'autres entre 55 et 94 KDa (Lee et *al.*, 2008 ; Chen et *al.*, 2004 et Alam et *al.*, 2004)

CONCLUSION

Parmi les nombreuses propriétés des actinomycètes, nous signalons leur capacité à produire une variété de substances intéressantes du point de vue industriel et les enzymes occupent une place importante après les antibiotiques

Ce travail nous a permis la sélection de deux souches d'actinomycètes locales P₄D₁₀ et P₃D₂₈ productrices de cellulases (Bejaia)

Les tests d'identification basés sur les caractères morphologiques et l'analyse des constituants cellulaires ont permis de rattacher les deux souches au genre *Streptomyces*. Actuellement, la détermination de nouvelles espèces s'effectue non seulement par des méthodes phénotypiques mais aussi par des critères chimiques et des critères moléculaires qui s'avèrent être essentiels.

La production a été optimisée afin d'atteindre une activité cellulastique maximale. Celle-ci est obtenue dans un milieu contenant :

Pour la souche P₄D₁₀ : 7 g/l de CMC, 2 g/l d'extrait de levure, 0,5 g/l de sulfate de magnésium, 4 g/l de chlorure d'ammonium et 4 g/l de chlorure de sodium

pour la souche P₃D₂₈ : 5g/l de CMC, 2,5 g/l d'extrait de levure, 0,4 g/l de sulfate de magnésium, 2 g/l de chlorure d'ammonium, 3 g/l de chlorure de sodium.

L'effet de la température et du pH sur la production de cellulases montrent que la production se caractérise par des maxima de température de 28 et 45 °C et des pH de 8 et 9. Une meilleure production est observée avec la CMC comme source de carbone au bout de 6 et 4 jours d'incubation pour les souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ respectivement. Ceci permet d'envisager une éventuelle production de ces enzymes sur des matières lignocellulosiques avec des sources minérales d'azote, (nitrate de potassium et chlorure d'ammonium) peu coûteuses

Les souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ produisent des cellulases actives à des températures élevées, avec des maxima à 50 et 60°C, ainsi qu'aux pH neutres : 7 ou alcalins : 10. Ces propriétés relativement rares chez les cellulases, sont parmi celles requises pour une éventuelle application dans les industries de papeterie et la production de bioéthanol.

L'étude de la thermostabilité de l'enzyme en absence de substrat révèle une forte résistance aux températures élevées. Les temps de demi-vie à 50 C sont de 4h pour la souche P₄D₁₀ et plus de 6 h à 60 ° pour la souche P₃D₂₈. Cette thermo stabilité plaide également pour une utilisation industrielle de l'enzyme.

L'effet des ions métalliques montre que l'ion CO^{+2} stimule l'activité cellulasique de la souche P_4D_{10} et une inhibition importante de l'activité enzymatique est observée pour les ions Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} et Fe^{2+} . L'activité cellulasique de la souche P_3D_{28} est stimulée par l'ion Mn^{2+} et inhibée par les ions Hg^{2+} et Fe^{2+} .

En présence des réactifs chimiques, Les cellulases des souches P_4D_{10} et P_3D_{28} semblent résister au SDS alors qu'une inactivation importante est observée en présence de l'EDTA et de l'urée chez la plupart des cellulases.

Les concentrations de glucose étudiées inhibent l'activité cellulasique à partir de 1 et 1.5 mM sur les deux souches

Les cellulases des deux souches peuvent être conservées à 4°C pendant deux semaines, au-delà, une perte d'activité cellulasique est constatée.

Les produits d'hydrolyse de la CMC sont essentiellement le glucose (P_4D_{10}) cela nous laisse à supposer l'existence d'une β -glucosidase et une cellulase de type endo ou exoglucanase, et le glucose et cellobiose (P_3D_{28}) ce qui suggère que l'enzyme présente un mode d'action endohydrolytique. Pour confirmer avec ces résultats, il est nécessaire d'analyser les produits d'hydrolyse de type cellobiose, cellotriose, cellotetraose, et cellopentose

L'analyse de SDS-PAGE et zymogramme ont révélé l'existence d'une seule bande et deux bandes actives ayant des masses moléculaires de 166.5 KDa, 150 KDa et 79 KDa pour les souches P_3D_{28} et P_4D_{10} respectivement.

A l'issue de ce travail, nous émettons quelques réflexions et voies d'investigations sous forme de perspectives pour une meilleure exploitation de ces résultats préliminaires:

- Approfondir les tests d'identification pour les isolats étudiés (chimiotaxonomiques et moléculaires) afin de les affilier aux espèces correspondantes.
- Purifier les CMCs pour mieux les caractériser et envisager leur utilisation soit dans l'amélioration de la digestibilité en alimentation animale ou dans les procédés industriels.
- Tester les souches sur différents déchets lignocellulosiques pour rentabiliser la production de cellulases

