



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)

MEMOIRE

Présenté par

HAMNACHE Abdelillah

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

En Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Fondamentale

Thème

**Optimisation de la production de la cellulase par une souche
d'actinomycète**

Soutenu le : 24/06/2026, Devant le jury composé de :

Président	Mr BELYAGOUBI Larbi	Pr	Univ. de Tlemcen
Encadrant	Mme BOUBLENZ A Nesrine	MCA	Univ. de Tlemcen
Examinatrice	Mme BOUALI Waffa	Pr	Univ. de Tlemcen

Année Universitaire : 2025/2026

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,

À ma mère Nouria, pour son amour infini, sa tendresse inconditionnelle et tous les sacrifices qu'elle a consentis sans jamais compter. Elle a toujours été ma première source de motivation, mon refuge dans les moments difficiles et la lumière qui m'a guidé tout au long de mon parcours.

À mon père Ali, pour sa force, sa sagesse et ses conseils précieux. Il a toujours cru en moi et m'a appris la persévérance, la discipline et le sens des responsabilités.

À ma sœur Nesrine, pour son affection, sa compréhension et son aide précieuse, qui ont toujours été d'un grand réconfort.

À mes frères Aymen et Amir, pour leur innocence, leur joie de vivre et leur affection sincère, qui ont apporté de la douceur et de la motivation tout au long de ce parcours.

À tous mes amis, pour leur encouragement, leur soutien sincère et les beaux souvenirs que nous avons construits ensemble tout au long de cette période.

À toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ce travail, je leur exprime ma profonde gratitude.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier **Dieu** le tout puissant pour m'avoir donné la force, la patience et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon encadrante Madame **Boublenza Nesrine**, pour son encadrement exemplaire, sa sincérité dans le travail, son dévouement et sa passion pour la recherche scientifique. Son engagement constant, ses conseils avisés et son sérieux ont été une véritable source de motivation tout au long de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Mr **Belyagoubi Larbi** qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury, madame **Bouali Waffa** d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à l'ensemble de mes enseignants du département de biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubakr Belkaïd Tlemcen, pour la qualité de leur enseignement et leur contribution à ma formation académique

Liste des abréviations :

ARNr 16S	Acide ribonucléique ribosomique 16S
CAZy	Carbohydrate-Active enZymes
CBM	Carbohydrate-Binding Module
CCD	Composite Centrée (Central Composite Design)
CD	Domaine Catalytique
C °	Celsius Degré
Na Cl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
CMC	Carboxyméthylcellulose
DNS	Acide 3,5-Dinitrosalicylique
EC	Enzyme Commission
GH	Glycoside Hydrolases
HEC	Hydroxyéthylcellulose
IAA	Acide Indole-Acétique
LPMO	Lytic Polysaccharide Monooxygenases
MHA	Mueller-Hinton Agar
PF	Papier Filtre (Whatman N°1)
RPM	Rotation par minute
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
TSI	Triple Sugar Iron

Listes des figures

Figure 1: Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulant. (Anne van der Meij et al., 2017)	10
Figure 2: Mode d'action des différentes composantes du complexe cellulolytique lors de la dégradation de la cellulose. (Akhtar, N. et al 2016)	15
Figure 3: spectrophotomètre	22
Figure 4 : Aspect macroscopique des colonies	27
Figure 5: Observation microscopique des souches d'actinomycètes après coloration de Gram (×100).	28
Figure 6: Résultats des tests biochimiques	31
Figure 7: Résultats de test de cellulase (substrat cellulose HEC et Papier filtre)	32
Figure 8: Mise en évidence de l'activité cellulolytique par coloration au rouge Congo	33
Figure 9: Courbe d'étalonnage établie à partir du glucose	35
Figure 10: quantité de l'enzyme (U/ml/min) après l'ajout des sels	36

Listes des tableaux

Tableau 1: Classification des actinomycètes selon Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Goodfellow, 2015).....	8
Tableau 2: détermine les concentrations de glucose.....	22
Tableau 3: Origine et milieux d'isolement des trois souches d'actinomycètes utilisées dans cette étude.	26
Tableau 4: Résultats de la caractérisation biochimique.....	29
Tableau 5: représente l'absorbance des solution glucose	35

