

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة أمحمد بوقرة بومرداس  
Université M'HAMED BOUGARA Boumerdes

Faculté des sciences  
Département de biologie  
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Biotechnologie  
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

**Mémoire de fin d'étude**  
Présenté en vue de l'obtention du diplôme de master  
**-Thème-**

**Criblage de souches d'actinobactéries productrices  
d'enzymes lignocellulolytiques.**

Présenté par : **LAGHMARA Razika**

Soutenu le 20/09/2023

Devant le jury composé de :

|                    |     |              |
|--------------------|-----|--------------|
| Mme ZIDI Kahina    | MCB | Présidente   |
| Mme FODIA Soumaya  | MAA | Examinatrice |
| Mme HAMOUDI Houria | MCB | Promotrice   |

Année universitaire : 2022/2023

# *Remerciements*

En préambule à ce mémoire, je tiens tout d'abord à remercier **Dieu** de m'avoir donné le désir d'avancer, la force de continuer, le courage de surmonter tout obstacle, et la patience d'accomplir ce modeste travail.

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire :

En premier lieu, je remercie Mme. **HAMOUDI Houria**, professeure à l'université de M'HAMED BOUGARA Boumerdes. En tant que promotrice de mémoire, pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour sa disponibilité, et pour ses conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au niveau du laboratoire de biotechnologie microbienne du département de biologie de la faculté des sciences de l'université M'HAMED BOUGARA Boumerdes, sur cette base je tiens à remercier toute l'équipe de laboratoire, pour les précieux conseils pour la réalisation de la partie pratique de ce travail.

Je remercie les jurys pour avoir accepté d'examiner ce travail :

Mme FOUZIA Soumaya maitre de conférences de l'université de Boumerdes, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mme ZIDI Kahina maitre de conférences de l'université de Boumerdes, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury

Mes remerciements s'adressent aussi au chef de département de Biotechnologie microbienne Mr. **MESOUDANNE Djamel**, maitre de conférences à l'université de M'HAMED BOUGARA Boumerdes.

Mes remerciements vont également à tous mes professeurs et à tout le groupe pédagogique pour la formation enrichissante et pleine d'intérêt.



---

## *Dédicace*

---

***Et parce que ma famille est  
toujours à mes côtés, ma réussite  
leur est un cadeau,***

À celle qui est restée éveillée de longues nuits pour mon  
confort, et à celle qui s'est réveillée à l'aube pour prier  
pour moi... ma mère.

À qui était ma force quand la faiblesse dans les moments  
de fatigue s'est glissée dans mon cœur, mon premier  
soutien... mon père.

À celles qui ont cru en mes capacités et m'ont poussée  
vers l'échelle du succès... mes chères sœurs.

À ceux qui ont allumé des bougies d'espoir dans les  
moments sombres de ma carrière... mes chères frères.

**Merci pour votre soutien**

*Razika*



# TABLE DES MATIÈRES

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| Liste des abréviations..... | I   |
| Liste des figures.....      | II  |
| Liste des tableaux.....     | III |
| Introduction .....          | 1   |

## Partie I : Synthèse bibliographique.

### Chapitre I : Les actinobactéries.

|                                                          |   |
|----------------------------------------------------------|---|
| 1. Généralités et principales caractéristiques.....      | 3 |
| 2. Cycle de vie .....                                    | 4 |
| 3. Taxonomie des actinobactéries.....                    | 5 |
| 3.1. Critères actuels d'identification.....              | 5 |
| 3.1.1. Critères morphologiques.....                      | 5 |
| 3.1.2. Critères chimiotaxonomiques .....                 | 5 |
| 3.1.3. Critères physiologiques .....                     | 7 |
| 3.1.4. Critères génétiques .....                         | 7 |
| 4. Importance biotechnologique des actinobactéries ..... | 7 |

### Chapitre II : La biomasse lignocellulosique et les enzymes lignocellulolytiques.

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1. La biomasse lignocellulosique .....                              | 9  |
| 1.2. Structure et composition de la biomasse lignocellulosique..... | 9  |
| 1.2.1. La cellulose.....                                            | 10 |
| 1.2.2. L'hémicellulose .....                                        | 10 |
| 1.2.3. La lignine.....                                              | 11 |
| 2. Les enzymes lignocellulolytiques.....                            | 12 |
| 2.1. Enzymes dégradant la lignine.....                              | 12 |
| 2.1.1. La lignine peroxydase.....                                   | 12 |
| 2.1.2. La laccase .....                                             | 12 |
| 2.2. Enzymes dégradant les polysaccharides.....                     | 12 |
| 2.2.1. Les cellulases.....                                          | 12 |

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| 2.2.2. Les hémicellulases .....                       | 13 |
| 2.2.2.1. Les xylanases .....                          | 13 |
| 2.2.2.1.1. Distribution et rôles physiologiques ..... | 13 |
| 2.2.2.1.2. Propriétés des xylanases .....             | 14 |
| 2.2.2.1.3. Applications des xylanases .....           | 15 |

## **Partie II : Partie expérimentale.**

### **Matériel et méthodes.**

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Matériel .....                                                                                           | 16 |
| 1.1. Matériel analytique .....                                                                              | 16 |
| 1.2. Matériel biologique .....                                                                              | 16 |
| 2. Méthodes .....                                                                                           | 16 |
| 2.1. Revivification des souches d'actinobactéries .....                                                     | 16 |
| 2.2. Criblage de souches d'actinobactéries productrices d'enzymes lignocellulolytiques .....                | 16 |
| 2.2.1. Criblage qualitatif sur milieu solide .....                                                          | 16 |
| 2.2.1.1. Souches productrices des activités hydrolases .....                                                | 16 |
| 2.2.1.2. Souches productrices des activités oxydoréductases.....                                            | 17 |
| 2.2.2. Criblage quantitatif sur milieu liquide.....                                                         | 17 |
| 2.2.2.1. Activité hydrolase.....                                                                            | 17 |
| 2.2.2.2. Activité oxydoréductase .....                                                                      | 20 |
| 2.3. Identification de la souche sélectionnée Z59.....                                                      | 21 |
| 2.3.1. Etude morphologique de la souche sélectionnée Z59 .....                                              | 21 |
| 2.3.1.1. Caractères macromorphologiques .....                                                               | 21 |
| 2.3.1.2. Caractères micromorphologiques .....                                                               | 21 |
| 2.3.2. Etude physiologique et biochimique de la souche sélectionnée Z59 .....                               | 22 |
| 2.4. Production d'enzymes lignocellulosiques par la souche sélectionnée Z59 en fermentation submergée ..... | 23 |
| 2.5. Caractérisation de xylanases produites par la souche sélectionnée Z59 dans le surnageant brut .....    | 23 |
| 2.5.1. Détermination du pH optimum et de la stabilité .....                                                 | 23 |
| 2.5.2. Détermination de la température optimale et de la thermostabilité.....                               | 23 |

### **Résultats et discussion.**

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Criblage de souches d'actinobactéries productrices d'enzymes lignocellulolytiques ..... | 24 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Criblage qualitatif « sur milieu solide » .....                                                         | 24 |
| 1.2. Criblage quantitatif « sur milieu liquide ».....                                                        | 27 |
| 2. Identification de la souche sélectionnée Z59.....                                                         | 28 |
| 2.1. Etude morphologique de la souche sélectionnée Z59 .....                                                 | 28 |
| 2.1.1. Caractères macromorphologiques .....                                                                  | 28 |
| 2.1.2. Caractères micromorphologiques .....                                                                  | 28 |
| 2.2. Etude physiologique et biochimique de la souche sélectionnée Z59 .....                                  | 29 |
| 3. Production d'enzymes lignocellulosiques par la souche sélectionnée Z59 en<br>fermentation submergée ..... | 33 |
| 3.1. Caractérisation de xylanase produites par la souche sélectionnée Z59 dans le<br>surnageant brut .....   | 35 |
| 3.1.1. Détermination du pH optimum et de la stabilité .....                                                  | 35 |
| 3.1.2. Détermination de la température optimale et de la thermostabilité.....                                | 36 |
| <b>Conclusion</b> .....                                                                                      | 38 |
| <b>Références bibliographique</b> .....                                                                      | 39 |
| <b>Annexes</b>                                                                                               |    |

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**2,4-DCP** : 2,4-Dichlorophénol.

**ABTS** : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**C** : Chloramphenicol.

**CAZ** : Ceftazidime.

**CIP** : Ciprofloxacine.

**CMC** : Carboxyl méthyl cellulose.

**DAP** : Acide diaminopimélique.

**DDH** : DNA-DNA Hybridation.

**DNS** : Acide dinitrosalicylique.

**FC** : Aide fusidique.

**G + C** : Guanine + Cytosine.

**G** : Grossissement.

**GH** : Glycoside hydrolase.

**GYEA** : Glucose Yeast Extract-Agar.

**ISP** : International *Streptomyces* Project.

**K** : Kanamycine.

**kDa** : Kilodalton.

**LiP** : Lignine peroxydase.

**MA** : Mycélium aérien.

**Mb** : Mégabase.

**MS** : Mycélium du substrat.

**nm** : nanomètre.

**NV** : Novobiocine.

**OF** : Ofloxacine.

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PI** : Point isoélectrique.

**PM** : Poids moléculaire.

**rpm** : revolution per minute

**UI** : Unité internationale.

**ε** : Coefficient d'extinction molaire.

**μL** : Microlitre.

## LISTE DES FIGURES

|                                                                                                                                                                                                                                                       |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figure 1 :</b> Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulant. ....                                                                                                                                                        | 4          |
| <b>Figure 2 :</b> Applications potentielle des actinobactéries dans l’agriculture et les industries.....                                                                                                                                              | 8          |
| <b>Figure 3 :</b> Illustration schématique montrant une culture bioénergétique.....                                                                                                                                                                   | 9          |
| <b>Figure 4 :</b> Structure moléculaire de la cellulose .....                                                                                                                                                                                         | 10         |
| <b>Figure 5 :</b> Structure de l’hémicellulose .....                                                                                                                                                                                                  | 11         |
| <b>Figure 6 :</b> Motifs élémentaires de la lignine .....                                                                                                                                                                                             | 11         |
| <b>Figure 7 :</b> Mécanismes d’action de la cellulase.....                                                                                                                                                                                            | 13         |
| <b>Figure 8 :</b> Schéma récapitulatif montrant les étapes de réalisation du criblage qualitatif pour les souches S24 et A15.....                                                                                                                     | 18         |
| <b>Figure 9 :</b> La réduction de DNS (Acide 3,5-dinitrosalicylique) dans un milieu alcalin à 100°C .....                                                                                                                                             | 19         |
| <b>Figure 10 :</b> Observation microscopique de la souche Z59 après 14 jours d’incubation à 30°C (G×40 et ×100).....                                                                                                                                  | 29         |
| <b>Figure 11 :</b> Production des activités lignocellulolytiques de la souche sélectionnée Z59 par fermentation submergée sur quatre substrats lignocellulosiques, a : Son de blé ; b : Paille de blé ; c : Coque d’arachide ; d : Marc de café ..... | 34         |
| <b>Figure 12 :</b> Effet de la variation du pH sur l’activité de xylanase .....                                                                                                                                                                       | 35         |
| <b>Figure 13 :</b> L’activité relative de la xylanase produite par la souche Z59 en fonction du temps à différents pH.....                                                                                                                            | 36         |
| <b>Figure 14 :</b> Effet de la température sur l’activité des xylanase.....                                                                                                                                                                           | 37         |
| <b>Figure 15 :</b> Thermostabilité des xylanase produites par la souche Z59.....                                                                                                                                                                      | 37         |
| <b>Figure 16 :</b> Courbe d’étalonnage du dosage du glucose.....                                                                                                                                                                                      | Annexes II |
| <b>Figure 17 :</b> Courbe d’étalonnage du dosage de la xylose.....                                                                                                                                                                                    | Annexes II |



## LISTE DES TABLEAUX

|                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau I :</b> Différents types de parois et leurs constituants majoritaires chez les actinobactéries .....                                                                                                  | 6  |
| <b>Tableau II :</b> Composition de la biomasse lignocellulosique de différentes espèces végétales.....                                                                                                           | 10 |
| <b>Tableau III :</b> Propriétés de certains xylanases produit à partir de certains actinobactéries .....                                                                                                         | 14 |
| <b>Tableau IV :</b> Gamme étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs .....                                                                                                                                  | 20 |
| <b>Tableau V :</b> les résultats de l'activité hydrolase des huit souches d'actinobactéries testées sur le milieu de culture gélosé CMC ou Xylane, incubées à une température de 30°C pendant 5J .....           | 25 |
| <b>Tableau VI :</b> les résultats de l'activité lignine peroxydase des huit souches d'actinobactéries testées sur le milieu de culture gélosé PMM + azure B, incubées à une température de 30°C pendant 5J ..... | 26 |
| <b>Tableau VII :</b> Les résultats des activités lignocellulolytiques des huit souches d'actinobactéries .....                                                                                                   | 27 |
| <b>Tableau VIII :</b> Les caractéristiques culturelles macromorphologique de la souche sélectionnée Z59 sur différents milieux.....                                                                              | 30 |
| <b>Tableau IX :</b> Caractéristiques physiologiques et biochimiques de la souche Z59 .....                                                                                                                       | 32 |

# Introduction

### Introduction

L'énergie non renouvelable est une énergie issue de ressources naturelles, qui sont disponibles en quantité limitée, ce qui signifie que le stock de cette énergie s'épuisera avec sa consommation et que son renouvellement nécessite des millions d'années. Avec l'accroissement permanent de la population et l'augmentation de la production et de la consommation d'énergies non renouvelables, le monde est confronté au problème de l'épuisement de cette énergie d'une part, et de ses effets négatifs sur l'environnement d'autre part, en raison de ses émissions de gaz à effet de serre (**Greenwashing, s. d**).

Au cours de ces dernières décennies, de nombreux chercheurs et scientifiques cherchent des alternatives efficaces afin de trouver d'autres sources d'énergie moins coûteuses, moins néfastes pour l'environnement et plus abondantes dans la nature. La biomasse lignocellulosique, constituée principalement de trois composés de base la cellulose, l'hémicellulose et la lignine, fait partie des énergies renouvelables, prometteuses et efficaces qui retiennent actuellement l'attention, du fait de sa durabilité, de son abondance, de son caractère renouvelable et de sa conversion en biocarburant. Sa valorisation présente des opportunités importantes et implique aujourd'hui, en plus des nombreuses applications en agro-alimentaires, de nouveaux débouchés, particulièrement dans les domaines de la bioénergie, la chimie et les biomatériaux (**Czerwiec, 2020**).

La production des biocarburants à partir de la biomasse lignocellulosique nécessite, dans un premier temps, l'hydrolyse de la cellulose et de l'hémicellulose en sucres simples, et la fermentation de ces derniers en éthanol dans un second temps. Néanmoins, la présence de la lignine constitue une barrière à l'hydrolyse enzymatique, et pour contourner cette barrière l'étape de l'hydrolyse enzymatique doit être précédée d'un prétraitement de la biomasse lignocellulosique, dans le but de détruire la lignine et de rendre les enzymes capables d'atteindre la cellulose et l'hémicellulose (**Gatt, 2019**).

La plupart des enzymes lignocellulosiques contribuant à la transformation de la biomasse lignocellulosique en biocarburants sont produites par des micro-organismes. Les champignons représentent le principal organisme par lequel bon nombre de ces enzymes sont produites. Cependant, l'inconvénient des enzymes fongiques est qu'elles sont inefficaces du fait de leur sensibilité à la plupart des paramètres des procédés industriels (**Kontro et al.,2021**). Tandis que les enzymes extracellulaires obtenues particulièrement à partir des actinobactéries se sont révélées performantes et plus efficaces grâce à Leur

capacité à catalyser des réactions à pH large, leur stabilité à hautes températures, la possibilité de leur amélioration par génie génétique, leur tolérance vis-à-vis des solvants organiques, des concentrations élevées de sel...etc., toutes ces caractéristiques en faisaient le choix idéal dans les processus industriels (**Kontroet *al.*, 2021**).