Références bibliographiques

A

- Abou-Taleb K. A. A., Mashhoor W. A., Nasr S. A., Sharaf M.S. and Abdel-Azeem H. H. M. (2009).** Nutritional and Environmental Factors Affecting Cellulase Production by Two Strains of Cellulolytic Bacilli. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* **3(3)**: 2429-2436.
- AbouI-Enein H.Y. and Ali I. (2000).** Macrocyclic antibiotics as effective chiral selectors for enantiomeric resolution by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Chromato.* **52(11-12)**: 679-691.
- Aboul-Enein A., Abou elalla F., Serour E. and Hussien T. (2010).** Purification and characterization of a novel thermoactive cellulase from thermophilic Actinomycetes isolated from soil sample of Egypt. *Int. J. Aca. Res.* **2 (1)**: 81-86.
- Acharya P. B., Acharya D. K. and Modi H. A. (2008).** Optimization for cellulase production *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. *Afr. J. Biotechnol.* **7(22)** : 4147-4152.
- Adsul M. G., Bastawde K.B., Varma A. J., Gokhale D.V. (2007).** Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. *Bioresource . Technology.* **98** :1 467-1473.
- Aftab A. and Vermette P. (2008).** Culture-based strategies to enhance cellulose enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemil. Engin. J.* **40** : 399-407.
- Alais C. and Linden G. (1997).** Biochimie alimentaire. Edition : Masson. Paris. 248p.
- Alam M. Z., Manchur M. A. and Anwar M. N. (2004).** isolation, Purification, Characterization of cellulolytic Enzymes Produced by the Isolate *Streptomyces omiyaensis*. *Pak. J. Biol. Sci.* **7(10)**: 1647-1653.
- Amouri B. and Gargouri A. (2006).**characterization of a novel β -glucosidase from a *Stachybotrys* strain. *Biochim. engin. gJ.* **32**: 191-197.
- Anansiriwattana W., Tanasupawat S., Amnuoypol S. and Suwanborirux K. (2006).** Identification and antimicrobial activities of actinomycetes from soils in Samed Island, and geldanamycin from strain PC4 - 3. *Thai J. Pharm. Sci.* **30** : 49-56.
- Ando S., Ishia H., Kosugi Y. and Ishikawa K. (2002).** Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Appl. Environ. Microbiolo.* **68(1)** : 430-433.
- Arja E. M. O. (2004).** *Trichoderma reesei* strains for production of cellulase for textile industry .*VTT Publications.* **550**: 35- 96.
- Arnaud A. and Guiraud J. P. (1999).** Le genie microbiologique. In : Scriban R. Biotechnologie. 5^{ème}Ed. Edition: Lavoisier, Pari, pp. 46-342.
- Athalye M., Lacey J. and Goodfellow M. (1981).** Selective isolation and enumeration of Actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.* **51**: 289-297.

- Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. and White R. P. (1985).** Numerical Classification of *Actinomadura* and *Nocardioopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35 (1)** : 86-98.
- Audigie C. L., Dupont G. and Zonszain F. (1995).** Principe des méthodes biochimiques. Ed. Doin, Paris, pp 44-207.

B

- Badji B. (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat de l'université Mouloud MAMMARI de Tizi Ouzou. 226p.
- Bailey M. J., Biely P. and Poutanen K. (1992).** Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* **23**: 257–270.
- Ballerini D. and Alazard-Toux N. (2006).** Les biocarburants : état des lieux, perspectives et enjeux du développement. Edts . Technip, Paris, 264p.
- Baumgartner J. G. (1949).** Canned foods : an introduction to their microbiology, Ed 278.J and A. Churchill LTD London.
- Becker B., Lechevalier M. P., Gordon R. E. and Lechevalier H. A. (1964).** Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* **12**: 421-423.
- Becker B., Lechevalier M. P. and Lechevalier H. A. (1965).** Chemical composition of cell wall preparations from strain of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **13**: 236- 242.
- Begum M. F and Absar N. (2009).** Purification and characterization of intracellular Cellulase from *Aspergillus oryzae* ITCC-4857.01. *Microbiol.* **37(2)**: 121-127.
- Beldman G., Searle-Van Leewen M. F., Rombouts F. M. and Voorzangen F. G. J. (1985).** The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterisation and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. *Eur. J. Biochem.* **146** : 301-308.
- Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeno-Tarraga A. M., Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Harris D. E., Quail M. A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C. H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M. A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B.G., Parkhill J. and Hopwood D. A. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* **417**:141-147.
- Berdy J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot. (Tokyo).* **58**:1-26.
- Bergey's Manuel. (2007).** Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall. B.J. *In*: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae. Coyright, Michigan State University

Board of Trustees.

- Bhathena Z. P., Vora C. and Kadam K. (2002).** Rapid bioremediation of phenolic effluent through use of actinomycetal consortium. *Pollu. Res.* **21 (3):** 265-275.
- Bisaria V. S. and Ghose S. N. (1981).** Biodegradation of cellulosic materials, substrates microorganisms, enzymes and production enzymes. *Microb. Technol.* **3:** 90-104.
- Birsan C., Johnson P., Joshi M., MacLeod A., McIntosh L., Monem V., Nitz M., Rose D. R., Tull D., Wakarchuck W. W., Wang Q., Warren R. A. J., White A. and Withers S. G. (1998).** Mechanisms of cellulases and xylanases. *Biochem. Soc. Trans.* **26:** 156-160.
- Boraston A., Bary M., Bru E., Creagh A.L., Gilkes N., Guarna M., Jervis E., Johanson P., Kormos J., McIntosh L., Me Lean B., Sandercock L., Tomme P., Haynes C., Warren A. and Kilburn D. (1998).** The structure and function of cellulose binding domains. In: Claeysens M., Nerinckse W., Piens K, editors, carbohydrases from *Trichoderma reesei* and other microorganisms: structure, biochemistry, genetics and applications. The royal Society of Chemistry. pp. 139-146.
- Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2007).** Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil. *J. Appl. Microbiol.* **103:** 228–236.
- Boughachiche F., Reghioia S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A. and Boulahrouf. A. (2005).** Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes a partir de la sebkha de Ain Mlila. *Sciences .Technol.* **23 :** 5-10.

C

- Candace H. H. and Weimer P. J. (1991).** Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Marcel Dekker (Ed), INC, New York, pp. 164- 522.
- Cavaco-Paulo A. (1998).** Processing textile fibers with enzymes. In : Erikson K.E., Cavaco- Paulo A., editors. Enzyme application in fiber processing. *ACS. Symp. Ser.* **687:**180-189.
- Cavala M. and Eberlin T. (1994).** Isolement des streptomycètes du sol. *L'opéron.* **4 :** 13-17.
- Chen P. J., Wei T. C., Chang Y. T. and Lin L. P. (2004).** Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Sinorhizobium fredii*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **45:** 111-118.
- Chun J., Youn H. D., Yim Y. I., Lee H., Kim. M. Y., Hah Y.C. and Kang S.O. (1997).** *Streptomyces seoulensis* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47 :** 492-498.
- Collins M. D. and Jones D. (1981).** Distribution of isoprenoid quinone structural type in bacteria and their taxonomic amplification. *Microbiol. Rev.* **45 :** 316-354.
- Conn V. M. (2005).** Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. 297p.
- Coral G., Arikan B., Unaldi M. N. and Guvenmes H. (2002).** Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type Strain. *Turk. J. Biol.* **26:** 209-213.