Table des matières

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	3
CHAPITRE 01 : Les Actinomycètes	4
1. Historique	5
2. Caractérisation d'actinomycète	5
.3 Classification d'actinomycète.....	6
3.1 Caractères morphologique	6
3.2 Caractères physiologiques	6
3.3 Caractères chimio-taxonomique.....	7
3.4 Caractères moléculaire	7
4. Distribution écologique des actinomycètes	8
.5 Cycle de vie.....	10
6. la place des actinomycètes en biotechnologie.....	11
CHAPITRE 02 : Les Cellulases	12
1. Nomenclature et classification	13
2. Cellulose.....	13
3. Structure	14
4. Mécanisme d'Action	15
.5 Origine Microbienne.....	16
6. Importance	16

Matériels et méthodes	18
1. Isolement des actinomycètes	19
2. Identification et caractérisation biochimique des souches	19
2.1 Etude micromorphologie	19
2.2 caractéristiques biochimiques	19
3. Recherche de l'activité cellulase	20
3.1 La recherche du meilleur substrat cellulosique	20
3.2 le test qualitatif de l'activité cellulase au rouge Congo	20
3.3 Le test quantitatif de l'activité cellulase par la méthode DNS.....	21
3.4 Le test quantitatif du papier filtre (la cellulase totale)	21
4 Préparation de la gamme d'étalonnage	22
5 La quantification de l'activité cellulase a différents pH.....	23
6 L'optimisation de l'activité cellulase par l'ajout des sels:	23
7 L'activité antimicrobienne	23
Résultats et discussion	25
1. Isolement des souches d'actinomycètes	26
2. Résultats micromorphologie	28
3. Résultats de la caractérisation biochimique	29
4. Le meilleur substrat cellulosique.....	32
5. Résultats de test qualitatif de l'activité cellulase.....	33
6. Résultats du dosage quantitatif de l'activité cellulase par la méthode DNS	33

7.	Résultat de test quantitatif du papier filtre (la cellulase totale)	34
8.	La gamme d'étalonnage	34
9.	La quantification de l'activité cellulase a différents pH.....	35
10.	L'optimisation de l'activité cellulase par l'ajout des sels:	36
11.	L'activité antimicrobienne	37
	Conclusion	38
	Références bibliographiques	41
	Annexes	48

Introduction

Introduction

la valorisation biotechnologique de la biomasse lignocellulosique s'impose comme une réponse incontournable aux défis environnementaux et économiques mondiaux. Dans un contexte marqué par la croissance démographique et l'intensification des activités humaines, l'accumulation des déchets organiques qu'il s'agisse de résidus agricoles, de sous-produits forestiers, de déchets verts urbains ou de rebuts de l'industrie du papier et du carton constitue une préoccupation de premier plan (**Karimi *et al.*, 2021 ; Nargesi *et al.*, 2023**). Ces matières riches en cellulose, hémicellulose et lignine, lorsqu'elles ne sont pas gérées durablement, engendrent des nuisances écologiques émissions de gaz à effet de serre lors de leur dégradation anaérobie ou incinération à l'air libre, lixiviation de composés organiques dans les sols et les eaux ainsi que des pertes économiques considérables liées à l'enfouissement ou au traitement thermique (**Osorio-González *et al.*, 2022**). Face à ce constat, la biodégradation et la bioremédiation se présentent comme des solutions durables, permettant non seulement d'éliminer ces polluants organiques mais aussi de les convertir en molécules d'intérêt, s'inscrivant ainsi dans une logique d'économie circulaire et de bioraffinerie (**Sharma *et al.*, 2023**)