Les actinobactéries représentent le groupe de micro-organismes le plus important dans la production de métabolites bioactifs, y compris les enzymes. Plus de 66900 enzymes ont été produites par des actinobactéries (**Hamedi *et al.*, 2017**), ces organismes sont des saprophytes capables dans leur milieu naturel de produire des enzymes extracellulaires parmi lesquelles (les amylases, les protéases, les ligninases, les cellulases, et les lipases), ces enzymes contribuent à la dégradation de substances organiques ou au recyclage de biopolymères complexes à titre d'exemple : cellulose, lignine, xylane, lignocellulose, kératine, chitine, pectine (**Zerizer, 2014**).

En effet, la production de ces enzymes est très coûteuse vu le coût élevé des matières premières, ce qui est un frein à la production des biocarburants. Partant de cette problématique, ce travail vise à utiliser les déchets agricoles comme matière première pour stimuler les actinobactéries à produire des enzymes à un prix de revient compétitif dans la production des biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération.

Dans le contexte de ce mémoire, les travaux réalisés vont porter sur le criblage et l'identification de souches actinobactériennes d'origines Algériennes, isolées à partir d'échantillons de sol forestiers, productrices d'enzymes lignocellulolytiques, notamment, les cellulases, les xylanases, les lignine peroxydases et les laccases. La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique sur les actinobactéries en général ainsi qu'un aperçu sur la biomasse lignocellulosique et les enzymes lignocellulolytiques participant à la conversion de la biomasse lignocellulosique en biocarburants. La seconde partie est une description du matériel et des méthodes utilisées pendant notre étude et des résultats obtenus et leur discussion relatifs aux différentes étapes de ce travail, à savoir : Criblage des souches productrices d'enzymes lignocellulolytiques, identification de la souche choisie, production enzymatique par fermentation submergée à partir de différents déchets lignocellulosiques, caractérisation de certaines enzymes produites dans le surnageant brut. Ainsi qu'une conclusion générale sur ce travail.

# **Partie I :**

# **Synthèse**

# **bibliographique**

## 1. Généralités et principales caractéristiques

L'origine évolutive des actinobactéries remonte à environ 2700 million d'années (Lewin *et al.*, 2016), alors que, la prise de conscience de l'importance et du rôle des actinobactéries a commencé en 1943, où Waksman et ses collaborateurs ont pu découvrir la première molécule d'antibiotique «streptomycine» produite par les actinobactéries et plus précisément de *Streptomyces griseus* (Frammery, 2020).

Les actinobactéries, anciennement appelées actinomycètes, mot provient de deux mots grecs, le premier étant « Aktis » qui signifie rayon et le second « Mukes » qui signifie champignon, c'est-à-dire « champignons à rayons » ou « champignons rayonnants » (Saker, 2015). Cette dénomination est due à la similitude entre les actinobactéries et les champignons en termes de leur forme fongicoïde (présence de filaments ramifiés, sporulation) et aussi en termes de l'aspect fongique des maladies provoquées par certaines actinobactéries (Ibrahimi, 2020). Cependant, la structure interne des actinobactéries est très similaire à celle des bactéries, montrant que, ces dernières sont des microorganismes ne possédant pas de membrane nucléaire, ayant une paroi cellulaire contenant du peptidoglycane, sensibles aux lysozymes, et aux agents antibactériens. Toutes ces caractéristiques affirment la classification des actinobactéries au sein des bactéries (Ibrahimi, 2020).

Les actinobactéries sont des bactéries Gram-positives, immobiles, la plupart sont aérobies mais certains d'entre eux peuvent se développer dans des conditions anaérobies telles que *Actinomyces israelii* (Aquaportal, 2019), possédant une teneur élevée en G + C généralement allant de 51 % à >70 %, (à l'exception de l'agent pathogène obligatoire *Tropheryma whippelii* dont le pourcentage de G + C est inférieur à 50 %) (Yuan *et al.*, 2014). Elles se caractérisent par une grande variété dans leur morphologie, pouvant aller des formes peu évoluées qui sont des coques (*Rhodococcus* et *Micrococcus*) à des formes très évoluées formant un véritable mycélium (*Nocardia* et *Streptomyces*) en passant par des formes bâtonnets (*Mycobacterium* et *Gordonia*) (Ibrahimi, 2020).

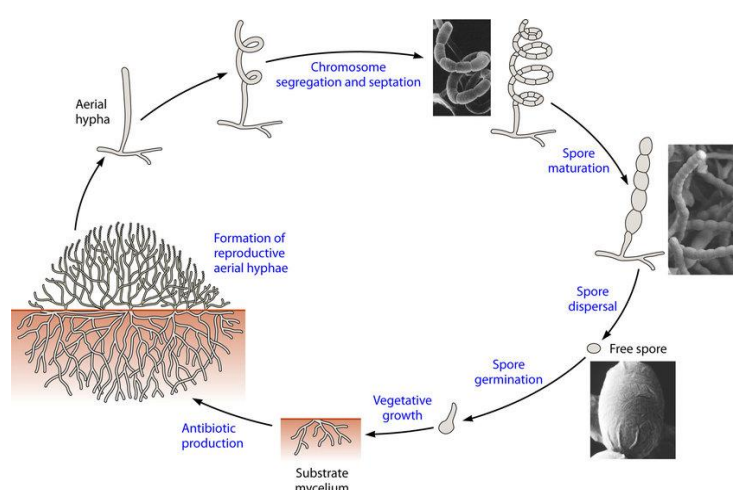
En général, les actinobactéries sont des hétérotrophes ou chimioautotrophes, mais la plupart des organismes de ce groupe sont des chimiohétérotrophes capables d'utiliser une grande variété de polysaccharides complexes. La majorité des actinobactéries sont mésophiles et parfois thermophiles pouvant se développer à des températures allant de 50 à

60 °C. Cependant, la plupart des actinobactéries poussent mieux à un pH compris entre 6 et 9 (Ait Barka *et al.*, 2015).

Les actinobactéries sont ubiquitaires qui peuvent être des habitants de sol ou des milieux aquatiques (*Streptomyces*, *Micromonospora*, et *Salinispora*), des symbiotes végétaux (*Frankia spp*), des agents pathogènes végétaux ou animaux (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, ou espèces *Nocardia*), ou commensaux gastro-intestinaux (*Bifidobacterium spp*) (Ait Barka *et al.*, 2015).

## 2. Cycle de vie

Les actinobactéries ont un cycle de vie complexe, qui varie selon les conditions de croissances (notamment l'état nutritionnel). Les conditions idéales de croissance permettent la croissance des mycéliums cloisonnés similaires aux champignons multicellulaires, tandis que, dans des conditions limitées seuls les mycéliums végétatifs sont capables de se développer. En général, le cycle de vie commence à partir du moment où les spores germent, poussent et se développent en un mycélium végétatif avec des hyphes ramifiés, ces derniers pénètrent dans le substrat pour absorber les nutriments et métabolisent les sources organiques à l'aide de leurs enzymes extracellulaires. Le développement du mycélium végétatif se poursuit jusqu'à ce qu'il devienne un mycélium aérien qui émerge à la surface du substrat, le mycélium aérien subit un ensemble de changements morphologiques qui incluent la septation et la formation des spores matures pour continuer le cycle de vie (Figure 1) (Araujo-Melo *et al.*, 2019).



**Figure 1 :** Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulant (Ait Barka *et al.*, 2015).

### 3. Taxonomie des actinobactéries

Les actinobactéries représentent l'un des plus grands phylums parmi les 18 principales lignées du domaine des bactéries, de sorte que tous les membres des 425 genres de ce phylum sont classés en 6 classes, 46 ordres et 79 familles, dont 16 nouveaux ordres et 10 nouvelles familles (**Salam et al., 2020**). La classification de ce phylum était auparavant basée sur des caractéristiques phénotypiques, à savoir : la morphologie, les caractéristiques chimiques et physiologiques. Il est vrai que ce sont des caractéristiques importantes pour différencier les genres, mais elles ne fournissent pas suffisamment d'informations pour classer ce phylum. Par conséquent, la classification dite polyphasique a été adoptée pour classer les procaryotes, ce qui se fait en combinant entre les informations phénotypiques, chimiotaxonomiques, et génotypiques (**Ventura et al., 2007 ; Mohammadipanah and Dehghani, 2017**).

#### 3.1. Critères actuels d'identification

##### 3.1.1. Critères morphologiques

Les caractéristiques morphologiques permettent de distinguer les genres d'actinobactéries (**Saker, 2015**), le processus de classification morphologique des actinobactéries est réalisé en utilisant plusieurs tests différents, notamment : l'utilisation de colorations conventionnelles et spécifiques. Les caractéristiques macromorphologiques les plus importantes contribuant à la différenciation entre les genres d'actinobactéries, sont représentées par : la production ou non de mycélium aérien, la présence ou l'absence de mycélium du substrat et la couleur de chacun d'entre eux (MA et MS), la production de pigments diffusibles dans le milieu de culture. Tandis que, l'observation micromorphologique permet de préciser la fragmentation ou non du MS, la présence ou non des spores sur le MA et le MS, leur agencement (isolées, par deux ou en chaînes), la forme des chaînes de spores, et l'ornementation de la surface des spores, la présence des sporanges et des synnemata sur le MA, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) (**Saker, 2015**).

##### 3.1.2. Critères chimiotaxonomiques

La classification phénotypique permet d'identifier certains genres d'actinobactéries qui sont difficiles à identifier en fonction de leur morphologie, et nécessitant l'utilisation de la classification chimiotaxonomique. Cette dernière est basée sur l'étude de la composition chimique de la paroi cellulaire des actinobactéries à savoir les acides aminés



pariétaux, les acides gras, les lipides, les ménaquinones, les types d'acide muramique, les sucres et la composition en bases de l'ADN (Lechevalier and lechevalier, 1970). Selon la composition chimique de la paroi, les actinobactéries ont été classées en huit groupes chimiques ou chimiotypes pariétaux (Ibrahimi, 2020 ; Wink et al., 2017) (Tableau I).

**Tableau I :** Différents types de parois et leurs constituants majoritaires chez les actinobactéries (Ibrahimi, 2020).

| Type de paroi | Constituants pariétaux majeures                            | Genres représentatifs                                                                                                                                                                         |
|---------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I             | L-DAP + Glycine                                            | <i>Arachnia</i> , <i>Pimelobacter</i> ,<br><i>Nocardioïdes</i> , <i>Streptomyces</i>                                                                                                          |
| II            | Méso-DAP + Glycine                                         | <i>Actinoplanes</i> , <i>Actinomyces</i>                                                                                                                                                      |
| III           | Méso-DAP                                                   | <i>Dermatophilus</i> , <i>Maduromyces</i> ,<br><i>Frankia</i> , <i>Geodermatophilus</i> ,<br><i>Thermonospora</i> , <i>Kitasatospora</i> ,<br><i>Spirillospora</i> , <i>Thermoactinomyces</i> |
| IV            | Méso-DAP + Arabinose,<br>galactose                         | <i>Micropolyspora</i> , <i>Nocardioformes</i>                                                                                                                                                 |
| V             | Lysine + Ornithine                                         | <i>Actinomyces</i>                                                                                                                                                                            |
| VI            | Présence variable de l'acide<br>Aspartique et de galactose | <i>Microbacterium</i> , <i>Oerskovia</i> ,<br><i>Promicromonospora</i> , <i>Actinomyces</i> ,<br><i>Arcanobacterium</i>                                                                       |
| VII           | Acide diaminobutyrique<br>+ Glycine                        | <i>Agromyces</i> , <i>Clavibacter</i>                                                                                                                                                         |
| VIII          | Ornithine                                                  | <i>Aureobacterium</i> , <i>Curtobacterium</i> ,<br><i>Cellulomonas</i>                                                                                                                        |

### 3.1.3. Critères physiologiques

Étant donné que différentes espèces actinobactériennes ont des caractéristiques physiologiques et métaboliques différentes, ces critères sont utilisés pour les identifier. La classification des actinobactéries selon des critères physiologiques est basée sur des tests de dégradation organique (glucidique, protidique, lipidique, polymères, etc.), des tests de résistance à certains agents antimicrobiens, activité enzymatique, ainsi que la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, NaCl tolérance, etc.) (**Ibrahimi, 2020 ; Mohammadipanah and Dehhaghi, 2017**).

### 3.1.4. Critères génétiques

Ces dernières décennies, la biologie moléculaire s'est imposée comme un outil taxonomique puissant, précis, et incontournable pour la détermination des espèces (**Ait Barka, 2015 ; Ibrahimi, 2020**). Elle permet de regrouper ou de séparer ces espèces entre elles et la création d'une nouvelle définition de l'espèce bactérienne (**Lamari, 2006**).

Les principales analyses moléculaires utilisées pour la détermination des espèces sont le séquençage de l'ADN ribosomique 16S, l'hybridation ADN-ADN (DDH), PCR-Restriction fragment length polymorphism "RFLP", Le séquençage du génome entier (**Fatahi-Bafghi, 2019**).

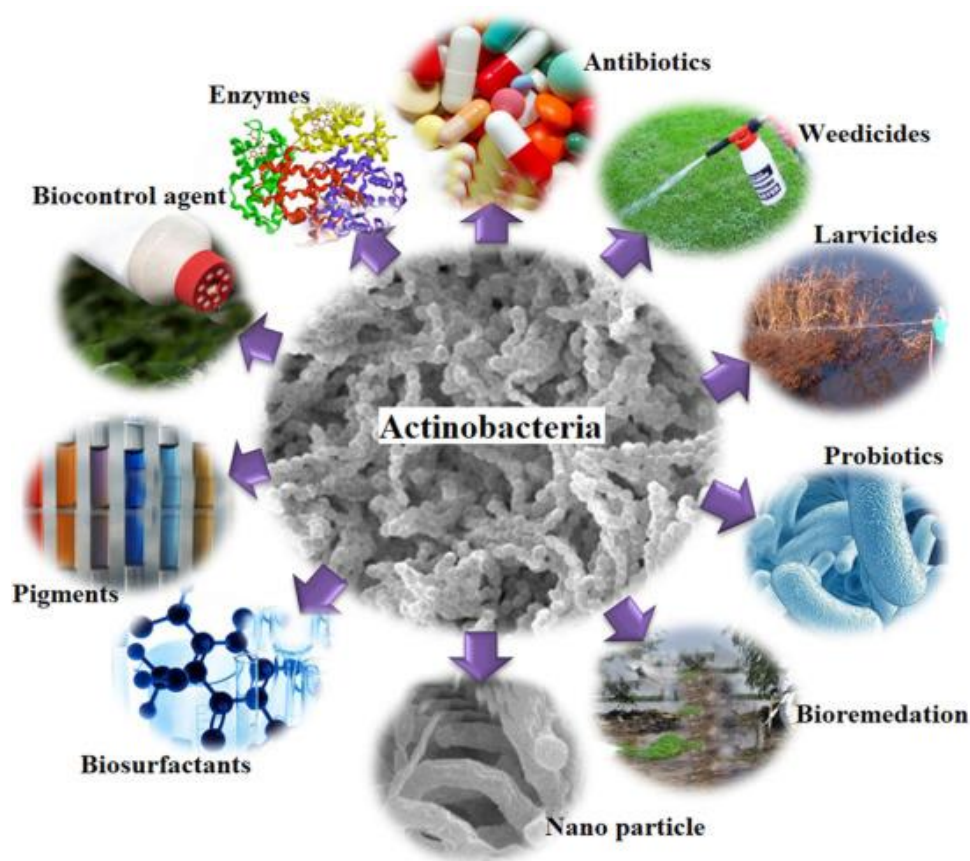
## 4. Importance biotechnologique des actinobactéries

En tant que phylum bactérien le plus grand et le plus répandu dans la nature, les actinobactéries ont attiré l'attention des scientifiques en raison de leur capacités impressionnantes à produire une vaste gamme de composés bioactifs qui ont des applications très importantes dans divers domaines (**Lee et al., 2018**).

Les premiers métabolites secondaires produits à partir des actinobactéries sont les antibiotiques, ces microorganismes ont contribué à la découverte de 14500 antibiotiques utilisés en médecine. Parmi les actinobactéries, les *Streptomyces* représentent le genre le plus productif avec 11000 antibiotiques (**Hamedi et al., 2017**).