- Couch J. N. and Bland C. E. (1974).** Family IV. Atinoplanaceae. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., Buchaan R. E. and Gibbon N. E. (Eds). Williams and ilkins C. O. Baltimore, pp.706-723.
- Crawford D. L., Lynch J. M. and Ousley M. A. (1993).** Isolation and characterisation of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Envirnm. Microbiol.* **59(11)** : 3899- 3905.
- Cross T. (1981).** Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* **50** : 397- 423.

D

- Din N., Jilkes N., Tekant B., Miller R., Warren A. and Kilburn D. (1991).** Non hydrolytic disrubtion of cellulose fibers by the binding of a bacterial cellulase . *Bio.Technology.* **9**:1096-1099.
- Dixit V. S. and Pant A. (2000).** Comparative characterization of two serine endopeptidases from *Nocardioopsis sp.* NCIM 5124. *Biochim. Biophys. Acta.* **1523 (2-3)** : 261-268.
- Dommergues Y. and Mangenot F. (1970).** Ecologie microbienne du sol. Eds. Masson et Cie, Paris.

E

- El-Sersy N., Abd-Elnaby H., Abou-Elela G. M., IbrahimH. A. H. and El-Toukhy N. M. K. (2010).** Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *Afr. J. Biotechnol.* **9 (38)**: 6355-6364.
- Elwan S. H., Dab A. and Al-Gounaim Y. (1985).** Ecology of the Streptomyces flora in the desert soil of Kuwait. *Syst. Appl. Microbiol.* **6** : 99-104.
- Ensign J. C. (1978).** Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annus. Rev. Microbiol.* **32** : 185-219.
- Ensign J. C., Normand P., Burden J. P. and Yallop C. A. (1993).** Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* **144**: 657-660.

F

- Fukumori F., Kudo T. and HorikoshiK. (1985).** Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus sp.* NO 1139. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 3339-3345.

G

- Gallardo O., Diaz P. and Pustor F. L. (2004).** Cloning and characterization of xylanase A from the *Bacillus sp.* Bp-7: comparaison with alkaline PI-low molecular weight xylanase of family 11. *Current microbiology.* **48**: 276-279.
- Gao J., Weng H., Zhu D., Yuan M., Guan F. and Xi Y. (2008).** Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover . *Bioresource Technol.* **xxx**: xxx-xxx.

- Gautam S. P., Bundela P.S., Pandey A. K., Khan J., M. K. Awasthi M.K. and S. Sarsaiya S. (2010).** Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal SolidWaste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. *Int. J. Environ. Sci.* **1 (4)**: 656-665.
- Gazenko S. V., Reponen T. A., Grinshpun S. A. and Willeke K. (1998).** Analysis of airborne Actinomycetes spores with fluorogenic substrates. *Appl. Environm. Microbiol.* **64 (11)**: 4410-4415.
- Gebler J., Gilkers N. R., Claeysens M., Wilson D. B., Beguin P. and Wakarchuk W. W. (1992).** Stereoselective hydrolysis catalyzed by related bet-1,4-glucanases and beta-1,4- xylanases. *J. Biol.Chem.* **267**: 12559-12561.
- Ghose T. K. and Sahai V. (1997).** Production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM 9414 in fedbatch and continuous-flow culture with cell recycle. *Biotechnol. Bioeng.* **21(2)**: 283-96.
- Goodfellow M. (1971).** Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **69**: 33-90.
- Goodfellow M. and Williams S. T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**:189-216.
- Goodfellow M., Stalon L. J., Simpson K. E. and Minnikin D. E. (1990).** Numerical and checiatmical classification of *Actinplanes* and some related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **136**:19-36.
- Gordon R. E., Barnet D. A., Handarhan J.E. and Hor-Nay-Pan C. (1974).** *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and norcardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**: 54-63.
- Grajek W.(1987).** Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**:126-129.
- Gray K. A., Zhao L. and Emptage M. (2006).** Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10** : 141-146.
- Grigorevski de Lima A. L., Nascimento R. P., Bon E. P. S. and Coelho R. R. R. (2005).** *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme . Microbial Technol.* **37**: 272-277.
- Grund E. and Kroppenstedt R. M.(1990).** Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40** : 5-11.

H

- Harvey I. (1999).** sélection de tests discriminants pour l'identification rapide des actinomycètes thermophiles impliqués dans l'alvéolite allergique extrinsèque. Thèse de Doctorat. Université Laval (Canada). 127p.
- Hasper A. A., Dekkers E., Mil M. V., Van de Vondervoort P. j. I. and De Graaff L. H. (2002).** Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.* **68 (4)**: 1556-1560.
- Hayakawa M., Yoshida Y. and Iimura Y. (2004).** Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 973–981.
- Henrissat B. and Bairoch A. (1989).** Up dating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *J. Biochem.* **316** : 695-696.
- Howard R. L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L. and Howard S. (2003).** Lignocellulose

biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.* **2** (12): 602- 619.

Hu Y. T., ZhounP. J., Zhou Y.G., Liu Z. H. and Liu S. J. (2004). Saccharothrix xinjiangensis sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi lake, Xinjiang, China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1-9.

Huang X. P. and Monk C. (2004). Purification and characterization of cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. Nov., sp. nov. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 85–92

Hurst P. L., Nelson J., Sullivan P. A. and Shepherd M. G. (1977). Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Biochem. J. Gr. Br.* **165** : 33-41.

I

Imada C. (2004). Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek.* **87**: 59-63.

Ishaque M. and Kluepfel D. (1980). Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain. *Can. J. Microbiol.* **26**: 183-189.

Ishizawa S. and Arargi M. (1976). Composition of actinomycetes population in soil. In : Actinomycetes, theboundary minroorganisms. Arai T. (Eds) Toppan Co. Ltd, Tokyo, pp. 97-107.