Au cœur de ces processus de dégradation se trouvent les microorganismes, qui ont développé au cours de l'évolution des systèmes enzymatiques capables de rompre les liaisons chimiques complexes de la paroi végétale. Parmi ces acteurs microbiens, les actinomycètes occupent une place de choix. Ces bactéries filamenteuses Gram-positives, largement répandues dans les écosystèmes terrestres notamment les sols rhizosphériques, sont des agents clés du recyclage de la matière organique (**Waheeb *et al.*, 2024**). Ils sont des producteurs prodigieux d'un panel de biomolécules d'intérêt biotechnologique y compris les enzymes permettant le recyclage de la biomasse morte. Ces enzymes, comme les protéases, lipases, amylases, xylanases et cellulases, aident à décomposer les polymères complexes afin de les convertir en monomères réutilisables. (**Shaikh *et al.*, 2025**) en plus de leurs rôles dans la filière de la bioremédiation ; les actinobactéries supportent bien les conditions environnementales variées, elles peuvent être cultivées sur des déchets agricoles. Donc, ils sont des meilleurs candidats pour la fermentation industrielle et la production à grande échelle d'une variété d'enzymes (**Kadoguchi *et al.*, 2024 ; Gaete *et al.*, 2025**)

Parmi les enzymes d'intérêt majeur produites par les actinomycètes figure la cellulase, un complexe enzymatique jouant un rôle central dans l'hydrolyse de la cellulose. (**Pappu *et al.*, 2026**) ainsi dans la biodégradation naturelle des déchets cellulotiques, qu'il s'agisse de

Introduction

résidus agricoles (pailles, tiges, rafles de maïs), de déchets papetiers ou cartonnés, ou encore de fractions ligneuses fines. Sur le plan industriel, la demande en cellulases ne cesse de croître : elles sont utilisées dans la production de bioéthanol de deuxième génération, dans l'industrie textile pour le biopolissage et le biostoning, dans la fabrication de détergents, dans l'amélioration de la digestibilité des aliments pour animaux, ainsi que dans les procédés de pâte à papier et de blanchiment (**Singh *et al.*, 2021 ; Ilic *et al.*, 2023**)

C'est dans ce contexte que notre étude a été menée : l'objectif de notre recherche est l'optimisation de la production de la cellulase à partir d'une souche d'actinomycète. Pour ce faire, ce manuscrit s'articule autour d'une synthèse bibliographique scindée en deux chapitres, le premier chapitre présentera les actinomycètes en tant qu'agents de bioremédiation et producteurs d'enzymes lignocellulolytiques ; le deuxième chapitre détaillera les cellulases microbiennes, leurs mécanismes catalytiques et leurs applications environnementales suivie par une partie Matériel et Méthodes dans laquelle nous avons présenté la méthodologie adoptée dans cette investigation, ensuite la partie Résultats comporte les données collectées dans cette recherche, suivie par une partie Discussion qui met l'accent sur une éventuelle concordance entre nos résultats et ceux des études antérieures de la littérature

Synthèse bibliographique

CHAPITRE 01 : Les

Actinomycètes

1. Historique

L'appréciation des actinomycètes a suivi son cours progressivement depuis la fin du XIXe siècle. Conformément à la classification temporelle mise en place par Selman Waksman en 1959, il est possible de dégager quatre grandes étapes de leur histoire. L'émergence des actinomycètes a eu lieu de 1870 à 1900, en tant que germes en pathologie animale et humaine : en 1875, Ferdinand Cohn en fait la description, avant Carl Otto Harz qui en 1878 identifie un germe parasite de la mâchoire bovine et le baptise *Actinomyces bovis* (Williams, 1990) . Par la suite, les actinomycètes du sol ont été explorés grâce aux efforts de Kreisky, Cohn, Waksman et Curtis et ceci durant la période qui s'étale entre 1900 -1919 (Mariat & Sebald, 1989) puis, entre 1919 et 1940, les aspects biologiques de ces microbes ont été approfondis sous la direction de Waksman, Lieske et autres chercheurs.(ALLIOUCH-KERBOUA, 2017) La quatrième période, ouverte en 1940, marque l'entrée des actinomycètes dans l'ère des antibiotiques : Selman Waksman et ses collaborateurs montrent que ces bactéries filamenteuses sont des productrices prolifiques de molécules antimicrobiennes, inaugurant ainsi l'« âge d'or » des antibiotiques (1950-1970) au cours duquel la plupart des grandes classes d'antibiotiques seront découvertes à partir d'actinomycète. (De Simeis & Serra, 2021)