Le rôle des actinobactéries ne se limitait pas à produire seulement des antibiotiques, de nombreux métabolites secondaires peuvent être produits par ces microorganismes (**Figure 2**) à savoir les antifongiques, les enzymes extracellulaires, les inhibiteurs d'enzymes (utiles pour le traitement du cancer), les immuno-modificateurs (qui améliorent la réponse immunitaires), les neurotransmetteurs, les terpénoïdes, les pigments, les anti-

tumoraux, les promoteurs de croissance des plantes, les molécules antioxydantes, les herbicides, les vitamines, les larvicides, les hormones, et les tensioactifs (Araujo-Melo et al., 2019 ).



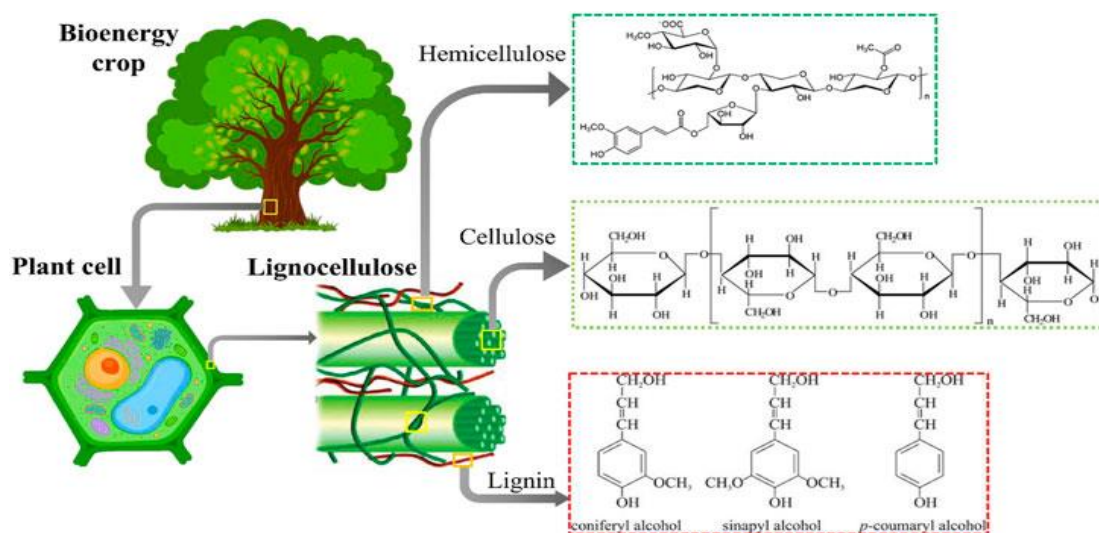
**Figure 2 :** Applications potentielle des actinobactéries dans l’agriculture et les industries (Deka et al., 2020).

## 1. La biomasse lignocellulosique

### 1.2. Structure et composition de la biomasse lignocellulosique

La lignocellulose représente le composant principal de la paroi cellulaire des plantes, elle est considérée comme étant le réservoir de carbone organique renouvelable de la planète car il contient plus de 80 % des polysaccharides. Des études biochimiques et microscopiques de la lignocellulose ont montré qu'elle contient de trois polymères majeurs qui sont : la cellulose, les hémicellulose, et la lignine (**Figure 3**), de plus des petites quantités de pectines, de protéines, de cires, de pigments, et de minéraux (**Bastien-uluis, 2012**). La proportion de chacun de ces constituants varie fortement selon les espèces végétales, la nature du tissu considéré et le type de biomasse. Ceci est illustré par les exemples du **tableau II**.

La structure tridimensionnelle de la biomasse lignocellulosique montre que les trois polymères (cellulose, hémicellulose et lignine) sont fortement interconnectés par des liaisons covalentes et des liaisons hydrogènes, conférant aux plantes une rigidité et une haute protection contre les agressions (**Saidi, 2011**)



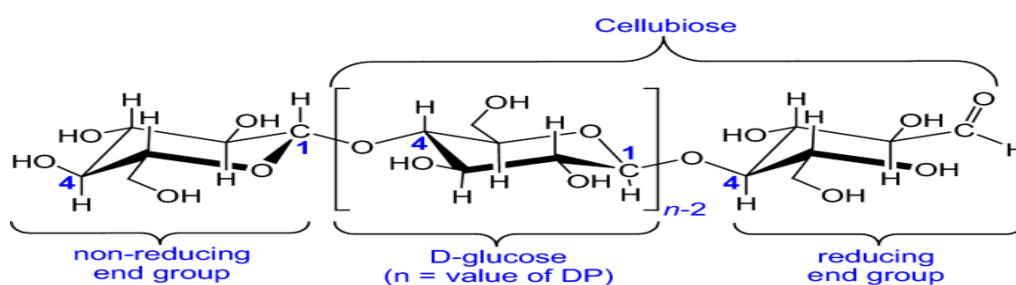
**Figure 3 :** Illustration schématique montrant une culture bioénergétique (biomasse lignocellulosique), où la paroi cellulaire végétale est composée de lignocellulose constituée de polymères glucidiques tels que la cellulose, l'hémicellulose, et la lignine (**Sankaran et al., 2021**).

**Tableau II :** Composition de la biomasse lignocellulosique de différentes espèces végétales (Saidi, 2011).

| Biomasse    | Cellulose | Hémicellulose | Lignine   |
|-------------|-----------|---------------|-----------|
| Bois dur    | 40 - 55 % | 24 - 40 %     | 18 - 25 % |
| Bois tendre | 45 - 50 % | 25 - 35 %     | 25 - 35 % |
| Pailles     | 30 - 43 % | 22 - 35 %     | 15 - 23 % |
| Herbes      | 25 - 40 % | 35 - 50 %     | 10 - 30 % |

### 1.2.1. La cellulose

La cellulose est le constituant dominant de la lignocellulose, et le polysaccharide le plus abondant sur la planète. Elle est un homopolymère linéaire constitué de 1000 à 1 million d'unités de D-glucose reliées entre elles par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1,4) (Figure 4) (Reynaud, 2017). Les unités de D-glucopyranose sont organisées en chaînes, en plus des liaisons glycosidiques il existe également des liaisons hydrogènes dans la même chaîne de cellulose (intramoléculaire) et aussi entre les chaînes de cellulose (intermoléculaire). Les chaînes de cellulose sont étroitement liées les unes aux autres en parallèle par des liaisons hydrogènes et des forces de Van Der Waals formant des structures cristallines appelées microfibrilles de sorte que chaque microfibrille est composé de 30 à 60 chaînes de glucane (Eriksson, 2014 ; Leadbeater, 2018).



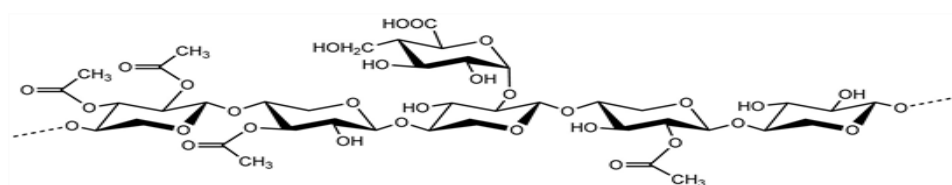
**Figure 4 :** Structure moléculaire de la cellulose (Leadbeater, 2018).

### 1.2.2. L'hémicellulose

L'hémicellulose représente la deuxième catégorie de polysaccharides la plus abondante dans les parois cellulaires chez les végétaux, avec un pourcentage compris entre

25 à 35 % de la matière sèche des parois végétales. Contrairement à la cellulose, les hémicelluloses sont des hétéropolymères composés de plusieurs monomères différents pouvant contenir à la fois des hexoses, de pentoses neutres (D-glucose, D-mannose, D-xylopyranose, L-arabinofuranose) et des saccharides acides (acide glucuronique, et acide méthylglucuronique) (**Gatt, 2019**).

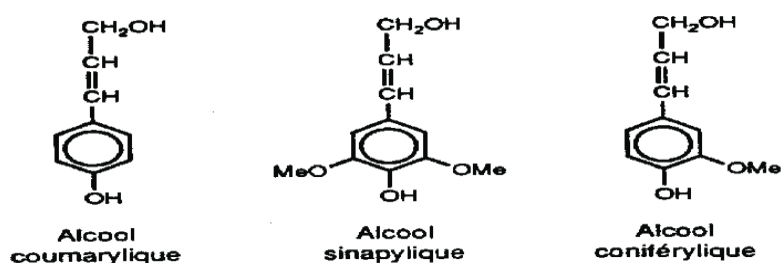
Les hémicelluloses sont des polysaccharides formés d'un squelette de  $\beta$ -1,4-glycosides en position équatoriale (**Figure 5**), où il comprend : les xyloglucanes, hétéroxylanes, (gluco) mannanes et  $\beta$ -(1,3-1,4)-glucanes. Le xylane, c'est le principal composant de l'hémicellulose dans la paroi cellulaire végétale (**Kamaouri et al., 2014**).



**Figure 5 :** Structure de l'hémicellulose (**Hu et al., 2020**).

### 1.2.3. La lignine

La lignine est le troisième polymère le plus abondant dans la paroi cellulaire et connue comme la première source d'éléments aromatiques sur terre. La lignine c'est un polymère réticulé complexe dérivé du couplage oxydatif de trois monomères alcooliques du phénylpropane qui sont : l'alcool coniférylique, l'alcool p-coumarylique et l'alcool sinapylique (**Figure 6**), ces derniers sont formés à partir de la phénylalanine dans le cytoplasme puis sécrétés dans la paroi cellulaire des végétaux (**Gatt, 2019 ; Leadbeater, 2018**).



**Figure 6 :** Motifs élémentaires de la lignine (**Rousset et al., 2006**).

## 2. Les enzymes lignocellulolytiques

### 2.1. Enzymes dégradant la lignine

#### 2.1.1. La lignine peroxydase

Les peroxydases forment une famille d'enzymes largement distribuées dans la nature notamment dans les organismes vivants tels que les plantes, les animaux, et les microbes. La lignine peroxydase (LiP) [EC 1.11.1.14], est également appelée diaryl propane oxygénase, catalyse la dégradation oxydatif d'une large gamme de substrats phénoliques et non phénoliques en présence du peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électron (Falade et al., 2016).

#### 2.1.2. La laccase

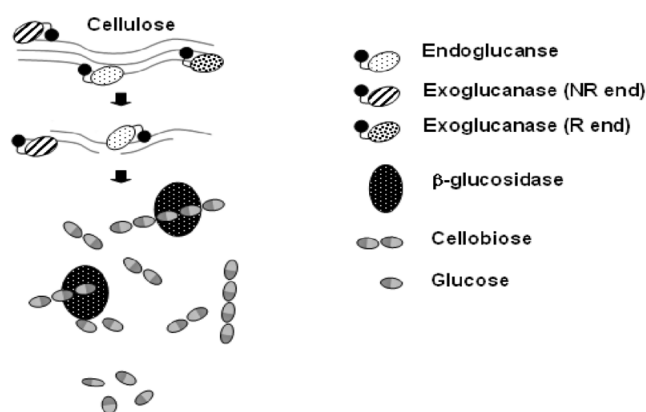
Les laccases (EC 1.10.3.2, benzènediol : dioxygénoxydoréductase) sont une famille des oxydases bleues découvertes en 1883, par Yoshida à partir d'un arbre japonais *Toxicodendron vernicifera*. La source de ce type d'enzymes ne se limite pas aux seules plantes, elles se trouvent chez de nombreux organismes tels que : les bactéries, les insectes, les algues, les mollusques et les éponges (Hahn, 2023). Elles catalysent l'oxydation d'une large gamme de substrats notamment, les substances phénoliques, di- et polyphénols, les biaryles hydroxylés, les aminophénols, ou les aryldiamines, couplée à la réduction d'une molécule de dioxygène O<sub>2</sub> en deux molécules d'eau H<sub>2</sub>O avec formations des radicaux libres (Gatt, 2019 ; Hahn, 2023).

### 2.2. Enzymes dégradant les polysaccharides

#### 2.2.1. Les cellulases

Les cellulases sont des enzymes extracellulaires inductibles synthétisés par des micro-organismes pendant leur croissance sur les matériaux cellulosiques, elles appartiennent à la famille de glycosyl hydrolases (GH), qui présentent la capacité de cliver les liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4 des polysaccharides de la cellulose (Thoresen et al., 2021).

L'hydrolyse complète de la cellulose en glucose exige le clivage de toutes les liaisons glycosidiques grâce aux actions catalytiques de trois types d'enzymes agissant de manière synergique au niveau des liaisons internes (endo-glucanases), des extrémités (exo-glucanases) et du cellobiose (les  $\beta$ -glycosidases) (Datsomor et al., 2022) (Figure 7).



**Figure 7 :** Mécanismes d'action de la cellulase (Mathew et al., 2008).

### 2.2.2. Les hémicellulases

Pour une dépolymérisation complète et efficace d'hémicellulose, il existe des enzymes qui attaquent la chaîne principale : les xyloglucannes  $\beta$ -1,4-endoglucannases, les  $\beta$ -1,4-endoxylannases, les  $\beta$ -1,4-endomannanases et les  $\beta$ -1,4-mannosidases et des enzymes de débranchement de différentes substitutions appelées enzymes accessoires dégradant les chaînes latérales (Chastel, 2019).

#### 2.2.2.1. Les xylanases

Les xylanases sont des glycosidases (O-glycoside hydrolases, EC 3.2.1.8) considérées comme un groupe d'enzymes répandus et impliqué dans la production de xylose. Les xylanases catalysent l'hydrolyse de la structure de xylane, qui est le composant principal de l'hémicellulose dans les cellules végétales, spécifiquement en clivant de manière aléatoire les liaisons 1,4-D-xylosidique dans les régions non substituées des chaînes de xylane (Lopez-Lopez et al., 2023). La dégradation du xylane fait appel à deux types d'activités d'enzymes : les endoxylanases qui clivent leurs substrats par une attaque intramoléculaire et les exoxylanases qui hydrolysent les polymères de xylose à partir de leur extrémité non réductrice (Hamedi et al., 2017).

##### 2.2.2.1.1. Distribution et rôles physiologiques

Les xylanases sont des enzymes ubiquitaires dans la nature, leur présence est observée dans divers organismes vivants. Elles se trouvent principalement chez les bactéries, les insectes, les algues, les champignons, les plantes et les graines. Néanmoins, les bactéries et les champignons restent les microorganismes les plus utilisés pour la production industrielle de xylanase (Bhardwaj et al., 2019).



### 2.2.2.1.2. Propriétés des xylanases

Les xylanases sont des protéines monomériques de poids moléculaire compris entre 15 et 145 kDa, avec un point isoélectrique compris entre 3 et 10 (**Álvarez-Cervantes et al., 2016**). La composition en acides aminés des xylanases révèle une forte proportion des résidus acides et aromatiques. Les xylanases ne sont pas des métallo-enzymes ; généralement les groupements –SH ne sont pas impliqués dans le maintien de l'activité enzymatique. Par contre, la tyrosine et le tryptophane jouent un rôle dans l'activité catalytique des xylanases. Certaines xylanases possèdent une fraction glucidique représentant 15 à 30 % de la molécule protéique (**Subramaniyan and Prema, 2002**). En général, les xylanases de différents microorganismes sont souvent stables sur une gamme de pH 3-10 et montrent un optimum de pH dans la gamme 4-7. Selon **Bakri (2003)**, la température optimale des xylanases varie entre 40 et 60 °C (**Tableau III**). En général, les xylanases bactériennes sont plus thermostables que les enzymes fongiques (**Basit et al., 2020**).

**Tableau III** : Propriétés de certains xylanases produit à partir de certains actinobactéries (**Bhardwaj et al., 2019**).

| Genre                              | Substrat                  | PM<br>(kDa) | Optimum |     | Stabilité |        |
|------------------------------------|---------------------------|-------------|---------|-----|-----------|--------|
|                                    |                           |             | T°C     | pH  | T°C       | pH     |
| <i>Streptomyces olivaceus</i>      | Xylane de bouleau.        | 23          | 40      | 7   | 20-70     | 5-11   |
| <i>Streptomyces thermovulgaris</i> | Xylane d'hêtre.           | 46.2        | 65      | 6.5 | 50-70     | 4-11.5 |
| <i>Kitasatospora</i> sp            | Bagasse de canne à sucre. | 49.3        | 50      | 5   | 30-80     | 4-7    |

PM : Poids moléculaire de xylanase.