J

Jaradat Z., Dawagreh A., Ababneh Q. and Saadoun I. (2008). Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* sp. (Strain J2). Jordan . *J. Biol. Sci.* **1(4)**: 141- 146.

John W. B., Michael E. H., Linghao Z., Michael F. C., and Mark R. N. (2005). Towards Understanding theAction of Cellulases: Molecular Dynamics Simulation of *T. reesei* Cellobiohydrolase I and Crystalline Cellulose. Department of Food Science.

Justin T. C and Christopher M. M. F. (2003). Visualization of an Endophytic *Streptomyces* Species in Wheat Seed . *Appl. Environ. Microbiol.* **69(7)**: 4260-4262.

K

Kawai S., Okoshi H., Ozaki K., ShikataS., Ara K. and Ito S. (1988). Neutrophilic *Bacillus* strain, KSM- 522 that produces an alkaline carboxymethyl cellulase. *Agri. Biol. Chem.* **52**: 1425-1431.

Khan M. D.M. H., Ali S., Fakhru'l-R. A. and Alam M. D. Z. (2007). Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. *J. Environ. Sci.* **42**: 381-386.

Kim B. K., Lee B. H ., LeeY. J., Jin I. H ., Chung C. H. and Lee J. W. (2009). Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A-53. *Enz .Microb. Technoly.* **44**: 411-416

Kinoshita N., Igarashi M., Ikeno S., Hori M. and Hamada M. (1999). Saccharothrix tangerinus sp.nov., the producer of the new antibiotic formamicin : taxonomie studies. *Actinomycetologica.* **13**: 20-31.

Kitouni M. (2005). Isolement de bactéries Actinomycetales productrices d'antibiotiques à partir

d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri. Constantine.176p.

Kolarova N. and Farkas V.(1981). Sensitivity of various yeasts to crude cellulolytic enzyme complexes from *Trichoderma reesei* .*Euro. J. Appl. Micrbiol. Biotechnol.* **13**:184-187.

Korish M. (2003). Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Dissertation for attaining the Degree of Doctor of Natural Sciences. Johannes Gutenberg-University Mainz(Egypt).131p.

Kotchoni S. O., Gachomo E. W., Omafuvbe B. O. and Shonukan O.O . (2006). Purification and Biochemical Characterization of Carboxymethyl Cellulase (CMCase) from a Catabolite Repression Insensitive Mutant of *Bacillus pumilus*. *Int. J. Agri. Biol.* **8 (2)**: 286-292.

L

Lacey J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 2*: 231- 251.

Lacey J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.* **4**: 113-121.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

Lai T. E., Pullammanappallil P. C., Clarke W. P.(2006). Quantification of cellulase activity using cellulose-azure. *Talanta.* **69** : 68–72.

Lamari L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou. 186p.

Larpent J. P. and Sanglier J.J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris, 418p.

Lawson S. L., Wakarchuk W. W. and Withers S. (1996). Effects of both shortening and lengthening the active site nucleophile of *Bacillus circulans* xylanase on catalytic activity. *Biochemistry.* **35**: 10110-10118.

Lechevalier M. P and Gerber N. (1970). The identity of madurose with 3-0-methyl-Dgalactose. *Carbohydr. Res.***13**: 451-454.

Lechevalier H. A. and Lechevalier M.P. (1970). A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: *The Actinomycetales*. P rauser H. (Eds).G.Fisher Verlag, Jena,pp. 393-405

Lechevalier M. P. and Lechevalier H. A. (1970a). Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. In: *The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds). G. Fisher Verlag, Jena, pp. 311-316.

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

Lechevalier M. P., De bievre C. and Lechevalier H. A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* **5**: 249-260.

- Lechevalier M. P. (1981).** Ecological associations involving actinomycetes. In : *Actinomycetes. Shaal and Pulverer. Zbl. Bakt. Suppl.* **11** : 159-166.
- Lechevalier M. P., Prauser H., Labeda D. P and Ruan J. S. (1986).** Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36** : 29-3737.
- Lee K. D., Kim J. and Kim H. (1999).** Purification and characterization of carboxymethyl-cellulase Produced by *Bacillus* sp. KD1014. *Agric. Chem. Biotechnol.* **42(2)**: 107-112.
- Lee Y. J., Kim B. K., Lee B. H, Jo K. I., Lee N. K., Chung C. H., Lee Y. C. and Lee J. W. (2008).** Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology.* **99**: 378-386.
- Lee K., Jeya M., Joo A. R., Singh R., Kim I.W. and LeeJ. K. (2010).** Purification and characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology.* **46**: 206–211
- Li X. H., Yang H. J., Roy B., Park E. Y., Jirang L. J., Wang D. and Miao Y. G. (2009).** Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. *Microbiol. Res.* **165**: 190-198.
- Liu J., Yuan X ., Zeng G ., Shi J. et Chen S. (2006).** Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry.* **41**: 2347-2351.
- Loria A. (1986).** The national institute of health quality control program. III. Fllox-up stidies (phase 3). *Rev . Invest. Clin.* **38** : 435-440.
- Lucas R., Robles A., Garcia T. M., Alvarez D. C. G.and Galrez A. (2001).** Production, purification and properties of an endoglucanase produced by the hyphomycete *chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *J. Agric. Food. chem.* **49**: 79-85.
- Lynd L R., Weimer P. J., Van Zyl W.H. and Pretorius I. S. (2002).** Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **66 (3)**: 506-577.

M

- Mackenzie C. R. and Bilous D. (1982).** Location and kinetic properties of the cellulase system of *Acetivibrio cellulolyticus*. *Can .J. Microbiol.* **28**: 1158-1164.
- Marchal N., Bourdon J. L. and Richard C. I. (1987).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin editor. Paris, pp. 67-122.
- Maurer K. (1997).** Developpement of new cellulases. In : EeJE, Misset O., Baas E.J., editors . Enzymes in tetergency . *Surfactant science series.* **69** :175-202.
- Mazodier J. (1974).** Société industrielles et déchets solides. *Science et vie.* **106** : 109-115.
- Mc Carthy A. J. and Williams S. T. (1992).** Actinomycetes as agents of biodegradation. *Environm. review.* **115 (1-2)**: 189-192.