2. Caractérisation d'actinomycète

Les actinomycètes sont classés parmi les bactéries filamenteuses uniques qui combinent les caractéristiques morphologiques des champignons et les caractéristiques structurelles des bactéries procaryotes(Devanshi *et al.*, 2022)Les actinomycètes sont généralement connus comme des bactéries filamenteuses Gram-positives aérobies appartenant à l'ordre des Actinomycetales. (Ngamcharungchit *et al.*, 2023) Elle se distingue par un génome linéaire de grande taille présentant une teneur élevée en bases azotées (teneur en G+C) pouvant atteindre 70 %, ce qui renforce sa stabilité génétique (Selim *et al.*, 2021) Elles se développent sous la forme d'un réseau de filaments ramifiés (hyphes). Elles sont décrites comme des bactéries hétérotrophes, (Meenakshi *et al.*, 2024) Sa structure cellulaire, associée à une grande flexibilité métabolique, lui confère une capacité exceptionnelle à survivre et à se développer dans des environnements hostiles caractérisés par une salinité élevée, une forte alcalinité, un stress hydrique et des variations de température. Elle se distingue également par sa capacité à former des biofilms complexes qui contribuent à sa protection et à la régulation de sa réponse aux contraintes environnementales. (Farda *et al.*, 2022)

3. Classification d'actinomycète

L'organisation des actinomycètes a considérablement changé. De classification initiale fondée sur la seule observation morphologique et physiologique, l'étude de ces micro-organismes est dorénavant basée sur une approche polyphasique. Cette dernière intègre l'utilisation d'une chimiotaxonomie ainsi que des données moléculaires afin de constituer un tableau global. L'approche holistique s'avère nécessaire pour la détermination des genres et espèces des actinomycètes qui sont en constante évolution. **(Karthik, 2024)**

3.1 Caractères morphologique

La morphologie des actinobactérie est caractérisée par sa variabilité allant de la forme la plus simple celle de la forme coccoïde chez le genre *Rhodococcus*, ou la forme bacille chez le genre *Mycobactérium* et *Corynebacterium* jusqu'à la forme filamenteuse **(Miyadoh & Gakkai, 1997)**, la présence chez les actinomycètes d'un mycélium est le premier trait permettant de les distinguer des autres bactéries, . La plupart des actinomycètes filamenteux portent deux type de mycélium un mycélium incrusté dans le milieu de culture est appelé le mycélium du substrat (ou végétatif) et le deuxième qui se développe au dessus de la gélose est dit aérien La forme et l'organisation des sporophores qui proviennent du mycélium aérien jouent un rôle important dans la classification et présentent une grande variabilité selon les espèces : en chaîne chez *Streptomyces*, isolés chez *Micromonospora*. **(Traxler & Rozen, 2022)**

3.2 Caractères physiologiques

Le test physiologique et biochimique est important dans l'identification des espèces. Il implique la mesure de la capacité des isolats à se développer en présence d'un certain nombre de conditions et de substrats diversifiés. **(Abdelrahman et al., 2025)** Il faut noter que les actinomycètes ont une préférence particulière pour l'habitat neutre avec le pH allant de 6 à 8 et la température de 25 à 30° C. Il faut cependant souligner que leurs possibilités sont variées, puisque certains types d'actinomycètes ont la capacité de pousser aux pH compris entre 3 et 13, à une température de 4 à 60° C ainsi qu'à 32 % de NaCl. **(Nazari et al., 2022)**

3.3 Caractères chimio-taxonomique

La chimiotaxonomie est un pilier fondamental de la systématique moderne des actinomycètes qui sert de base pour la détermination des genres et des familles. La base de la chimiotaxonomie est constituée par l'étude des composés spécifiques aux cellules. Les principales substances chimiotaxonomiques comprennent le peptidoglycane, les sucres de la paroi, Les acides gras, Les lipides (Law *et al.*, 2023., Coelho *et al.*, 2026)