### 2.2.2.1.3. Applications des xylanases

Ces dernières années, le secteur industriel a suscité un vif intérêt pour les xylanases, en particulier dans le cadre du bio-blanchissement de la pâte à papier et la fabrication du papier, dans l'alimentation animale pour augmenter la digestibilité des céréales et la qualité de la litière des animaux monogastriques (**Chen et al., 2015**), dans la clarification des jus

de fruits et des vins (**Shahi et al., 2016**), dans la production des biocarburants comme l'éthanol à partir de la biomasse lignocellulosique (**Shahi et al., 2016**), dans la biotransformation des textiles (**Dhiman et al., 2008**), et dans la bioconversion des xylanes en produits à plus forte valeur ajoutée, dont l'un des plus importants est le xylitol, qui est utilisé comme édulcorant dans différentes denrées alimentaires et dans le dentifrice et divers produits pharmaceutiques (**Collins et al., 2005**).

# **Partie II :**

# **Partie expérimentale**

# Matériel et méthodes

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel analytique

Le matériel analytique utilisé dans ce travail est résumé en annexe I.

### 1.2. Matériel biologique

Les huit souches d'actinobactéries référencées S21, S24, U7, V7, Z59, Z3, A15 et C16 utilisées dans cette étude appartiennent à la collection du laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'université A. Mira de Bejaia, elles ont été isolées à partir d'un échantillon de sol forestier dans la région de Tikdjeda située dans la Willaya de Bouira.

## 2. Méthodes

### 2.1. Revivification des souches d'actinobactéries

Les souches d'actinobactéries conservées sur le milieu gélosé Gausse à une température de 4°C, ont été repiquées dans le même milieu Gausse (**Annexe I**) par la méthode des stries serrées à la surface de la gélose et incubées à 30° C pendant 5 jours.

### 2.2. Criblage de souches d'actinobactéries productrices d'enzymes lignocellulolytiques

#### 2.2.1. Criblage qualitatif sur milieu solide

Le criblage qualitatif de différentes activités enzymatiques des huit souches d'actinobactéries est évalué en utilisant la méthode des cylindres d'agar. Cette méthode consiste à découper stérilement des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre d'une culture jeune puis les déposer à la surface d'un milieu solide contenant un substrat spécifique de l'enzyme recherché comme seule source de carbone et d'énergie (**Figure 8**).

##### 2.2.1.1. Souches productrices des activités hydrolases

Les activités cellulase et xylanase des huit souches d'actinobactérie sont évaluées par la méthode décrite auparavant sur un milieu solide contenant comme unique source de carbone la Carboxyl Methyl cellulose de sodium (CMC) ou le xylane de bouleau à 1 %, respectivement. Le pH est ajusté à une valeur de 7.2. La composition du milieu (g/L) : CMC ou xylane de bouleau 10 ; NaNO<sub>3</sub> 1.2 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.2 ; CaCl<sub>2</sub> 0.05 ; MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.01 ; extrait de levure 0.5 et agar 20 (**EL-naggar et al., 2011**).

Après incubation à 30°C pendant 5 jours, la révélation des activités est réalisée avec une solution de rouge de Congo à 0.1% ou de Lugol, et 20 minutes plus tard l'excès du colorant est éliminé suivi par un rinçage avec une solution de NaCl à 1 M pendant 15

minutes (**EL-naggar et al., 2011**). La visualisation des halos clairs autour des cylindres correspond aux zones d'hydrolyse de la CMC ou du xylane. Le diamètre de la zone d'hydrolyse est calculé comme suit :

$$D = \frac{D_{\text{mesuré}}}{D_{\text{disque}}}$$

Avec :

D mesuré : diamètre de l'halo + diamètre de disque d'agar mesuré par une règle (cm).

D disque : diamètre de disque d'agar qui est égale à 0.6 cm.

### 2.2.1.2. Souches productrices des activités oxydoréductases

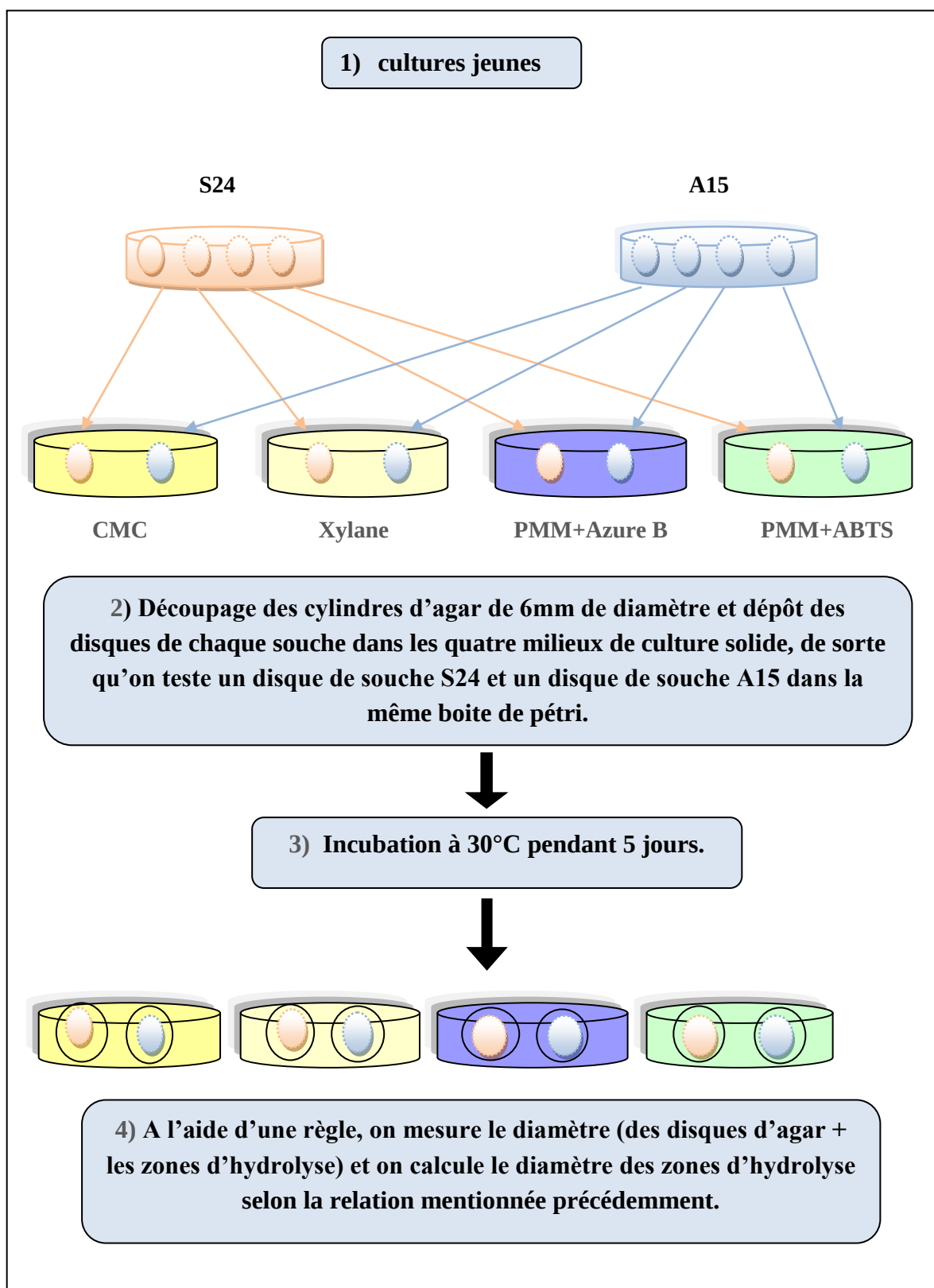
Le criblage des activités laccase et lignine peroxydase des souches d'actinobactéries est mis en évidence en utilisant l'ABTS et l'azure B, respectivement, comme indicateur sur le milieu PMM composé de (g/L) : Glucose : 2g ; Ammonium tartrate : 2g ; Extrait de Malt : 2g ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,26g ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : 0,26g ;  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,5g ;  $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$  : 0,01g ;  $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,0066g ;  $\text{FeSO}_4$  : 0,005g ;  $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,0005g ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  : 0,02mg ;  $\text{MnCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,099mg ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  : 0,07mg et Agar : 18g additionnée de 0.1g d'Azure B ou 0.35g d'ABTS après autoclavage. Le pH est ajusté à 7.2 (**Dhouib et al., 2005**). Les cylindres d'agar sont déposés à la surface des boîtes puis incubées à 30°C pendant 15 jours.

L'activité laccase se traduit par l'apparition d'une zone verte autour des cylindres, tandis que, l'activité lignine peroxydase se manifeste par la disparition de la couleur bleue autour des cylindres.

## 2.2.2. Criblage quantitatif sur milieu liquide

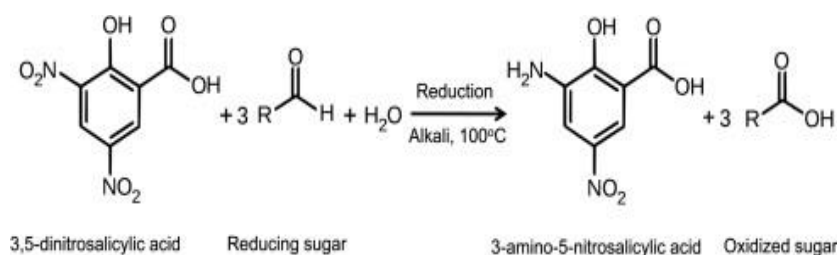
### 2.2.2.1. Activité hydrolase

Les huit souches d'actinobactéries sont cultivées sur le milieu Gausse pendant 5 jours à 30°C. Pour chaque culture deux disques d'agar de 6 mm de diamètres servent à inoculer 30 mL des milieux liquides contenant CMC ou xylane de bouleau à 1 % comme unique source de carbone avec un pH ajusté à une valeur de 7.2 dans des Flacons de 200 ml. Après incubation (6 jours 30°C), les surnageants des cultures sont récupérés par centrifugation à 8 000g pendant 20 minutes à 4°C.



**Figure 8 :** Schéma récapitulatif montrant les étapes de réalisation du criblage qualitatif pour les souches S24 et A15.

Les activités cellulases et xylanases sont mesurées selon la méthode de dosage des sucres réducteurs en utilisant l'acide dinitrosalicylique (DNS) (**Miller, 1959**).



**Figure 9 :** La réduction de DNS (Acide 3,5-dinitrosalicylique) dans un milieu alcalin à 100°C (**Thongprajukaew and Hayee, 2014**).

Le mélange réactionnel est composé de 100  $\mu\text{L}$  d'extrait enzymatique et auquel sont ajoutés 900  $\mu\text{L}$  d'une solution de CMC à 1 % (m/v) ou de xylane de bouleau à 0.5 % (m/v) préparée dans un tampon phosphate 50 mM à pH 6. Ce mélange est incubé à 50° C pendant 5 min. La réaction enzymatique est stoppée par addition de 1,5 ml d'une solution de DNS (**Annexe I**), puis le mélange est homogénéisé au Vortex et porté à ébullition pendant 5 minutes pour la stabilisation de la couleur, suivi par un refroidissement immédiat dans de la glace pendant 5 minutes (**Tuncer et al., 1999**).

La lecture des absorbances est effectuée à 540 nm. Suivant la courbe d'étalonnage les valeurs d'absorption mesurées sont converties en équivalent glucose ou xylose (**Annexe II**). L'étalon de référence est réalisé avec une solution de xylose ou de glucose à des concentrations respectives de 0 ; 0,3 ; 0,6 ; 0,9 ; 1,2 et 1,5 mg/ml (**Tableau IV**).

A partir de chaque concentration, on prélève 100  $\mu\text{L}$ , auquel on rajoute 900 $\mu\text{L}$  de solution de xylane de bouleau à 0,5 % ou CMC à 1% et 1,5 ml de la solution de DNS, le chauffage est réalisé à 100°C pendant 5 minutes puis les tubes sont refroidis pour effectuer les lectures d'absorbances à 540nm.

Le témoin correspond à la solution de CMC ou xylane de bouleau (900  $\mu\text{L}$ ) incubée sans l'extrait brut à 50°C pendant 5 min, puis on ajoute 1.5 ml de DNS et 100  $\mu\text{L}$  de l'extrait brut.

L'activité enzymatique est calculée en unité internationale par mL d'extrait enzymatique. Une unité de l'activité cellulase ou xylanase est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent de glucose ou xylose par minute, respectivement. Dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus.



Les activités xylanase et cellulase sont calculées d'après la relation rapportée par **Bailey et al (1992)** :

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

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

V : volume réactionnel de la cinétique enzymatique en mL.

$V_e$  : volume enzymatique utilisé en mL.

X : 180 (Masse molaire de glucose) ou 150 (Masse molaire de xylose).

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

| Tube                                             | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6    |
|--------------------------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|------|
| <b>CMC ou xylane de bouleau à 1.5 mg/mL (μL)</b> | 0    | 200 | 400 | 600 | 800 | 1000 |
| <b>Tampon phosphate (μL)</b>                     | 1000 | 800 | 600 | 400 | 200 | 0    |
| <b>Concentration (mg/mL)</b>                     | 0    | 0.3 | 0.6 | 0.9 | 1.2 | 1.5  |

#### 2.2.2.2. Activité oxydoréductase

La production de laccase est réalisée dans des Flacons de 250 mL contenant 30mL du milieu de base LMM composé de : glucose (2 gL<sup>-1</sup>), tartrate d'ammonium (2 gL<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 gL<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.5 gL<sup>-1</sup>), KCl (0.5 gL<sup>-1</sup>), extrait de levure (1 gL<sup>-1</sup>), peptone (5 gL<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (150 μM), et 10 mL de solution trace d'éléments contenant par litre: EDTA (0.5 g), FeSO<sub>4</sub> (0.2 g), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.01 g), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0.003g), H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> (0.03 g), CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0.02 g), CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.001 g), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.003 g). Tandis que, la production de lignine peroxydase est effectuée en utilisant le milieu de base SMM composé de (g/L) : glycérol : 10 ; Ammonium tartrate : 1.84 ; sodium tartrate : 2,30 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 2 ; MgSO<sub>4</sub> : 0,7g ; CaCl<sub>2</sub> : 0,14 ; FeSO<sub>4</sub> : 0,007 ; ZnSO<sub>4</sub> : 0,046 ; MnSO<sub>4</sub> : 0,03 ; CuSO<sub>4</sub> : 0,007 ; Thiamine : 0,005 ; Extrait de levure : 1 ; Tween 80 : 0,5 et Veratryl d'alcool : 0,0670 (**Dhouib et al., 2005**).

Les cultures sontensemencées avec deux cylindres d'agar d'une culture de cinq jours, suivi d'une incubation à 30°C pendant 10 jours sous agitation à 150 rpm. Après incubation, le bouillon de culture est centrifugé à 8 000 g pendant 20 minutes à 4° C.

L'activité laccase est mesurée par spectrophotomètre à température ambiante suivant la méthode décrite par **Childs et Bardsley (1975)** en utilisant l'ABTS comme substrat. Le mélange réactionnel est composé de : 980  $\mu\text{L}$  d'une solution d'ABTS (2mM) préparée dans un tampon citrate de sodium 0.1 M à pH 4.6 et auquel sont ajoutés 20  $\mu\text{L}$  d'extrait enzymatique. Le suivi de l'oxydation de l'ABTS est fait à 420 nm ( $\epsilon_{420}=36\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) pendant une minute.

L'activité lignine peroxydase (LiP) est quantifiée par spectrophotomètre à température ambiante suivant la méthode décrite par **Tuncer et al. (1999)** en utilisant le 2,4-dichlorophénol (2,4- DCP) comme substrat. Le mélange réactionnel (volume total 1mL) contient 200  $\mu\text{L}$  d'une solution de 2,4-DCP (25mM), 200  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate de potassium 0.1 M (pH 7), 200  $\mu\text{L}$  d'une solution 4-Aminoantipyrine (16mM) et 200  $\mu\text{L}$  d'extrait enzymatique. La réaction enzymatique est initiée suite à l'addition de 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50mM). Le suivi de l'oxydation de 2,4-DCP est fait à 510 nm ( $\epsilon_{510}=21\ 647\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) pendant une minute.

Les activités laccase et lignine peroxydase sont exprimées en unités internationales par mL d'extrait enzymatique (U/mL), où une unité internationale est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder une micromole d'ABTS ou de 2,4-DCP par minute, dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus.