- Mc Carthy A. J. (1987).** Lignocellulose degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol.* **46:** 145-163.
- Mc Cleary B. V. and Glennie-Holmes M. (1985).** Enzymatic quantification of (1-3) (1-4) - β -D-glucan in barley and malt. *J. Inst. Brew.* **91:** 285-295.
- Miller G. L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **5:**193-219.
- Minnikin D. E., Patel P. V., Alshamaony L. and Goodfellow M. (1977).** Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27:**104-117.
- Mordarska H., Mordarska M. and Goodfellow M. (1972).** Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **71:** 77-86.
- Murugan M., Srinivasan M., Sivakumar K., Sahu M.K., and Kannan L. (2007).** characterization of an actinomycetes isolated from the estuarine finfish, *Mugil cephalus* Lin. (1758) and its optimization for cellulase production. *J. Sci. Ind. Res.* **66:** 388-393.

N

- Naika G. S., Kaul P. and Prakash V. (2007).** Purification and characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. *J. Agric. Food. Chem.* **55:**7566–72.
- Narasimha G., sridevi A., Buddolla V., Subhosh C. M. and Rajsekhar R. B. (2006).** Nutrient effect on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *Afr. J. Biotechnol.* **5 (5):** 472-476.
- Niranjane A. P., Malhou P. and Stevenson T.W. (2007).** The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. *Enzyme and Micobial Technology.* **40:**1464-1468.

O

- Odier E. and Rouau X. (1985).** Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine . Edition Gauthier-Villard, Paris. pp.199-214.
- O'donnell A. G., Minnikin D. E., Goodfellow M. and Parlett J. H. (1982).**The analysis of actinomycetes wall aminoacids by gas chromatography. *FEMS. Microbiol. Lett.* **15:** 75-78.
- Ojumu T. V., Solomon B. O., Betiku E., Layokun S. K and Amigun B. (2003).** Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. *Afr. J Biotechnol.* **2(6):**150-152.
- Ooshima H., Burns D. S. and Converse A. O. (1990).** Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignaceous residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. *Biotechnol. Bioeng.* **36:** 446-452.
- Oskay M., Tamer A. and Azeri C. (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J. Biotechnol.* **3 (9):** 441-446.

Ouhdouch Y., Barakate M. and Finanse C. (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.* **37**: 69-74.

P

Park J.O., El-Tarabily K. A., Ghisalberti E. L. and Sivasithamparam K. (2002). Pathogenesis of *Streptovercillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology.* **35** :361-365.

Peaczinska-czoch W. and Mordarski H. (1988). Actinomycetes enzymes. In: "Actinomycetes in biotechnology". Goodfellow M., Williams S.T., and Mordarski M. (Eds), London: Academic Press, pp. 219-283.

Peltola J. S.P., Anderson M. A., Kampfer P., Auling G., Kropensstedt R. M., Busse H. J., Salkinoja-Salonen M. S. and Rainey F. A. (2001). Isolation of toxigenic *Nocardioopsis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardioopsis* species, *N. exhalans* sp.nov. and *N. umidischholae* sp. nov. *Appl. Env. Microbiol.* **67**: 4293-4304.

Pridham T. G. and Gottlieb D. J. (1948). The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56**:107-114.

Pridham T. G., Hesseltine C. W. and Benedict R. G. (1958). A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups: placement of strains in morphological selection. *Appl. Microbiol.* **6**:5-79.

R

Ratanakhanokchai K., Kyu K. L. and Tanticharoen M. (1999). Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 694-697.

Ray A. K., Bairagi. A., Ghosh K. S. and Sen. S. K. (2007). Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyologica et Piscatoria.* **37(1)**: 47-53.

Raza M. A. and Ue-Rehmane S. (2008). Production and characterization of endo- β (1-4) glucanase from thermophilic fungus. *Afr. J. Biotechnol.* **8 (14)**: 3297-3302.

Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P. and Henrissat B. (2002). Dimension, shape, and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *J. Biological. Chemistry.* **277 (43)**: 40887-40892.

Reponen T. A., Gazonko S.V., Grinshpun S. A., Willeke K. and Cole E. C. (1998). Characteristics of airborne actinomycetes spores. *Appl. Environm. Microbiol.* **64** : 3807-3812.

Riccio P., Rossano R., Vinella M., Domizio P., Zito F., Sansevrino F., D'elis A. and Rosi I.(1999). Extraction and immobilisation in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hanseni*. *Enzyme and Microbiol Technology.* **24**:123-129.

Rivière J. (1975). Les applications industrielles de la microbiologie. Collection sciences agronomiques. Edition, Masson et Cie, pp.31-195.

Romero M. D., Aguado J., Gonzalez L. and Ladero M. (1999). Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*. **25**: 244-250.

Royer C. J. and Nakas J. P. (1990). Simple, sensitive zymogram technique for detection of xylanase activity in polyacrylamide gels. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1516-1517.

S

Saadoun L. and Al moumani F. (1997). *Streptomyces* from Jordan soils active against *Agrobacterium tumefaciens*. *Actino.* **8 (1)**: 29-36.

Saadoun I. and Gharaibeh R. (2003). The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *J. Arid. Environ.* **53** : 365 - 371.

Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Moustefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. and Germain P. (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. **9**: 147-153.

Saha B. C. (2004). Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process. Biochem.* **39**: 1871–6.

Schrempf H. and Walter S. (1995). The cellulolytic system of *Streptomyces retyculi*. *Int. J. Macromolecules*. **15**: 353-355.

Scriban R. (1993). Biotechnologie. 4^{ème} édition. Technique de documentation. Edition, Lavoisier. pp. 32-690.

Scriban R. (1999). Biotechnologie. 5^{ème} édition. Technique et documentation. Edition, Lavoisier, pp.149-157.