3.4 Caractères moléculaire

En 1970 Carl Woese et ses collaborateurs utilisent pour la première fois la séquence du gène ARNr 16S comme un marqueur moléculaire dans l'étude de la classification des procaryote (Woese & Fox, 1977) le gène codant pour l'ARNr 16S portent à la fois une partie conservée et une autre variable permettant d'identifier à l'échelle de l'espèce les actinobactéries, d'autres gènes ont été récemment exploré dans la classification des bactéries, ces gènes sont dites de constitution (housekeeping gene) dont leur fonction est indispensable à la survie des bactéries (Glaeser & Kampfer, 2015) en plus de l'identification moléculaire des espèces bactérienne, ces gènes horloges permettent de retracer l'histoire ancestrale des bactéries afin de mener une étude phylogénétique (Mawang *et al.*, 2021., Xu *et al.*, 2024)

sur la base du séquençage du gène de l'ARNr 16S, les Actinomycètes sont classés comme indiqué dans le tableau suivant :

Tableau 1: Classification des actinomycètes selon Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Goodfellow, 2015)

Domaine	Bacteria		
Phylum	<i>Actinobacteria</i>		
Classe	<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Coriobacteria</i>
	<i>Nitriliruptoria</i>	<i>Rubrobacteria</i>	<i>Thermoleophilia</i>
Ordre	<i>-Streptomycetales, Corynebacteriales, Micrococcales</i> + plusieurs autres ordre		
Famille	<i>Streptomycetaceae, Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Pseudonocardiaceae</i> + plusieurs autres familles		
Genre	<i>Streptomyces, Mycobacterium, Nocardia, Pseudonocardia, Actinomyces</i> + plusieurs autres genres		

4. Distribution écologique des actinomycètes

les actinobactéries sont omniprésentes, elles peuvent habiter plusieurs niches écologiques: le sol, l'eau de mer ou douce, les mangroves, les zones désertiques ou vivant en symbiose avec des organismes vivant (Ngamcharungchit *et al.*, 2023)

Elles démontrent une capacité exceptionnelle d'adaptation à diverses conditions environnementales, ce qui leur a permis une large dispersion à travers les écosystèmes

terrestres et aquatiques. Cette adaptabilité a conduit à l'évolution d'un potentiel biosynthétique considérable, leur permettant de produire une vaste gamme de métabolites secondaires jouant des rôles essentiels dans le recyclage des nutriments et la défense. La distribution environnementale de ces organismes peut être classée, sur la base des efforts récents d'isolement à l'échelle mondiale, en aires principales suivantes :

Les écosystèmes terrestres : Le sol terrestre reste la source historique et principale d'isolement des actinomycètes, et demeure aujourd'hui un « réservoir actif » de diversité microbienne .La distribution englobe la rhizosphère, les sols rouges, les sols désertiques, les sols des chaînes montagneuses et les sols forestiers. La famille *Streptomyetaceae* y domine de manière absolue. **(Jose *et al.*, 2021)**

Les milieux marins et côtiers : Elles se présentent dans les sédiments fluviaux, les sables des plages, les mangroves, et vivent en associations symbiotiques avec des organismes marins tels que les éponges et les récifs coralliens, ce qui leur confère une capacité à produire des métabolites secondaires uniques, absents chez leurs homologues terrestres. **(Setiawati & Yusan, 2022)**

Associations des endophytes avec les plantes : Certaines souches résident au sein des racines, des tiges ainsi que des feuilles de la plante, créant une relation de symbiose offrant une protection directe contre les pathogènes. **(Silva *et al.*, 2022)**

Les milieux extrêmes : Actuellement les nouvelles recherches se sont orientées vers l'isolement des actinomycètes à partir des endroits peu exploré et dont les conditions de vie deviennent défavorable , ces endroits extrêmes peuvent abriter une diversité microbienne peu exploitée y compris les sources hydrothermales , les zones benthiques et les grottes **(Belyagoubi *et al.*, 2018., Rui *et al.*, 2025)**, Il s'avère qu'il y a des perspectives intéressantes dans ces milieux moins connus et exploités, des ressources inexploitées où l'on peut trouver des actinomycètes nouveaux et rares. Il apparaît aussi que l'on trouve, dans ces niches insoupçonnées, des diversités bactériennes importantes, dotées d'un arsenal thérapeutique innovant **(Jose *et al.*, 2021)** et ceci est dû à leur adaptation métabolique incroyable, rendant possible leur survie et fonctionnement dans des conditions climatiques inhabituelles de température ou de pH. **(Helmi, 2025)**