### **2.3. Identification de la souche sélectionnée Z59**

#### **2.3.1. Etude morphologique de la souche sélectionnée Z59**

##### **2.3.1.1. Caractères macromorphologiques**

Les caractéristiques culturales consistent à déterminer la couleur des mycélia aérien et du substrat, l'aspect général des colonies ainsi que les pigments solubles produits après 14 jours d'incubation à 30°C sur différents milieux de culture (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, GYEA et le milieu Gausse).

La composition de ces milieux est donnée en annexe.

##### **2.3.1.2. Caractères micromorphologiques**

La souche Z59 obtenue sur les différents milieux cités précédemment est observée à l'aide d'un microscope optique à deux grossissements (x40) et (x100) après 14 jours d'incubation. Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour

étudier les mycélia en place sans en altérer les structures. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique ainsi que leur agencement (**Williams et al., 1989**).

### **2.3.2. Étude physiologique et biochimique de la souche sélectionnée Z59**

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques de la souche sélectionnée Z59 sont étudiées essentiellement sur la base de la croissance. L'étude de l'utilisation des composés glucidiques et azotés comme seule source de carbone est effectuée sur le milieu ISP9 (composition en annexe I) préconisé par **Pridham and Gottlieb (1948)** additionné de composés glucidiques et azotés de façon à obtenir une concentration finale de 1% (m/v). Les différents glucides testés dans cette étude sont : fructose, galactose, ribose, sorbitol, glucose, inositol, lactose, maltose, tréhalose, mannitol, mannose, arabinose, cellobiose, et xylose. Les différents composés azotés testés sont : leucine, arginine, asparagine, glutamate, glutamine, lysine et méthionine.

Après incubation de 2 semaines à 30°C, la croissance est estimée sur les boîtes contenant les composés glucidiques et azotés par rapport à celles obtenues sur le milieu sans source de carbone (contrôle négatif) et aussi sur le milieu contenant 1 % de glucose (contrôle positif) dans le cas des glucides.

La dégradation de divers autres composés organique est étudiée essentiellement sur la base des activités lytiques selon la méthode de **Gordon et al. (1974)** pour l'amidon, la caséine du lait, le xylane et la cellulose. En outre, l'activité lipase est analysée en utilisant le tween 80 (**Sierra, 1957**).

La sensibilité aux antibiotiques est effectuée sur le milieu Gausse (**Shirling and Gottlieb, 1966**). Les antibiotiques testés sont : acide fusidique FC (10 µg), ciprofloxacine CIP (5 µg), ceftazidime CAZ (30 µg), Ofloxacine OF (5 µg), Novobiocine NV (30 µg), Kanamycine K (30 µg) et Chloramphenicol C (30 µg).

La croissance à différentes températures (15, 28, 37, 40 et 45°C), à différentes valeurs de pH (4, 5, 11 et 12), et à différentes concentrations de chlorures de sodium NaCl (0-5%) est suivie sur milieu Gausse (**Athalye et al., 1985**).

La sensibilité à l'azide de sodium (0,01 et 0,001 %) est évaluée sur milieu Gausse (**Athalye et al. 1985**).

## **2.4. Production d'enzymes lignocellulosiques par la souche sélectionnée Z59 en fermentation submergée**

La souche sélectionnée Z59 pour cette étude est testée pour sa capacité à produire des enzymes lignocellulosiques à savoir cellulase, xylanase et lignine peroxydase sur un substrat naturel. Quatre substrats lignocellulosiques bon marché sont testés en fermentation submergée à savoir le son de blé, la paille de blé, la coque d'arachides et le marc de café. La culture est réalisée en milieu liquide à pH 7,2. Un volume de 30 mL du milieu liquide est incorporé dans des Flacons de 200 mL en duplicata, après inoculation, les cultures sont incubées pendant 13 jours à 30 °C. Les cultures obtenues sont centrifugées à 8000g pendant 20 minutes afin d'obtenir le surnageant de culture qui fait l'objet des tests d'activités cellulase, xylanase et lignine peroxydase.

## **2.5. Caractérisation de xylanases produites par la souche sélectionnée Z59 dans le surnageant brut**

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

Le pH optimum des xylanases brutes est déterminé par incubation d'un mélange réactionnel composé à des pH variant de 3 à 12. Quatre différents tampons à 50mM sont utilisés. Le tampon citrate pour les pH de 3 à 6, le tampon phosphate pour les pH de 6 à 8, le tampon Tris-HCl pour les pH de 8 à 10 et le tampon glycine-NaOH pour les pH de 11 à 12. La stabilité vis-à-vis du pH est évaluée en incubant les xylanases brutes à différents pH (3-12) pendant 1.3.5 et 24 h à température ambiante. L'activité enzymatique résiduelle est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité initiale.

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

La température optimale des xylanases brutes est déterminée en testant l'activité enzymatique à différentes températures : 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C et 90°C. La thermostabilité des xylanases brutes est testée en préincubant l'enzyme en absence de substrat à différentes températures comprises entre 40°C et 80°C pour un intervalle de temps allant jusqu'à 2 heures avec des prélèvements effectués chaque 20 minutes. L'activité résiduelle est mesurée en pourcentage par rapport à l'activité initiale.

# Résultats et discussion

## 1. Criblage de souches d'actinobactéries productrices d'enzymes lignocellulolytiques

À fin de sélectionner la souche productrice d'enzymes lignocellulolytiques, huit souches d'actinobactéries à savoir S21, S24, U7, V7, Z59, Z3, A15 et C16 isolées à partir d'un échantillon de sol forestier ont soumis à deux types de criblages, qualitatif et quantitatif sur différents milieux de cultures.

### 1.1. Criblage qualitatif « sur milieu solide »

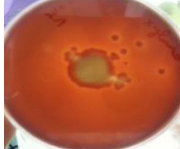
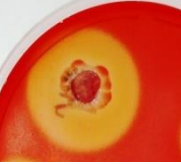
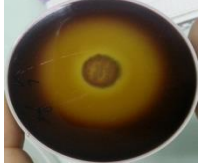
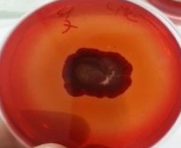
Les résultats du criblage qualitatif des activités lignocellulosiques à savoir cellulase, xylanase, lignine peroxydase et laccases des huit souches d'actinobactéries testées sur les milieux gélosés sélectifs ont montré la formation d'une zone d'hydrolyse claire à différentes intensités autour les cylindres d'agar sur les milieux gélosés à base de CMC et de xylane et d'azure B et par l'apparition d'une zone verte au tour des cylindres d'agar sur les milieux gélosés à base d'ABTS (**Tableau V et VI**). Ces observations s'expliquent par la sécrétion d'enzymes lignocellulolytiques dans le milieu caractérisant ainsi la production de cellulases, xylanases, lignine peroxydase et laccases.

le diamètre de la zone d'activité étant proportionnelle à l'intensité de l'activité enzymatique est mesuré afin de sélectionner les souches à activité enzymatique la plus élevée (**Ariffin et al., 2006**).

Les résultats obtenus montrent que la sécrétion des activités enzymatiques diffère entre les huit souches d'actinobactéries. Cependant, quelques souches combinent trois activités testées à savoir Z59, S21, S24, A15 et Z3, alors que, d'autres ne présentent que deux activités tel que les souches C16, U7 et V7.

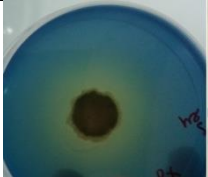
les cellulases et les xylanases sont des enzymes produites par une grande diversité de micro-organismes, (**Li et al., 2017 ; Glass et al., 2013**). En effet, les actinobactéries ont fait l'objet de nombreuses études montrant souvent une meilleure activité hydrolase. Parmi eux, on peut citer *Streptomycescaelestis* (**Suchita et al., 2006**) *Streptomyces* sp B-PNG23 (**Bettache et al., 2013**) et *Streptomyces* sp. S1M3I (**Medouni et al., 2017**). Par ailleurs, plusieurs souches d'actinobactéries ayant la capacité de dégrader la lignine en produisant la lignine peroxydase ont été rapportées dans la littérature, dont les plus connues les souches *Streptomyces viridosporus* T7 (**Zeng et al., 2013**), *Amycolatopsis* sp (**Brown et al., 2011**) et *Rhodococcus jostii* RHA1 (**Mycroft et al., 2015**).

**Tableau V:** Les résultats de l'activité hydrolase des huit souches d'actinobactéries testées sur le milieu de culture gélosé CMC ou Xylane, incubées à une température de 30°C pendant 5J.

| Cellulase                                                                                 |     |     |                                                                                            |     |     | Xylanase                                                                                    |     |     |                                                                                              |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Souche                                                                                    | +/- | D   | Souche                                                                                     | +/- | D   | Souche                                                                                      | +/- | D   | Souche                                                                                       | +/- | D   |
| <br>S21  | +   | 3.2 | <br>Z3    | +   | 2.1 | <br>Z3   | +   | 2.6 | <br>S21   | +   | 1.9 |
| <br>S24  | +   | 3.5 | <br>A15   | +   | 2.5 | <br>S24  | +   | 3.7 | <br>A15   | +   | 3.5 |
| <br>V7  | +   | 2.8 | <br>C16  | +   | 3.8 | <br>V7  | +   | 3.7 | <br>C16  | +   | 2.7 |
| <br>U7 | +   | 2.9 | <br>Z59 | +   | 3.8 | <br>U7 | +   | 2.2 | <br>Z59 | +   | 3.8 |

D : diamètre (cm), + : Présence, - : Absence.

**Tableau VI :** Les résultats de l'activité lignine peroxydase des huit souches d'actinobactéries testées sur le milieu de culture gélosé PMM + azure B, incubées à une température de 30°C pendant 5J.

| Souche                                                                                            | D   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <br><b>S21</b>   | 1.5 |
| <br><b>S24</b>   | 1.7 |
| <br><b>Z3</b>   | 1.2 |
| <br><b>A15</b> | 1.4 |
| <br><b>Z59</b> | 1.1 |

**D :** diamètre (cm).



## 1.2. Criblage quantitatif « sur milieu liquide »

L'évaluation de la potentialité des souches d'actinobactéries à produire les enzymes lignocellulosiques dans le milieu liquide, est intéressante pour déceler des souches d'intérêt industriel. C'est pourquoi, les huit souches ont été évaluées quantitativement en effectuant des dosages enzymatiques.

Les résultats de criblage quantitatif de différentes activités enzymatiques des huit souches d'actinobactéries sont présentés dans le **tableau VII** ci-dessous.

**Tableau VII :** Les résultats des activités lignocellulolytiques des huit souches d'actinobactéries

| Souche | cellulase (UI/ml) | xylanase (UI/ml) | Laccase (UI/mL) | Lignine peroxydase (UI/mL) |
|--------|-------------------|------------------|-----------------|----------------------------|
| Z59    | 6.997 ± 0.025     | 7.912 ± 0.615    | 0               | 0.0072 ± 0.0008            |
| S21    | 4.525 ± 0.488     | 3.418 ± 0.076    | 0               | 0.0078 ± 0.0009            |
| S24    | 1.878 ± 0.771     | 3.750 ± 0.410    | 0               | 0.0061 ± 0.0027            |
| A15    | 1.962 ± 0.119     | 2.794 ± 0.205    | 0               | 0.0003 ± 0.00016           |
| C16    | 2.405 ± 0.145     | 4.192 ± 0.111    | 0               | 0                          |
| U7     | 0.205 ± 0.068     | 2.208 ± 0.333    | 0               | 0                          |
| V7     | 2.356 ± 0.282     | 2.788 ± 0.333    | 0               | 0                          |
| Z3     | 1.538 ± 0.376     | 0.780 ± 0.213    | 0               | 0.0054 ± 0.0017            |

Ces résultats révèlent des activités cellulases comprises entre (0.205-6.997 UI/mL), des activités xylanases entre (0.780-7.912 UI/mL) et des lignines peroxydases entre (0.0003 à 0.0078 UI/mL).

Les résultats obtenus montrent que parmi les huit souches testées, les activités enzymatiques les plus élevées sont celles des souches Z59 (cellulases et xylanases) et S21 (lignine peroxydases).

Une étude réalisée par **Medouni et al. (2017)** a révélé la capacité de la souche *Streptomyces* sp. S1M3I à produire des activités lignocellulolytiques importantes à savoir cellulase (1.44 U/mL), xylanase (6.65 U/ml) et laccase ( $3,42 \cdot 10^{-3}$  U/mL) qui pourrait servir comme biocatalyseur intéressant pour des applications biotechnologiques.

Dans cette étude, les huit souches d'actinobactéries testées présentent une diversité d'activités enzymatiques : cellulases, xylanases et lignine peroxydases qui en fait de bonnes candidates d'intérêt biotechnologique. Parmi elles, la souche Z59 a été sélectionnée pour une étude approfondie en tant que producteur potentiel des xylanases douée d'une importance industrielle et environnementale.

## 2. Identification de la souche sélectionnée Z59

### 2.1. Etude morphologique de la souche sélectionnée Z59

#### 2.1.1. Caractères macromorphologiques

Les caractères macroscopiques de la souche sélectionnée Z59 sont étudiés sur les milieux ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, G.Y.E.A et Gausse après 14 jours d'incubation à 30°C. La description de l'ensemble des résultats concernant la forme, la croissance, l'aspect de surface, les pigments diffusibles ainsi que la couleur de mycéliums aériens et du substrat sont rassemblées dans le **tableau VIII**.

D'après les résultats de l'observation macroscopique, la souche Z59 a montré une bonne croissance sur les milieux ISP2, ISP3, Gausse et G.Y.E.A en développant un mycélium aérien abondant. Alors que la croissance était moyenne sur le milieu ISP4. Cependant, la souche Z59 présentait une croissance lente et faible sur le milieu ISP1.

À l'exception des milieux ISP1 et GYEA, qui n'ont enregistré aucune sporulation, une bonne sporulation est observée sur milieux ISP3 et Gausse suivis d'une faible sporulation sur les milieux ISP2 et ISP4.

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

#### 2.1.2. Caractères micromorphologiques

L'observation au microscope optique de la souche Z59 après 14 jours d'incubation à 30°C, révèle que cette souche est une bactérie filamenteuse. Les filaments du mycélium aérien sont très ramifiés et fragmentés de manière anarchique en éléments plus au moins

longs, non mobiles aboutissant à la formation de chaînes de spores en zig-zag. Le mycélium su substrat se fragmente un peu, ce qui correspond bien aux caractéristiques des *Nocardiosis* (Meyer, 1976).

La figure suivante représente le mycélium aérien de l'isolat HBD30 observé au microscope optique (Optika) au grossissement 10 x 40.



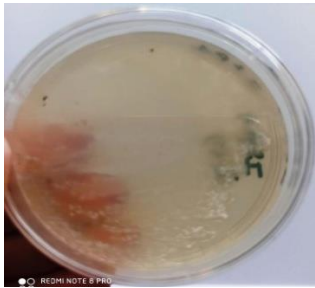
**Figure 10 :** Observation microscopique de la souche Z59 après 14 jours d'incubation à 30°C (G×40 et ×100).

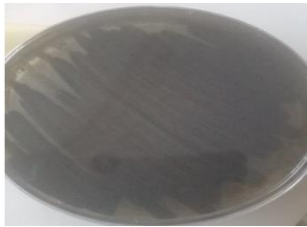
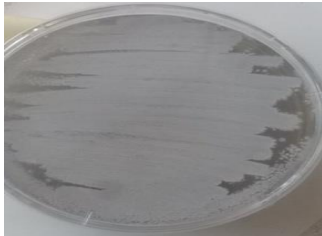
## 2.2. Etude physiologique et biochimique de la souche sélectionnée Z59

La croissance de la souche Z59 en présence de différentes sources carbonées a montré sa capacité à utiliser la plupart des glucides testés comme source de carbone et d'énergie à l'exception de saccharose, ribose et tréhalose. Les résultats obtenus ont montré également que la souche Z59 est capable d'utiliser d'autres composés organiques tels que l'amidon, la caséine du lait, le xylane, la cellulose ainsi que le tween 80. De plus, elle est capable d'utiliser la majorité des composés azotés testés à l'exception de glutamate.