Shikata S., Saeki K., Okoshi H., Yoshimatsu T., Ozaki K., Kawai S. and Ito S. (1990). Alkaline cellulase for laundry detergents : production by alkalophilic strains of *Bacillus* and some properties of crude enzymes. *Agri. Biol. Chem.* **52**: 91-96.

Shirling E. B. and Gottlieb D. (1966). Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16 (3)**: 313-340.

Sierra G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van. Leeuwenhoek*. **23**: 15-22

Sinnott M. L. (1990). Catalytic mechanism of enzymatic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**:1171-1202.

Sivakumar K., Kumar S. M., Thangaradjou T. and Kannan L. (2007). Research on marine actinobacteria in India. *Indian J. Microbiol.* **47**: 186–196.

Solingen V. P., Meijer D., Kleij W. A., Branett C., Bolle R., Power S. D. and Jones B. E. (2001).

Cloning and expression of an endocellulase gene from a novel streptomycet isolated from an East African soda lake Extremophiles . **5**: 333-341.

Somogyi M. (1951). Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**:19-23.

Stackebrandt E., and Kroppenstedt R. M. (1987). Union of the genera *Actinoplanes* Couch, *Ampullariella* Couch and *Amorphosporangium* Couch in a redefined genus *Actinoplanes*, *Syst. Appl. Microbiol.* **9**: 110-114.

Sumner J. B. (1921). Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *J. Biol. Chem.* **47**: 5-9.

T

Tanaka Y. and Omura S. (1990). Metabolism and products of Actinomycetes- an introduction. *Actinomycetologica*, **4 (1)**: 13-14.

Thakur D., Yadav A., Gogoi B. K. and Bora T. C. (2007). Isolation and screening of Streptomyces in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Mycolo. Med.* **17**: 242-249.

Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, V 612p, pp 425.

Tracy J. M., Jensen P. R., Kauffman C. A. and Fenical W. (2002). Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Appl. Env. Microbiol.* **68 (10)**: 5005-5011.

Tresner H. D., Davies M. C. and Backus E. J. (1961). Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J. Bacteriol.* **81**: 70-80.

Tuncer M., Balli A. S., Rob A. and Wilson M. T. (1999). Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme and Microbiol Technology.* **25** : 38-47.

V

Valois D., Fayad K., Barasubiye T., Garon M., Déry C., Brzezinski R. and Beaulieu C. (1996). Glucanolytic Actinomycetes Antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the Causal Agent of Raspberry Root Rot. *Appl. Env. Microbiol.* **62 (5)**:1630–1635.

Vandamme E. J. (1985). Biotechnology of industrial antibiotics. Drug and pharmaceutical sciences. Vol. 22. New-York. Marcel .Dekker. 808p.

Vogel S., Steele H. L. and Streit W. R. (2006). Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *J. Biotechnol.* **126**: 26-36.

Vonothini G., Murugan M., Sivakumar K. and Sudha S. (2008). Optimization of protease production by an actinomycete Strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *African Journal of Biotechnology.* **7 (18)**:3225-3230.

Vyas A., Vyas D. and Vyas K. M. (2005). Production and optimization of cellulases on pretreated groundnut shell by *Aspergillus terreus* AV49. *J. Sci. Ind. Res.* **64**: 281-286.

W

Waksman S. A. and Henrici A. T. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J. Bacteriol.* **46**: 337-341.

Wang C., Hsieh Y. R., Ng C. C., Chan H., Lin H. Tzeng T. W. and Shyu Y. T. (2009). Purification and characterization of novel halostable cellulose from *Salinivibrio sp.* strain NTU-05. *Enzyme and Microbial Technology.* **44**: 373-379.

Weyland H. (1981). Distribution of actinomycetes on the sea floor. In: Actinomycetes. Eds : K. Schaal, G. Pulverer. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. *Zbl. Bakt. Suppl.* **11**: 185-193.

Williams S.T. and Cross T. (1971). Actinomycetes . In: Methods in microbiology. Booth C. Ed., Academic Press, London. **4**: 295-334.

Williams S.T. (1978). Streptomycetes in the soil ecosystem. In: *Nocardia and Streptomyces*. Mordarski M., Kurylowicz W. and Jeljaszewicz J. (Eds.), Fisher Verlag G., Stuttgart, pp.137- 144.

Williams S.T., Lanning S and Wellington E.M.H. (1984). Ecology of *Actinomycetales*, In: "The Biology of Actinomycetes" Goodfellow M., Moradasski M. and Williams S.T.(Eds.), Academic Press. London. p. 481- 528.

Williams S. T., Goodfellow M., and Alderson. G. (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.), Volume 4. Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 2452-2492.

Wilson D. B. (2009). Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* 20 ,1-5. Voet D et G. Voet G. J. 1998. *Biochimie* , 2^{me} Ed . De Boek. Université S. A. Paris, pp.74 - 95.

Withers S. G. (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolyses. *Carbohydr. Polym.* **44** : 325-337.

Workman E. W and Day D. F. (1982). Purification and Properties of β -Glucosidase from *Aspergillus terreus*. *Appl Environ Microbiol.* 1289-1295.

Y

Yamagushi T. (1965). Comparaison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J. Bacteriol.* **89**: 444-453.

Yin L. J., Lin H. H. and Xiao Z. R. (2010). Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *Journal of Marine Science and Technology.* **18** (3): 466-471.

Yang Y. K., Lee J. S., Park H. N., Moon M.N., Kim H. S., Kim J. S., Lim C. Y. and Rhee Y. (1996). Purification of carboxymethyl cellulase from hybrid between *Aspergillus niger* and *Penicillium verruculosum*. *J. Microbiol.* **34** (1): 90-94.

Z

Zhou J., Wang Y. H., Chu J., Luo L. Z., Zhuang Y. P. and Zhang S. L. (2009). Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam- exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bioresource. Technology.* **100:** 819-825.

Zerizer H., Oulmi L., Boughachiche F., Rrghioua S., Boudemagh A., Kitouni M and Boulahrouf A. (2006). Identification d'une Actinomycetale, production d'antibactériens, isolée de sols arides de region de Biskra. *Sciences et technologie C-24* : 17-22.