6. la place des actinomycètes en biotechnologie

Les actinobactéries sont des producteurs prodigieux de molécules bioactives. Parmi les 23.000 biomolécules extraites à partir des microorganismes, 32% dérivent des actinomycètes **(Chaudhary *et al.*, 2024 ; Dhahbi *et al.*, 2025)**

En effet, le potentiel biotechnologique de ces microorganismes ne se résume plus uniquement au bénéfice tiré de leurs propriétés naturelles, mais il s'est imposé particulièrement à l'heure de la biologie synthétique et de la bio-ingénierie métabolique. En effet, les actinomycètes, dont l'espèce *Streptomyces* est notamment utilisée, servent actuellement de « cell factories » visant à fabriquer de nombreux produits industriels. Parmi ces derniers se trouve l'utilisation pharmacologique pour la fabrication d'antibiotiques de large spectre ou encore d'anticancéreux, qui ont été génétiquement modifiés pour être plus efficaces, l'utilisation agricole pour fabriquer des insecticides biologiques tels que le spinosad ainsi que des produits de protection, et aussi l'utilisation alimentaire afin de fabriquer des additifs alimentaires. **(Breitling *et al.*, 2021)** D'ailleurs, elles forment également une source biologique importante pour les enzymes industrielles durables. Ils sont importants dans le domaine pharmaceutique (en particulier la fabrication de l'enzyme L-asparaginase pour la traitement du cancer), ainsi qu'une utilisation accrue pour les aliments, nettoyage et traitement des déchets organiques. Le principal avantage de ces micro-organismes est qu'ils ont la possibilité de sécréter une variété d'enzymes de dégradation comme protéases, amylases et celluloses. **(Swarna & Gnanadoss, 2020)** Ils ont également leur importance dans le domaine de la biotechnologie agricole écologique. En tant qu'agent biologique potentiel pour la protection des cultures, elle remplace efficacement les fongicides chimiques toxiques par son effet antagoniste intense sur des champignons pathogènes tels que *Fusarium*. Par ailleurs, elle joue un rôle significatif en tant que bio-fertilisant, en produisant des substances phytohormonaux comme l'acide indol-acétique (IAA) et des cédrophores. **(Pérez-Corral *et al.*, 2022)**

Avec les progrès fulgurants des sciences « omiques » et de l'ingénierie métabolique, les actinomycètes sont désormais considérés comme des « bio-architectes » dans les écosystèmes synthétiques du futur ; elles sont en effet associées aux technologies d'intelligence artificielle et à l'édition génomique via CRISPR/Cas9 pour concevoir des souches intelligentes capables de fonctionner dans des conditions extrêmes et de traiter les polluants émergents tels que les résidus de médicaments et de produits cosmétiques. Cette évolution fait des actinomycètes la pierre angulaire de la construction d'une bioéconomie durable alliant la restauration des ressources et la protection de la santé publique. **(Hashim *et al.*, 2026)**

CHAPITRE 02 : Les Cellulases

1. Nomenclature et classification

Le noms des cellulases est basé sur deux classifications qui s'entrelacent parfaitement; c'est-à-dire la classification fondamentalement basée sur leurs fonctions, qui est formulée par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB), ainsi que la classification structurale, qui est mise en place dans la base de données CAZy (Carbohydrate-Active enZymes).

En termes de fonctionnalité, le processus complet de dégradation de la cellulose implique l'utilisation combinée de trois grands types d'enzymes :

-Les endoglucanases (EC 3.2.1.4) : Elles effectuent une hydrolyse aléatoire des liaisons glycosidiques β -1,4 dans la chaîne cellulose, créant ainsi de nouveaux sites terminaux.