Les résultats de la résistance ou la sensibilité aux antibiotiques indiquent que la souche Z59 est sensible à la plupart des antibiotiques testés. Cependant, la souche Z59 a montré une résistance vis-à-vis aux deux antibiotiques qui sont la ceftazidime (CAZ) et l'acide fusidique (FC). Tandis qu'on observe une sensibilité à l'égard des autres antibiotiques utilisés dont la zone d'inhibition varie entre 11 et 36 mm de diamètre. Ainsi que cette souche a montré une résistance à une concentration d'azide de sodium de 0.001%.

**Tableau VIII :** Les caractéristiques culturelles macromorphologique de la souche sélectionnée Z59 sur différents milieux.

| Milieu de culture | Croissance | Sporulation | Pigments diffusibles | Couleur de mycélium                                                                        |                                                                                              |
|-------------------|------------|-------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   |            |             |                      | Aérien (en surface)                                                                        | Substrat (en revers)                                                                         |
| ISP 1             | Faible     | –           | –                    |  Blanc  |  Incolore |
| ISP 2             | Abondante  | +/-         | –                    |  Gris   |  Marron   |
| ISP 3             | Abondante  | +           | –                    |  Gris |  Vert   |

|         |           |     |   |                                                                                                    |                                                                                               |
|---------|-----------|-----|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| ISP 4   | Abondante | +/- | - | <br>Gris claire | <br>Beige  |
| G.Y.E.A | Abondante | -   | - | <br>Jaune       | <br>Orange |
| Gausse  | Abondante | +   | + | <br>Gris       | <br>Gris  |

+ : Présence ; - : Absence.

Une température comprise entre 15 et 40°C semble favorable au développement de la souche Z59. La croissance de cette souche à différents niveaux de pH montre sa préférence pour un pH légèrement acide, neutre et alcalin compris entre 5 et 12, cela suggère l'inclusion de cette souche dans le groupe des actinobactéries alcalophiles (Singh *et al.*, 2009). La croissance de la souche Z59 en présence de différents sels de sodium montre qu'elle est halotolérante, et tolère des concentrations en NaCl jusqu'à 5 (%), cela plaide en faveur de leur appartenance au genre *Nocardioopsis* connu pour cette caractéristique (Hozzein and Trujillo, 2012).

Les résultats des caractéristiques physiologiques et biochimiques de la souche Z59 est présentées dans le **tableau IX**.

**Tableau IX :** Caractéristiques physiologiques et biochimiques de la souche Z59

| Tests                                | Résultats | Tests                                          | Résultats |
|--------------------------------------|-----------|------------------------------------------------|-----------|
| <b>Utilisation des sucres</b>        |           | <b>Sensibilité aux antibiotiques (Ø en mm)</b> |           |
| Arabinose                            | +         | Ciprofloxacine (CIP)                           | 11        |
| Cellobiose                           | +         | Ofloxacin (OF)                                 | 22        |
| Fructose                             | +         | Novobiocine (NV)                               | 36        |
| Galactose                            | +         | Kanamycine (K)                                 | 32        |
| Glucose                              | +         | Ceftazidime (CAZ)                              | R         |
| Inositol                             | +         | Aide fusidique (FC)                            | R         |
| Lactose                              | +         | Chloramphenicol (C)                            | 34        |
| Maltose                              | +         | <b>Utilisation des sels de sodium</b>          |           |
| Mannitol                             | +         | Acétate                                        | +         |
| Mannose                              | +         | Citrate                                        | +         |
| Saccharose                           | -         | Tartrate                                       | +         |
| Ribose                               | -         | <b>Croissance en présence de NaCl (%)</b>      |           |
| Sorbitol                             | +         | 0                                              | +         |
| Tréhalose                            | -         | 5                                              | +         |
| Xylose                               | +         | <b>Croissance à</b>                            |           |
| <b>Utilisation d'autres composés</b> |           | 4°C                                            | -         |
| Amidon                               | +         | 15°C                                           | +         |
| Xylane                               | +         | 40°C                                           | +/-       |
| CMC                                  | +         | 45°C                                           | -         |
| Tween 80                             | +         | <b>Croissance à</b>                            |           |
| <b>Utilisation des acides aminés</b> |           | pH4                                            | -         |
| Asparagine                           | +         | pH5                                            | +         |
| Arginine                             | +         | pH11                                           | +         |
| Glutamate                            | -         | pH12                                           | +         |
| Glutamine                            | +         | <b>Croissance en présence de (%)</b>           |           |
| Leucine                              | +         | Azide de sodium 0.001                          | +         |
| Lysine                               | +         | Azide de sodium 0.01                           | -         |
| Méthionine                           | +         |                                                |           |

L'étude des caractères physiologiques et biochimique de la souche Z59 est importante pour déterminer l'espèce d'actinobactéries. Néanmoins, malgré toutes ces données, seules les études phylogénétiques basées sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S nous permettront de statuer définitivement sur l'appartenance de la souche Z59 au genre précis et de le rapprocher à l'espèce existante.

### **3. Production d'enzymes lignocellulosiques par la souche sélectionnée Z59 en fermentation submergée**

De nombreuses études sont menées sur la production d'enzymes lignocellulolytiques par des bactéries et champignons en utilisant des sources de carbone bon marché notamment les déchets agroindustriels comme un moyen prometteur de réduction significative du coût de production des enzymes.

La production d'enzymes lignocellulosiques par fermentation submergée à partir de la souche sélectionnée Z59 est testée après 2, 5, 7 et 13 jours d'incubation en utilisant quatre déchets agricoles (son de blé, paille de blé, coque d'arachide et marc de café) comme substrat. Les résultats de production d'enzymes lignocellulosiques par la souche Z59 sont présentés dans la **figure 11**.

Les résultats obtenus montrent la capacité de la souche Z59 à utiliser différents déchets agroindustriels comme source de carbone. Ces différentes sources de carbone induisent la production d'enzymes lignocellulolytiques, mais les quantités produites sont variables.

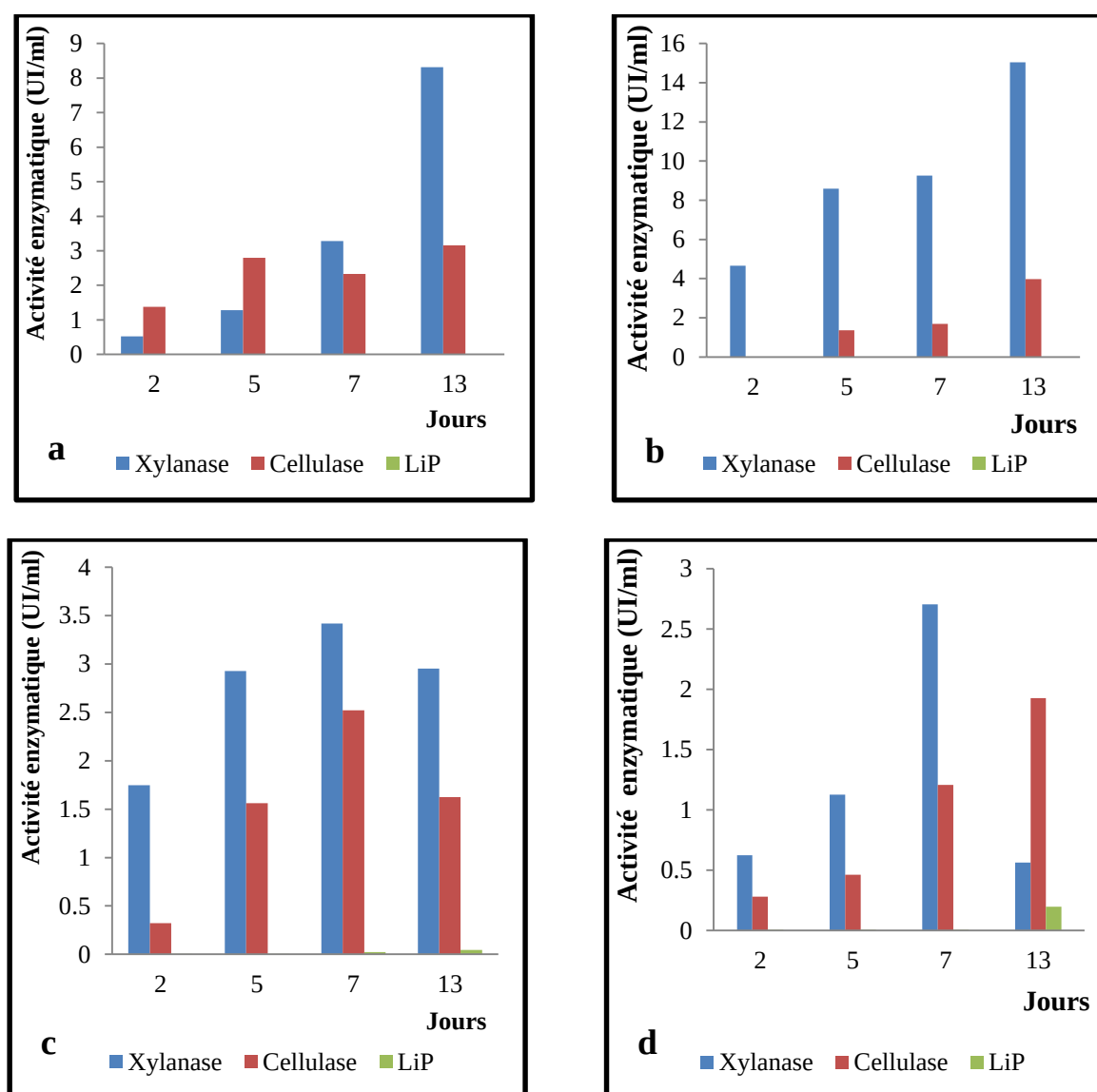
Une production appréciable de lignines peroxydases par la souche Z59 est observée dans les cultures avec le marc de café (0.196 UI/mL) après 13 jours d'incubation à 30°C, et une très faible activité avec la coque d'arachide. Aucune activité n'est détectée avec le son de blé et la paille de blé.

La production maximale d'enzyme xylanase par la souche Z59 correspond au 13<sup>ème</sup> jour d'incubation, où elle atteint environ 15.039 UI/mL en présence de paille de blé et 8.312 UI/mL en présence de son de blé comme substrats. Cependant, en présence de coque d'arachide et de marc de café, l'activité xylanase maximale est estimée de 3.418 UI/ml et de 2.704 après 7 jours d'incubation, respectivement.

La souche Z59 montre une activité cellulase maximale de 3.162 ; 3.980 ; 1.926 UI/ml après 13 jours d'incubation en présence de son de blé, de paille de blé et de marc de café,

respectivement. Alors que, l'activité cellulase maximale de 2.520 UI/ml est obtenue après 7 jours d'incubation en présence de coque d'arachide comme substrat.

La paille de blé est un coproduit agroindustriel bon marché et constitue une bonne source de substrat pour la culture de divers microorganismes et son utilisation est rapportée dans plusieurs études comme une meilleure source de carbone conduisant à l'amélioration de la production de xylanases, cellulases et lignine peroxydases (Yang et al., 2006 ; Sanghvi et al., 2010 ; Ahmed et al., 2018 ; Matrawy et al., 2021, Azzouz et al., 2021),



**Figure 11 :** Production des activités lignocellulolytiques de la souche sélectionnée Z59 par fermentation submergée sur quatre substrats lignocellulosiques, a : Son de blé ; b : Paille de blé ; c : Coque d'arachide ; d : Marc de café.



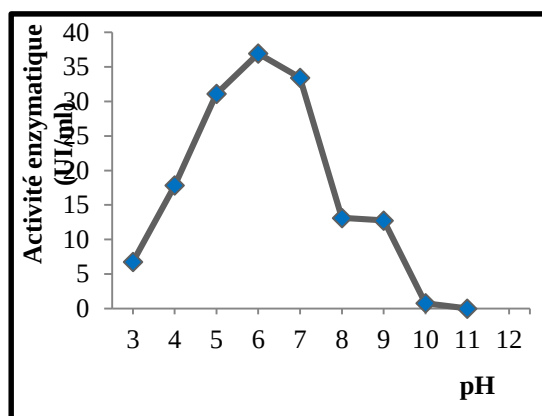
### 3.1. Caractérisation de xylanase produites par la souche sélectionnée Z59 dans le surnageant brut

#### 3.1.1 Détermination du pH optimum et de la stabilité

Les profils d'activité enzymatique en fonction du pH des xylanases brutes produites par la souche Z59 sont portés sur la **figure 12**.

Selon les résultats obtenus, l'enzyme xylanase a montré une activité importante dans des niveaux de pH compris entre 5 à 7, où l'activité maximale de 36.942 UI/mL est observée à pH 6 ce qui représente le pH optimum pour cette enzyme, et ce qui indique que cette enzyme est capable d'agir dans un pH légèrement acide à neutre qui rendra en mesure d'être appliquée dans divers industries. Pour les valeurs de pH supérieures à 6, l'activité enzymatique commence à diminuer graduellement jusqu'à l'inhibition à des pH alcalins.

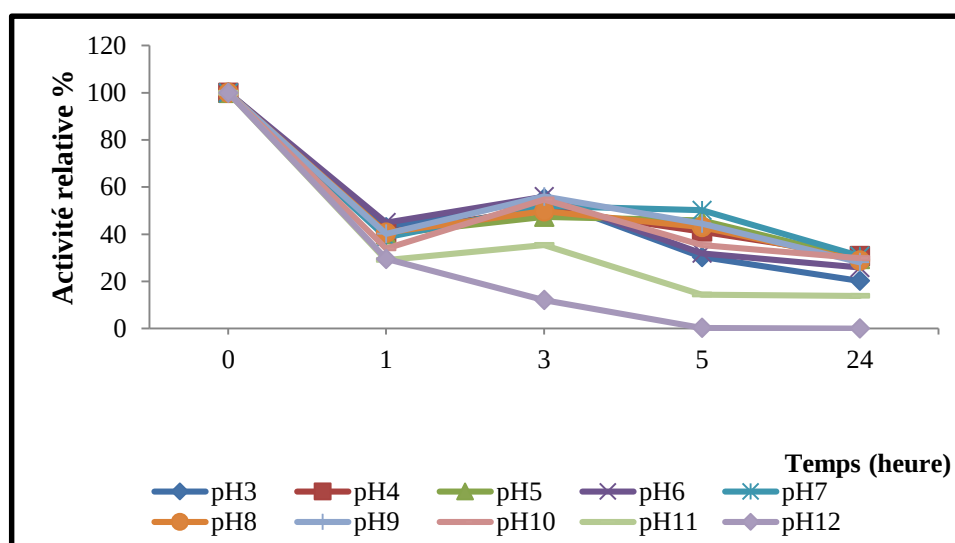
D'après la bibliographie, les résultats obtenus sont similaires à la majorité des travaux réalisés où l'activité optimale est, fréquemment, obtenue à un pH de 6 pour des xylanases produites par souches *Streptomyces* sp. 7b (**Bajaj and Singh, 2010**), *Streptomyces* sp. RCK-2010 (**Kumar et al., 2012**), *Streptomyces* sp. BPNG23 (**Bettache et al., 2020**) et *Aspergillus niger* (**Azzouz et al., 2021**).



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

D'après les résultats de la stabilité des xylanases vis-à-vis du pH, illustrés dans la **figure 13**, nous pouvons conclure que la stabilité des xylanases est affectée par la gamme du pH testée et elles sont moins stables à des pH compris entre 3 et 10 avec un temps de demi-vie de 3 heures d'incubation. Ces résultats sont en désaccord avec les résultats

obtenus par **Boucherba et al. (2017)** qui ont rapportés que les xylanases de la souche *Bacillus oceanisediminis* SJ3 sont très stables à une gamme du pH allant de 5 à 10.