Zitouni A. (2005). Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives secrétées par *Saccharothrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat. Université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou. 231p.

MILIEUX DE CULTURE D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES ACTINOMYCETES

I. Milieu de revivification

1. Milieu WILLIAMS (Williams et Kuster, 1964) (composition du milieu Williams modifié)

Amidon : 10g; caséine : 0,3g; KNO₃ : 2g; NaCl : 2g; K₂HPO₄ : 2g; MgSO₄, 7H₂O : 0,05g ; CaCO₃ : 0,02g ; FeSO₄, 7H₂O : 0,01g ; agar : 15g ; glucose : 1g ; Eau distillée : 1000 ml. pH 7,2.

II. MILIEUX D'IDENTIFICATION

1. Etude morphologique

Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'« International *Streptomyces* Project » (Shirling et Gottlieb, 1966).

1.1. Milieu ISP1

Tryptone : 5g ; extrait de levure : 3g ; agar : 15g ; eau distillée q.s.p : 1000 ml. pH = 7,2.

1.2. Milieu ISP2

Glucose: 4 g ; extrait de levure: 4 g ; extrait de malt: 10 g ; au distillée q.s.p. 1000 ml ; agar: 20 g. pH 7,2.

1.3. Milieu ISP3

Farine d'avoine : 20 g ; solution saline standard : 1 mL ; agar: 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

* Solution saline standard: FeSO₄, 7H₂O: 0,1 g ; MnCl₂, 4H₂O: 0,1 g ; ZnSO₄, 7H₂O: 0,1 g ; eau distillée q.s.p. 100 ml.

1.4. Milieu ISP4

Amidon: 10 g ; K₂HPO₄: 1 g ; MgSO₄, 7H₂O: 1 g ; NaCl: 1 g ; (NH₄)₂SO₄: 2 g ; CaCO₃: 2 g ;

Solution saline standard (voir ISP3) : 1 ml ; agar : 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

1.5. Milieu Glucose-Yeast Extract-Agar (G.Y.E.A) (Athalye et al., 1981)

Extrait de levure : 10g; glucose : 10g; agar : 18g; eau distillée q.s.p : 1000 ml. pH = 6,8.

2. Etude physiologique

2. 2.1. Dégradation des glucides et dérivés

- Milieu ISP9 (Milieu de base)

(NH₄)₂SO₄ : 2,64g ; KH₂PO₄ : 2,38g ; K₂HPO₄ : 5,65g ; MgSO₄, 7H₂O : 1g ; Solution saline* : 1 ml ; eau distillée : 1000 ml ; agar : 20g ; pH : 6,8-7.

Solution saline: CuSO₄, 5H₂O: 0,64g ; FeSO₄, 7H₂O: 0,11 g ; MnCl₂, 4H₂O: 0,79 g ; ZnSO₄, 7H₂O: 0.15 g ; eau distillée : 1000 ml.

2. 2.2. Dégradation du tween 80 (Sierra, 1957)

Tween 80 : 10 ml ; NaNO₃ : 1 g ; extrait de levure : 5 g ; solution saline: 50 ml ; CaCl₂, 2H₂O: 0,1 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml ; agar : 18 g. pH 7,2.

* solution saline: K₂HPO₄: 0,25 g ; MgSO₄, 7H₂O: 0,125 g ; NaCl: 0,125 g ; FeSO₄, 7H₂O: 0,001 g ; MnSO₄ : 0,001 g ; eau distillée q.s.p. 50 ml.

2. 2.3. Dégradation de la tyrosine, (Goodfellow, 1971 ; Gordon *et al.*, 1974)

0,4 g de tyrosine est suspendu dans 10 ml d'eau distillée et stérilisé. La suspension est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive stérile pH 7,5 et maintenue en surfusion à 50°C.

2. 2.4. Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1987)

10 g d'amidon dans 100 ml de gélose nutritive. Une solution de lugol permet de mettre en évidence la dégradation.

2. 2.5. Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1987)

4 g de gélatine dans 100 ml de gélose nutritive.

2. 2.6. Dégradation de la caséine du lait (Gordon *et al.*, 1974)

10 g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau distillée (pH 7,5), puis stérilisés à l'autoclave. 100 ml d'eau distillée (pH 7,5) contenant 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Pétri stériles.

2. 2.8. Dégradation des sels de sodium (Gordon *et al.*, 1974)

Sel de sodium (acétate, citrate, oxalate): 2 g, NaCl: 2 g ; MgSO₄, 7H₂O: 0,2 g ; (NH₄)₂HPO₄: 1 g ; KH₂PO₄ : 0,5g ; agar: 15 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml ; solution aqueuse de rouge de phénol à 0,04% : 20 ml, pH 6,8.

2.9. Production de pigments mélanoides.

Milieu ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1966)

Glycérol: 15 g ; L-tyrosine: 0,5 g ; L-asparagine: 1 g ; K₂HPO₄: 0,5 g ; MgSO₄,7H₂O: 0,5 g ; NaCl: 0,5 g ; FeSO₄, 7H₂O: 0,01 g ; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL ; agar: 18 g ; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

ANNEXE III

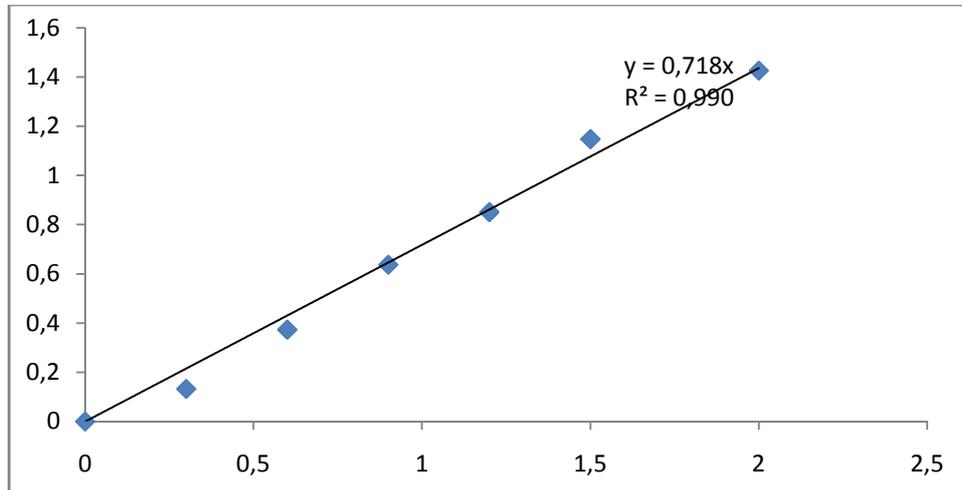


Figure 33 : Courbe d'étalonnage de glucose à 575 nm.