-Exoglucanases ou cellobiohydrolases : Ces enzymes opèrent au niveau du site terminal pour produire du cellobiose. Ce type d'enzyme se subdivise en deux formes principales :

La cellulose 1,4- β -cellobiosidase (extrémité non réductrice) (EC 3.2.1.91).

La cellulose 1,4- β -cellobiosidase (extrémité réductrice) (EC 3.2.1.176) (Co & Hug, 2020)

-Les β -glucosidases (EC 3.2.1.21) : Elles hydrolysent le cellobiose et les courtes chaînes d'oligosaccharides en molécules de glucose (Sutaoney *et al.*, 2024).

La classification fonctionnelle est complétée par une nomenclature structurale basée sur les similarités de séquences d'acides aminés, regroupée dans la base de données CAZy. Cette base catégorise les enzymes actives sur les glucides en plusieurs familles, dont les Glycoside Hydrolases (GH). Selon cette base, les cellulases sont réparties dans au moins 16 familles de GH, notamment les familles GH5, GH6, GH7, GH8, GH9, GH12, GH44, GH45, GH48, GH51, GH74 et GH124 (Froidurot & Julliand, 2022).

2. Cellulose

la cellulose est un polymère lineaires saccharidiques, composés d'une chaîne répétitive d'un nombre de molécules de D-glucose, dont le formule général est $(C_6H_{10}O_5)_n$. Celles-ci sont liées entre elles par des liens glycosidiques de type β -(1 $\rightarrow$ 4) (Marinho, 2025)

La cellulose est principalement extraite de la biomasse lignocellulosique, qui représente la source renouvelable de carbone la plus importante. Les plantes ligneuses (bois de résineux et de feuillus) et les plantes non ligneuses (fibres libériennes, graminées) en sont les gisements traditionnels (**Abdeshahian et al., 2020**)

La dégradation enzymatique de la cellulose est assurée par les cellulases, un ensemble d'hydrolases qui rompent les liaisons β -(1 $\rightarrow$ 4) au sein de ce polymère. (**Zadorozhny et al., 2025**)

Le système complet de dégradation cellulosique est basé sur trois activités complémentaires: les endoglucanases (EC 3.2.1.4), les cellobiohydrolases ou exoglucanases (EC 3.2.1.91), les β -glucosidases (EC 3.2.1.21). Ces enzymes coopèrent de manière synergique afin de vaincre la récalcitrance du substrat à structure cristalline. (**Stankova et al., 2025**)

Parmi les dérivés cellulosiques hydrosolubles, la carboxyméthylcellulose (CMC) et l'hydroxyéthylcellulose (HEC) sont largement utilisés. La CMC est obtenue par réaction de la cellulose avec l'acide monochloroacétique en milieu alcalin, ce qui la rend soluble dans l'eau ; elle est utilisée comme épaississant, stabilisant et agent de rétention d'eau (**Panchan et al., 2021**). L'HEC résulte de l'éthoxylation de la cellulose (oxyde d'éthylène) ; ses groupements hydroxyéthyles lui confèrent une bonne solubilité et une stabilité vis-à-vis des sels. Elle sert d'épaississant, d'agent de suspension et de liant dans les peintures, détergents et cosmétiques. (**Noreen et al., 2020**)

3. Structure

L'architecture moléculaire des cellulases reflète leur adaptation à un substrat insoluble et récalcitrant. La plupart des cellulases fongiques et bactériennes libres présentent une organisation modulaire bimodulaire : un domaine catalytique (CD) relié par un linker flexible, souvent riche en résidus glycosylés, à un module de liaison aux glucides (carbohydrate-binding module, CBM) (**Tuli & Kuila, 2021**). Le CD, dont le repliement varie selon la famille GH (tonneau (β/α)₈ pour GH 5 et GH 6, β -sandwich pour GH 7, etc.), abrite le site actif et détermine le mode d'action (endo/exo) ainsi que la stéréochimie de la réaction (inversion ou rétention). Le CBM, classé en plus de 80 familles, assure l'adsorption spécifique et réversible de l'enzyme sur la cellulose cristalline ou amorphe, augmentant la concentration locale de CD à l'interface et facilitant le décrochage processif des chaînes

(Sidar *et al.*, 2020). Certaines cellulases sont même trimodulaires et possèdent un second CBM ou un domaine de fonction inconnue.