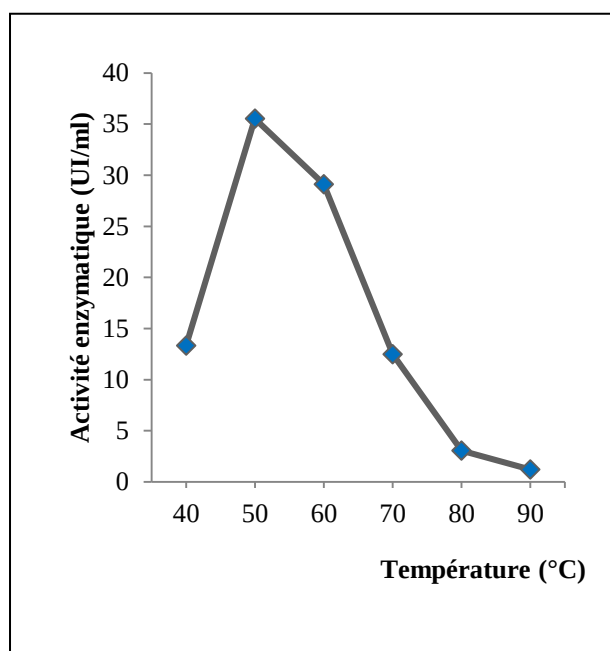
**Figure 13 :** L'activité relative de la xylanase produite par la souche Z59 en fonction du temps à différents pH.

### 3.1.2. Détermination de la température optimale et de la thermostabilité

L'influence de la température sur l'activité xylanase produite par la souche Z59 est rapport e dans la **figure 14** ci-dessous. L'activité xylanase de la souche Z59 est d termin e à des températures variant de 40 à 90 C.

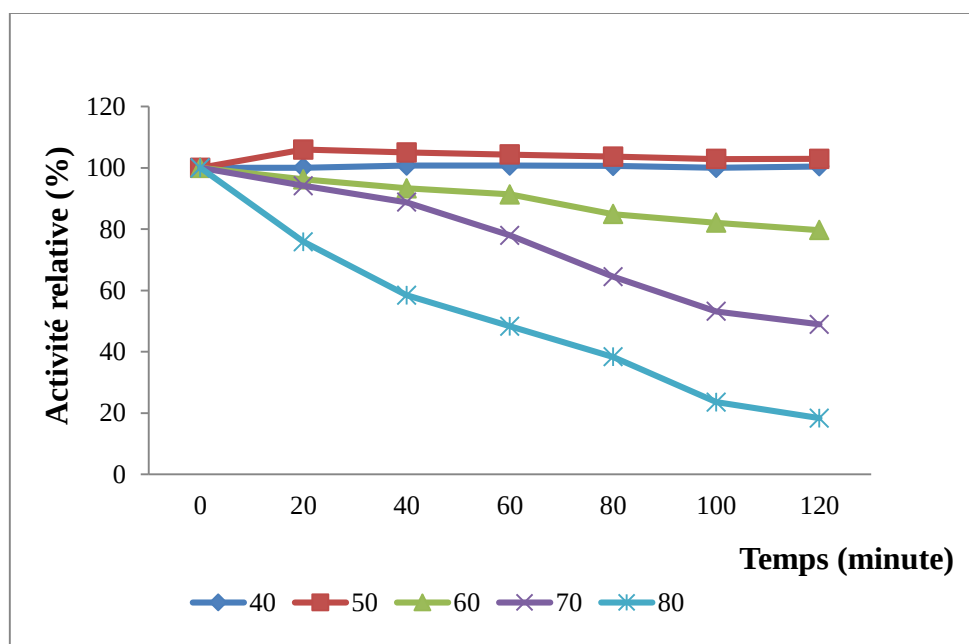
Les xylanases brutes se sont r v l es actives dans la gamme des températures appliqu es avec une activité optimale à 50  C (35.539 UI/mL). Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature où l'activité maximale est trouv e à une température de 50  C (**Sharma and Bajaj, 2005 ; Bajaj and Singh, 2010 ; Bettache et al., 2020 ; Azzouz et al., 2021**).

Les expériences de la stabilité montrent que l'enzyme xylanase montre une durabilité  lev e lorsqu'elle est incub e à 40 et 50 C. Elle conserve environ 50 % de son activité initiale pendant 1h et 2h   70 et 80  C, respectivement (**Figure 15**).



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

La thermostabilité de nos xylanases brutes est meilleure que celle obtenue pour les xylanases de *Aspergillus niger* ayant une demi-vie de 30 minutes à 50 et 60 C (**Azzouz et al., 2021**). Une étude menée par **Bettache et al. (2020)** a rapport  la stabilité des xylanases de la souche *Streptomyces* sp. BPNG23 ayant une demi-vie de 6h à 50 C.



**Figure 15 :** Thermostabilité des xylanases produites par la souche Z59.

# Conclusion

Dans cette présente étude, on s'est intéressé à la production d'enzymes lignocellulolytiques à partir de huit souches d'actinobactéries appartenant à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université A. Mira de Bejaia.

Ce travail a permis de sélectionner la souche Z59 parmi les huit souches d'actinobactéries isolées à partir d'un échantillon de sol forestier pour une étude plus approfondie en tant que producteur potentiel des xylanases.

Les tests d'identification basés sur les caractères morphologiques et les caractères physiologiques ont permis de rattacher la souche Z59 au genre *Nocardiopsis*.

La capacité de la souche Z59 à produire des enzymes lignocellulolytiques à savoir cellulases, xylanases et lignine peroxydases en présence de différents déchets agricoles comme substrats naturels lignocellulosiques bon marché en fermentation submergée a été étudiée, ce qui est avantageux pour réduire les coûts de l'ensemble du procédé. Les résultats ont montré la capacité de la souche Z59 à produire des quantités importantes d'enzymes lignocellulolytiques, où l'enzyme xylanase était produite en quantités plus élevées lorsque la paille de blé est utilisée comme source de carbone.

La caractérisation des xylanases produites dans le surnageant brut de la souche Z59 montre que les xylanases sont actives dans une gamme de pH allant de 3 à 10 et de température (40-90°C) avec des optima respectifs de 6 et 50°C. Les xylanases brutes sont moins stables à des pH compris entre 3 et 10 pendant 24h. L'activité xylanase est stable dans la gamme de température de 40 à 50°C où aucune diminution n'a été observée pendant 2h. Les xylanases brutes sont sensibles à la température de 80°C et seulement une activité relative de 20% est observée après 2h d'incubation.

Au terme 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 la souche étudiée (chimiotaxonomiques et moléculaires) afin de l'affilier à l'espèce correspondante.
- Purifier les xylanases pour mieux les caractériser et envisager leur utilisation dans les procédés industriels.
- Optimiser la production des xylanases de la souche en utilisant des logiciels qui permettent de déterminer les conditions optimales.

# Références bibliographiques

A

- Ahmed, A. A. Q., Babalola, O. O., & McKay, T. (2018).** Cellulase-and xylanase-producing bacterial isolates with the ability to saccharify wheat straw and their potential use in the production of pharmaceuticals and chemicals from lignocellulosic materials. *Waste and biomass valorization*, 9, 765-775.
- Ait Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H-P. et al. (2015).** Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80:1, 43p.
- Álvarez-Cervantes, T., Domínguez-Hernández, E.M., Mercado-Flores, Y., O'Donovan, A. & Díaz-Godínez, G. (2016).** Mycosphere Essay 10 : Properties and characteristics of microbial xylanases. *Mycosphere*, 7(10), p. 1600-1619.
- Aquaportail. (2019).** Actinomycètes : définition. Site téléaccessible à l'adresse <<https://www.aquaportail.com/definition-4941-actinomycete.html>>. Consulté le 02/12/2019.
- Araujo-Melo, R., Oliveira, T.H.B., Oliveira, C.V.J., Araújo, J., Sena, K.X.R.F. & Barroso Coelho, L.C.B. (2019).** Actinobacteria: A Renewable Source of Bioactive Molécules with Medical, Industrial and Pharmacological Importance. In F. Cruz Sosa (ed), *Advances and Trends in Biotechnology and Genetics* (p. 62-79) (first éd). India. United Kingdom :Book Publisher International.
- Ariffin, H., Abdullah, N., UmiKalsom, M.S., Shirai, Y. & Hassan, M.A. (2006).** Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* eb3, *Int. J. Eng. Technol*, 3, p. 47-53.
- Athalye, M., Goodfellow, M., Lacey, J. & White, R.P. (1985).** Numerical classification of *Actinomyces* and *Nocardia*, *Int. J. Syst. Bacteriol*, 35, p. 86-98.
- Azzouz, Z., Bettache, A., Boucherba, N., Prieto, A., Martinez, M.J., Benallaoua, S. & de Eugenio, L.I. (2021).** Optimization of  $\beta$ -1,4-Endoxylanase Production by an *Aspergillus niger* Strain Growing on Wheat Straw and Application in Xylooligosaccharides Production. *MOLECULES*, 26, 2527p.

B

- Bailey, M.J., Biely, P. & Poutanen K. (1992).** Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol*. 23, p. 257-270.
- Bajaj, B.K. & Singh, N.P. (2010).** Production of xylanase from an alkalitolerant *Streptomyces* sp 7b under solid-state fermentation, its purification and characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162 : p. 1804-1818.
- Bakri, Y., Jacques, P., & Thonart, P. (2003).** Xylanase production by *Penicillium canescens* 10–10c in solid-state fermentation. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 737-748). Humana Press, Totowa, NJ.

- Basit, A., Jiang, W. & Rahim, K. (2020).** Xylanase and its industrial applications. In T.P. Basso, T.O. Basso & L.C. Basso (eds), *Biotechnological Applications of Biomass* (638p). São Paulo : IntechOpen.
- Bastien-Uluis, G. (2012).** Découverte de nouvelles enzymes de dégradation des polysaccharides végétaux par Métagénomique Fonctionnelle. Thèse de Doctorat, ingénieries microbienne et enzymatique, Toulouse : université de Toulouse, 239p.
- Bettache, A., Copinet, E., Zahra, A., Boucherba, N., Bouiche, C., Hamma, S., Maibeche, Rima., Duchiron, F. & Benallaoua, S. (2020).** Purification and characterization of an endoglucanase produced from *Streptomyces* sp. STRAINBPNG23. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 10.
- Bettache, A., Messis, A., Copinet, E., Kecha, M., Boucherba, N., Belhamiche, N., Francis, D. & Benallaoua, S. (2013)** Optimization and partial characterization of endoglucanase produced by *Streptomyces* SP. B-PNG23, *Arch. Biol. Sci.*, 65(2), p. 549-558.
- Bhardwaj, N., Kumar, B. & Verma, P. (2019).** A detailed overview of xylanases : an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, 6: 40, 36p.
- Boucherba, N., Gagaoua, M., Bouanane-Darenfed, A., Bouiche, C., Bouaem, K., Kerbous, M.Y., Maafa, Y. & Benallaoua, S. (2017).** Biochemical properties of a new thermo- and solvent-stable xylanase recovered using three phase partitioning from the extract of *Bacillus oceanisediminis* strain SJ3. *Bioresour. Bioprocess*, 4, 29.
- Brown, M. E., Walker, M. C., Nakashige, T. G., Iavarone, A. T. & Chang, M. C. (2011).** Discovery and characterization of heme enzymes from unsequenced bacteria: application to microbial lignin degradation, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, p. 18006-18009.

## C

- Chastel, C., F. (2019).** Exploration de secrétomes d'*Aspergillus* spp. en vue de la complémentation du cocktail cellulolytique de *Trichoderma reesei*. Thèse de Doctorat. Biotechnologie. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France. France.
- Chen, C-C., Ko, T-P., Huang, J-W. & Guo, R-T. (2015).** Heat-and Alkaline-Stable xylanase: Application, Protein Structure and Engineering. *ChemBioEngRev*, 2(2), p. 95-106.
- Childs, R.E. & Bardsley, W.G. (1975).** The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen, *Biochem. J.*, 145, 93-103.
- Collins, T., Gerday, C. & Feller G. (2005).** Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev*. 29, 3-23.
- Czerwiec, D. (2020).** Evaluation du potentiel ligninolytique bactérien pour la production de molécules aromatiques. Thèse de Doctorat. France.



## D

- Datsomor, O., Yan, Q., Opoku-Mensah, L., Zhao, G. & Miao, L. (2022).**Effect of Different Inducer Sources on Cellulase Enzyme Production by White-Rot *Basidiomycetes Pleurotes Ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under Submerged Fermentation. *Fermentation*, 8, 11p.
- Deka, P., Zothanpuia, M., Passari, A.K. & Singh, B.P. (2020).** Actinobacteria as a potential naturel source to produce antibiofilm compounds : An overview. In M. K. Yadav & B. P. Singh (eds), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms* (p. 91-99) (1<sup>st</sup> ed.). India: Elsevier.
- Dhiman, S.S., Sharma, J. & Battan B (2008).** Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review.
- Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., Martínez, M.J. & Sayad, S. (2005).** Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 1415-1423.

## E

- El-naggar, N.E., Sherief, A.A. & Hamza, S.S. (2011).** Bioconversion process of rice straw bythermotolerant cellulolytic *Streptomyces viridiochromogenes* under solid-state fermentationconditions for bioethanol production, *J. Biotechnol.*, 10(56), 11998-12011.
- Eriksson, H. (2014).**Cellulose reactivity : difference between sulfite and PHK dissolving pulps. Thèse de Doctorat ; Ingénierie Chimie, Suède : Université d'Umeå, 57p.

## F

- Falade, A.O., Nwodo, U.U., Iweriebor, B.C., Green, E., Mabinya, L.V. & Okoh, A.I. (2016).** Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *MicrobiologyOpen*, 3, 14p.
- Fatahi-Bafghi, M. (2019).** Antibiotic resistance genes in the actinobacteria phylum. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38, p. 1599-1624.
- Frammery, C. (2020).** Streptomycine l'invention et l'antibiotique, et plus encore. Le Temps. En ligne sur : <https://www.letemps.ch/sciences/sante/streptomycine-linvention-lantibiotique-plus>.

## G

- Gatt, M.E. (2019).** Etude de la déconstruction de résidus agricoles lignocellulosiques par extrusion biocatalytique. Thèse de Doctorat ; Sciences des agroressources, France : Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP), 209p.
- Glass, N.L., Schmoll, M., Cate, J.H. & Coradetti, S. (2013).** Plant cell wall deconstruction byascomycete fungi, *Ann. Rev. microbial.*, 67, 477-498.

**Gordon, R.E., Barnett, D.A., Handarhan, J.E. & Hor-Nay-Pang, C. (1974).** *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the nocardin strains, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24, 54-63.

**Green washing economy, energie-non-renouvelable-fossile**, En ligne sur :  
<https://greenwashingeconomy.com/energie-non-renouvelable-fossile/>

## H

**Hahn, V. (2023).** Potential of the enzyme laccase for the synthesis and derivatization of antimicrobial compounds. *Microbiology and Biotechnology*, 39:107, 27p.

**Hamed, J., Poorinmohammad, N. & Papiran, R. (2017).** Growth and life cycle of Actinobacteria. In J. Wink, F. Mohammadipanah. & J. Hamed (eds), *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (p. 29-50). Switzerland : springer.

**Hamed, J., Poorinmohammad, N. & Wink, J. (2017).** The Role of Actinobacteria in Biotechnology. In J. Wink, F. Mohammadipanah & J. Hamed (eds), *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (p. 269-328). Switzerland : springer.

**Hozzein, W.N. & Trujillo, M.E. (2012).** Genus I. *Nocardiopsis* Meyer 1976. In Goodfellow *et al.* (Editors). *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, vol. V. The Actinobacteria, part B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer. pp.1891–1906.

**Hu, L., Fang, X., Du, M., Luo, F. & Guo, S. (2020).** Hemicellulose - Based Polymers Processing and Application. *American Journal of Plant Sciences*, 11, p. 2066-2079.

## I

**Ibrahimi, M. (2020).** Extraction et caractérisation de nouveaux antibactériens produits par les actinobactéries prédatrices d'origine marine. Thèse de Doctorat ; Biochimie, Biologie moléculaire, Marrakech : Université Cadi Ayyad. 196p.

## K

**kamaouri, A., Topakas, E., Antonopoulou, I. & Christakopoulos, P. (2014).** Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 22p.

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

**Kontro, M.H., Yaradoddi, J.S., Banapurmath, N.R., Ganachari, S.V. & Hungund, B.S. (2021).** Biotechnological Importance of Actinomycetes. In J.S. Yaradoddi, M.H. Kontro, & S.V. Ganachari (eds), *Actinobacteria: Ecology, Diversity, Classification, and Extensive Applications* (p. 271-290). Singapore :Springer.

**Kumar, A., Gupta, R., Shrivastava, B., Khasa, Y.P. & Kuhad, R.C. (2012).** Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp . RCK-2010,

its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*. 74(3–4): 170–177.