Résumé

Quatre vingt souches, isolées à partir de 6 échantillons de sols, ont fait l'objet d'un criblage de souches productrices de cellulases. De ce fait, Deux souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ sélectionnées montrant des activités enzymatiques les plus élevées ont été utilisées pour produire des cellulases. Les résultats des tests d'identification basés sur les caractères morphologiques, chimiotaxonomique et physiologiques indiquent que les souches semblent appartenir aux *Streptomyces*.

L'optimisation de production de cellulases par les deux souches a été étudiée en testant la composition de milieu de culture, les différentes sources de carbone et d'azotes, du pH, de la température et du temps d'incubation.

L'effet de la température et du pH indique que les cellulases des souches P₄D₁₀ et P₃D₂₈ se caractérisent par des optima d'activité à 50 et 60°C ainsi aux pH 7 et 10 respectivement, L'étude de la thermostabilité en absence de substrat révèle qu'elles sont thermostables et possèdent, les temps de demi-vie à 50° C sont de 4h pour la souche P₄D₁₀ et plus de 6 h à 60 °C pour la souche P₃D₂₈. Propriétés qui sont requises pour des applications biotechnologiques. Une importante inhibition est observée en présence de l'EDTA et l'urée, alors que, les ions Mn²⁺ et Co²⁺ stimulent l'activité cellulase des souches P₃D₂₈ et P₄D₁₀ respectivement.

L'analyse du zymogramme et SDS-page ont révélé l'existence d'une seule bande pour la souche P₃D₂₈ et deux bandes pour la souche P₄D₁₀ ayant des masses moléculaires de 166.5 KDa, 150 KDa et 79 KDa respectivement.

Mots clés : Actinomycètes, *Streptomyces*, production, Caractérisation, CMCase, Cellulose

Summary

Eighty strains, isolated from six samples of soil, have been screened for cellulase producing strains. Thus, two strains selected P₃D₂₈ and P₄D₁₀ showing the highest CMCase activities were used to produce CMCase. Test results of identification and based on morphological, physiological and chemotaxonomic characters indicate that these strains appear to belong to *Streptomyces*.

Optimization of production of CMCase by both strains was investigated by testing the composition of culture medium, the different sources of carbon and nitrogen, pH, temperature and incubation time.

The effect of temperature and pH indicate that the CMCase P₃D₂₈ and P₄D₁₀ strains are characterized by optimum activity at 50 and 60 ° C and at pH 7 and 10 respectively, properties that are required for biotechnological applications. The study of thermostability in the absence of substrate shows that they are thermostable and have times half-life at 50°C for 4 hours for the strain P₄D₁₀, and more than 6 h at 60°C for the strain P₃D₂₈. A significant inhibition is observed in the presence of EDTA and urea. While Mn²⁺ ions and Co²⁺ stimulate the activity of CMCase P₃D₂₈ and P₄D₁₀ strains respectively.

Analysis of zymogram and SDS-PAGE revealed the existence of a single CMCase for P₃D₂₈ strain and two isoenzymes for P₄D₁₀ strain having molecular weights of 166.5 kDa, 150 kDa and 79 kDa respectively.

Key words: Actinomycetes, *Streptomyces*, production, characterization, CMCase, Cellulose

ملخص

لقد تم فحص ثمانين سلالة تابعة لصنف الاكتينوميستات معزولة من 6 عينات تربة حيث اختيرت منها اثنتان P₃D₂₈ و P₄D₁₀ ذات نشاط عالي لانتاج انزيم سليولوز. نتائج الاختبار لتحديد الهوية على أساس المميزات المورفولوجية والفسولوجية والكيميائية تبين أن هاتين السلالتين تحملان صفات صنف *streptomyces*.
تم دراسة تحسين انتاج انزيم السيلولاز من قبل كل من السلالتين من خلال اختبار مكونات الوسط، ومصادر مختلفة من الكربون والنيتروجين، ودرجة الحموضة ودرجة الحرارة و مدة الحضارة.
تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة يدل على أن انزيمات السليلاز السلالتين P₃D₂₈ و P₄D₁₀ تتميز بنشاط امثل في درجة مئوية 60 و 50 ودرجة الحموضة في 10 و 7 على التوالي، ودراسة الاستقرار الحراري في غياب الركيزة تبين ان الازمنة النصف الحياتية هي 4 ساعات عند درجة الحرارة 50 درجة مئوية للسلالة P₄D₁₀ وأكثر من 6 ساعات عند درجة حرارة 60 درجة مئوية للسلالة P₃D₂₈. مطلوبة من أجل وقد لوحظ تثبيط كبير لعمل هذه الانزيمات في وجود EDTA واليوربا، في حين أن الشوارد Mn²⁺ و Co²⁺ تحفز نشاطها للسلالتين P₃D₂₈ و P₄D₁₀ على التوالي.
كشفت نتائج تحليل SDS-PAGE و zymogram وجود شريطة واحدة ذات الوزن الجزيئي 166.5 للسلالة P₃D₂₈ وشريطين ذات الوزن الجزيئي للسلالة P₄D₁₀.
كلمات المفتاح

الاكتينوميستات, *Streptomyces*, انتاج, تصنيف, السيلولاز, السيلولوز