## L

- Lamari, L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycètes, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou. 186p.
- Leadbeater, D. (2018).** Bioprospecting halotolerant lignocellulolytic enzymes from salt marsh ecosystems. Thèse de Doctorat ; Biology, University of York, 250p.
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A. (1970).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20, 435-443.
- Lee, L-H., Chan, K-G., Starch, J., Wellington, E.M.H. & Goh, B-H. (2018).** Editorial: The search for Biological Active Agent(s) From Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9:824, 4p.
- Lewin, G. R, Carlos, C., Chevrette, M. G., Horn, H. A, McDonald, B. R., Stankey, R. J. et al. (2016).** Evolution and Ecology of Actinobacteria and their Bioenergy Applications. *Annual Review Microbiology*, 70, p. 235-254.
- Li, Z., Liu, G. & Qu, Y. (2017).** Improvement of cellulolytic enzyme production and performance by rational designing expression regulatory network and enzyme system composition. *Bioresour. Technol.*, 245, 1718-1726.

## M

- Mathew, G.M., Sukumaran, R.K., Singhania, R.R. & Pandey, A. (2008).** Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67, p. 898-907.
- Matrawy, A.A., Khalil, A.I., Marey, H.S. & Embaby, A.M. (2021).** Use of Wheat Straw for Value-Added Product Xylanase by *Penicillium chrysogenum* Strain A3 DSM105774. *J Fungi (Basel)*. 7(9):696.
- Medouni-Haroune, L., Zaidi, F., Medouni-Adrar, S., Roussos, S., Azzouz, S., Desseaux, V. & Kecha, M. (2017).** Selective isolation and screening of actinobacteria strains producing lignocellulolytic enzymes using olive pomace as substrate, *Iranian J. Biotechnol.*, 15, 74-77.
- Meyer J. (1976).** *Nocardopsis* a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int J Syst Bacteriol.*, 26:487–493.
- Miller, G. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analy. Chem.*, 31(3), 426-428.
- Mohammadipanah, F. & Dehghani, M. (2017).** Classification and Taxonomy of Actinobacteria. In J. Wink, F. Mohammadipanah & J. Hamedi (eds), *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (p. 51-77). Switzerland : Springer.

**Mycroft, Z., Gomis, M., Mines, P., Law, P. & Bugg, T. D. (2015).** Biocatalytic conversion of lignin to aromatic dicarboxylic acids in *Rhodococcus jostii* RHA1 by re-routing aromatic degradation pathways, *Green Chem.*, 17, 4974-4979.

## P

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

## R

**Reynaud, R.P. (2017).** Implication de la subérine dans la régulation de l'activité cellulolytique des espèces de *Streptomyces* causant la gale commune de la pomme de terre. Thèse de Doctorat ; Biology, Sherbrooke, Québec, Canada : université de Sherbrooke, 178p.

**Rousset, P., Turner, I., Donnot, A. & Perré, P. (2006).** Choix d'un modèle de pyrolyse ménagée du bois à l'échelle de la microparticule en vue de la modélisation macroscopique. *Forest Science*, 63, p. 213-229.

## S

**Saidi, A. (2011).** La biomasse lignocellulosique et les bioénergies. p.4-5.

**Saker, R. (2015).** Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. Thèse de Doctorat ; Microbiology. Université de Ferhat Abbas Sétif 1, 244p.

**Salam, N., Jiao, J-Y., Zhang, X-T. & Li, W-J. (2020).** Update on the classification of higher ranks in the phylum *Actinobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 70, 1331-1355.

**Sanghvi, G. V., Koyani, R. D., & Rajput, K. S. (2010).** Thermostable xylanase production and partial purification by solid-state fermentation using agricultural waste wheat straw. *Mycology*, 1(2), 106-112.

**Sankaran, R., Markandan, K., Khoo, K.S., Cheng, C.K., Ashok Kumar, V., Deepanraj, B. et al. (2021).** The Expansion of Lignocellulose Biomass Conversion into Bioenergy Via Nano biotechnology. *Frontiers*, 3, 10p.

**Shahi, N., Hasan, A., Akhtar, S., Siddiqui, M.H., Sayeed, U. & Khan, M.K.A. (2016).** Xylanase: A promising enzyme. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(3), p. 334-339.

**Sharma, P. & Bajaj, B.K. (2005).** Production and partial characterization of alkali-tolerant xylanase from an alkalophilic *Streptomyces* sp. CD3. *Journal of Scientific & Industrial Research* 64: 688–697.

**Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species, *Int. J. Syst. Bact.*, 16(3), 313-340.

- Sierra, G. A. (1957).** simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates, *J. Microbiol. Serol.*, 23, 15-22.
- Singh, L.S. Mazumder, S. & Bora, T.C. (2009).** Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces nashii* strain A2D, *J. Myco. Med.*, 19, 225-233.
- Subramaniyan, S. & Prema P. (2002).** Biotechnology of microbial xylanase: enzymology, molecular biology and application. Biochemical processing division. 33-46.
- Suchita, N., Rup, L. & Kuhad, R., C. (2006).** Isolation of Three Xylanase-Producing Strains of Actinomycetes and Their Identification Using Molecular Methods, *Curr. microbiol.*, 53, 178-182.

## T

- Thoresen, M., Malgas, S., Mafa, M.S. & Plutschke, B.I. (2021).** Revisiting the Phenomenon of Cellulase Action : Not All Endo- and Exo-Cellulase Interactions Are Synergistic. *Catalysts*, 11, 13p.
- Tuncer, M., Ball, A.S., Rob, A. & Wilson, M.T. (1999).** Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25, *Enzym. Microb. Technol.*, 25, 38-47.
- Thongprajukaew, K., Choodum, A., Sa-E, B. and Hayee, U. (2014).** Smart phone: a popular device supports amylase activity assay in fisheries research. *Food Chem*, 163:87-91.

## V

- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F. et al. (2007).** Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolution History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, p. 495-548.

## W

- Williams, S.T., Goofellow, M. & Alderson, G. (1989).** Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriol.*, vol. 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds). Williams and Wilkins Co. pp. 2452-2492.
- Wink, J., Mohammadipanah, F. & Hamedi, J. (2017).** Biology and Biotechnology of Actinobacteria. Switzerland : *Springer*, 395p.

## Y

- Yang, S. Q., Yan, Q. J., Jiang, Z. Q., Li, L. T., Tian, H. M., & Wang, Y. Z. (2006).** High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource technology*, 97(15), 1794-1800.

**Yuan, M., Yu, Y., Li, H-R., Dong, N. & Zhang, X-H. (2014).** Phylogenetic Diversity and Biological Activity of Actinobacteria isolated from the Chukchi Shelf Marine Sediments in the Arctic Ocean. *Marine drugs*, 12, p. 1281-1297.

### Z

**Zeng, J., Singh, D., Laskar, D., Chen, S. (2013).** Degradation of native wheat straw lignin by *Streptomyces viridosporus* T7A, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 10, 165-174.

**Zerizer, H. (2014).** Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine. Thèse de Doctorat ; Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Constantine 1, 217p.

# Annexes

## **I. Matériel analytique**

- Agitateur magnétique chauffant.
- Agitateur-incubateur à 30° C.
- Autoclave à 120° C.
- Bain marie
- Balance analytique.
- Balance.
- Centrifugeuse à 8000 g.
- Étuve à 30° C.
- Spectrophotomètre.
- Vortex.

## **II. Milieux de culture d'isolement et d'identification des actinobactéries**

### **1. Milieu de revivification**

#### **1.1. Milieu Gausse**

Amidon ; 40g ; Agar : 40g ; KNO<sub>3</sub> : 2g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1g ; MgSO<sub>4</sub> : 1g ; Eau distillée : 2000 ml ; pH=7.

### **2. Milieux d'identification**

#### **2.1. Etude morphologique**

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

##### **2.1.1. Milieu ISP1**

Tryptone : 0,5g ; Extrait de levure : 0,3g ; Agar : 1,5g ; Eau distillée : 100ml ; PH=7,2.

##### **2.1.2. Milieu ISP2**

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



### **2.1.3. Milieu ISP3**

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

### **2.1.4. Milieu ISP4**

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

### **2.1.5. Milieu Glucose Yeast Extract-Agar (G.Y.E.A)**

Extrait de levure : 1g ; Glucose : 1g ; Agar : 1,8g ; Eau distillée : 100ml ; PH=6,8.

## **2.2. Etude physiologique**

### **2.2.1. Milieu ISP9**

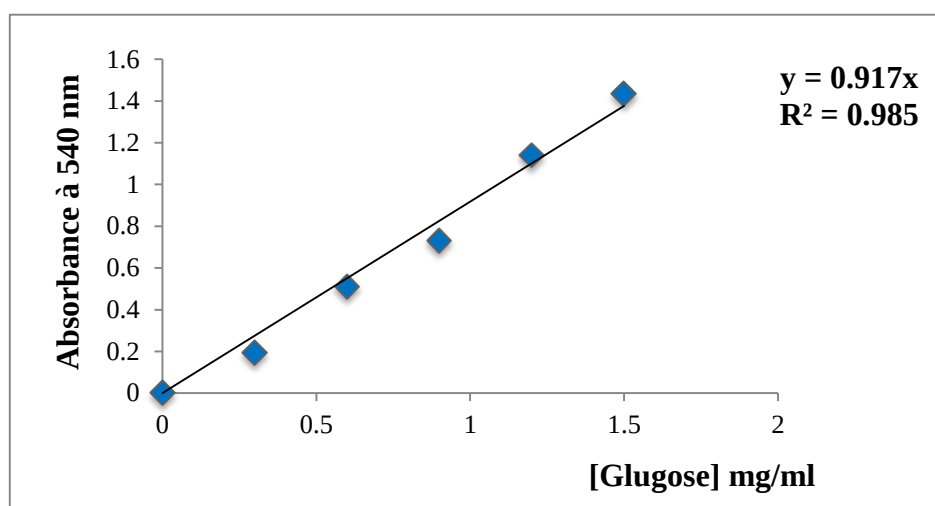
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 2.64g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 2.38g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 5.65g ; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : 1g ; Solution saline : 1ml ; Eau distillée : 1000ml ; Agar : 20g ; pH : 7.

### **Solution saline**

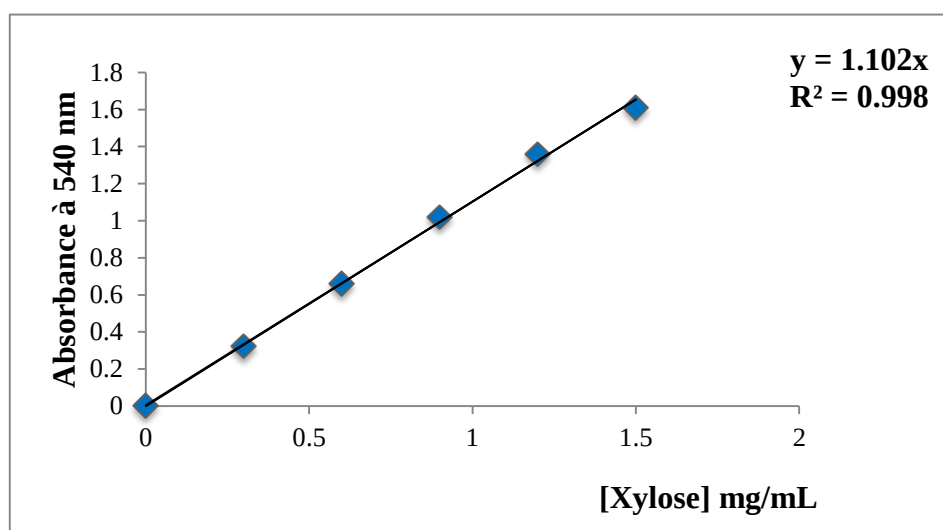
CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O : 0.064g ; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : 0.011g ; MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O : 0.079g ; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : 0.015g ; Eau distillée : 100ml.

### **Solution DNS**

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



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



**Figure 17 :** Courbe d'étalonnage du dosage de la xylose.

## Résumé

Huit souches d'actinobactéries isolées à partir d'un échantillon de sol forestier ont été soumises à un criblage qualitatif et quantitatif pour évaluer leur capacité à produire des enzymes lignocellulolytiques. La souche Z59 a été choisie comme meilleure souche productrice d'enzymes cellulases, xylanases et lignine peroxydases. Les caractéristiques morphologiques et physiologiques ont permis de rattacher la souche Z59 au genre *Nocardiopsis*. La capacité de cette souche à produire ces enzymes lignocellulolytiques à partir de quatre déchets agricoles comme substrats peu coûteux par fermentation submergée est étudiée. Les résultats ont montré l'efficacité de cette souche à produire des enzymes xylanases avec un taux élevé par rapport aux autres enzymes, où l'activité maximale a été enregistrée après 13 jours d'incubation en présence de paille de blé comme substrat. Les xylanases sont trouvées actives dans une gamme de pH allant de 3 à 10 et de température (40-90°C) avec des optima respectifs de 6 et 50°C. Les xylanases brutes sont moins stables à des pH compris entre 3 et 10 pendant 24h. L'activité xylanase est stable dans la gamme de température de 40 à 50°C pendant deux heures. Toutes ces caractéristiques mettent en évidence l'application potentielle de ces enzymes dans plusieurs domaines industriels dont le blanchiment de papier.

**Mots-clés :** Actinobactéries, criblage, cellulase, xylanase, laccase, lignine peroxydase, Caractérisation

## Abstract

Eight strains of actinobacteria isolated from a forest soil sample were subjected to qualitative and quantitative screening to evaluate their ability to produce lignocellulolytic enzymes. The Z59 strain was chosen as the best strain producing cellulase enzymes, xylanases and lignin peroxidases. The morphological and physiological characteristics made it possible to link the Z59 strain to the *Nocardiopsis* genus. The ability of this strain to produce these lignocellulolytic enzymes from four agricultural wastes as inexpensive substrates by submerged fermentation is investigated. The results showed the effectiveness of this strain in producing xylanase enzymes with a high rate compared to other enzymes, where the maximum activity was recorded after 13 days of incubation in the presence of wheat straw as a substrate. The xylanases are found active in a range of pH from 3 to 10 and temperature (40-90°C) with respective optima of 6 and 50°C. Crude xylanases are less stable at pHs between 3 and 10 for 24 hours. Xylanase activity is stable in the temperature range of 40 to 50°C for two hours. All these characteristics highlight the potential application of these enzymes in several industrial fields including paper bleaching.

**Keywords:** Actinobacteria, screening, cellulase, xylanase, laccase, lignin peroxidase, Characterization.

## ملخص

خضعت ثماني سلالات من البكتيريا الشعاعية المعزولة من عينة من تربة الغابات للفحص النوعي والكمي لتقييم قدرتها على إنتاج الإنزيمات المحللة للخلايا اللغينية. تم اختيار سلالة Z59 كأفضل سلالة منتجة لإنزيمات السيليولاز، الزيلائاز وبروكسيداز اللغينين. أتاحت الخصائص المورفولوجية والفسيولوجية ربط سلالة Z59 بجنس *Nocardiopsis*. تمت دراسة قدرة هذه السلالة على إنتاج هذه الإنزيمات المحللة للخلايا اللغينية من أربعة مخلفات زراعية كركائز غير مكلفة عن طريق التخمير المغمور. أظهرت النتائج فعالية هذه السلالة في إنتاج إنزيمات الزيلائاز بنسبة عالية مقارنة بالإنزيمات الأخرى، حيث تم تسجيل أقصى نشاط لها بعد 13 يوم من التحضين بوجود تبن القمح كركيزة، وقد وجدت إنزيمات الزيلائاز نشطة في نطاق واسع. درجة الحموضة من 3 إلى 10 ودرجة الحرارة (40-90 درجة مئوية) مع الأمثل على التوالي 6 و 50 درجة مئوية. تكون إنزيمات الزيلائاز الخام أقل استقراراً عند درجة الحموضة بين 3 و 10 لمدة 24 ساعة، ويكون نشاط الزيلائاز مستقر في نطاق درجات الحرارة من 40 إلى 50 درجة مئوية لمدة ساعتين. كل هذه الخصائص تسلط الضوء على إمكانية تطبيق هذه الإنزيمات في العديد من المجالات الصناعية بما في ذلك تبييض الورق.

**الكلمات المفتاحية :** البكتيريا الشعاعية، تحري، سيليولاز، زيلائاز، لأكاز، بروكسيداز اللغينين، التوصيف.