Une organisation supramoléculaire plus élaborée se rencontre chez les bactéries anaérobies telles que *Clostridium thermocellum* ou *Ruminococcus spp*, qui assemble leurs cellulases en cellulosomes. Dans ces complexes multi-enzymatiques, les enzymes sont ancrées par des interactions cohésine-dockérine à une protéine d'échafaudage (scaffoldine) elle-même porteuse d'un CBM, ce qui permet une action synergique très efficace sur la cellulose native (Sidar *et al.*, 2020 ; Tuli & Kuila, 2021)

4. Mécanisme d'Action

La dégradation enzymatique de la cellulose repose sur une combinaison de mécanismes hydrolytiques et oxydatifs. Les cellulases hydrolytiques catalysent le clivage de la liaison β -1,4-glycosidique via un mécanisme acide-base assisté par deux résidus catalytiques (généralement un acide glutamique et un aspartate), qui peut être de type inverseur (anométrie du produit libéré opposée à celle de la liaison scindée) ou rétenteur (même anométrie) selon la famille GH (You *et al.*, 2023)

L'efficacité du système cellulolytique dépend de la synergie entre les différentes classes d'enzymes. L'endo-exo-synergie décrit la coopération entre les endoglucanases, qui créent de nouvelles extrémités de chaînes, et les cellobiohydrolases, qui attaquent ces extrémités. La synergie exo-exo implique la collaboration de cellobiohydrolases agissant sur les extrémités réductrices et non réductrices. Enfin, la levée de l'inhibition par le cellobiose est assurée par les β -glucosidases (Rai *et al.*, 2023)

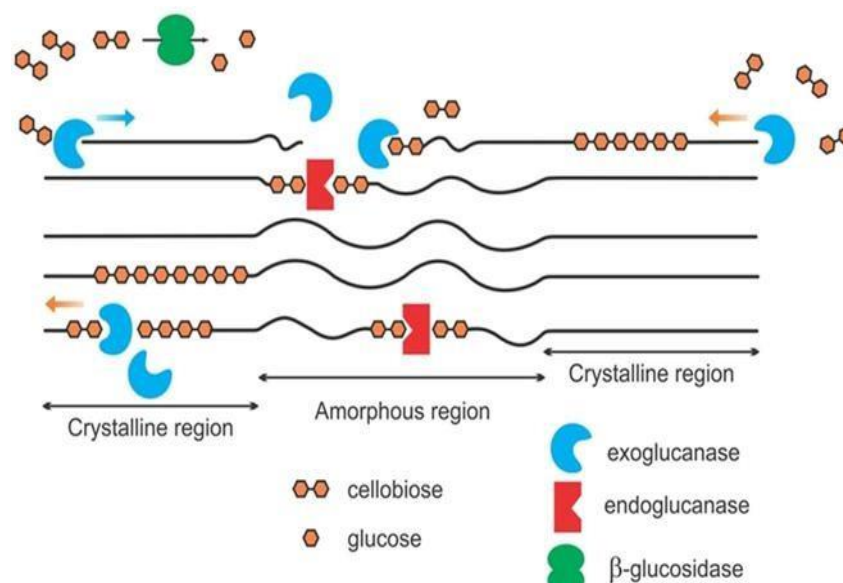


Figure 2: Mode d'action des différentes composantes du complexe cellulolytique lors de la dégradation de la cellulose.
(Akhtar, N. et al 2016)

Un second mécanisme, découvert plus récemment, fait intervenir les LPMOs. Ces enzymes dépendantes du cuivre oxydent le carbone C 1 ou C 4 de la liaison glycosidique, introduisant une coupure dans la chaîne et rendant la cellulose plus accessible aux hydrolases. L'action des LPMOs requiert un donneur d'électrons (par exemple l'acide ascorbique ou la lignine) et du dioxygène ou du peroxyde d'hydrogène (**Sukharnikov & Alper, 2020**)

5. Origine Microbienne

La production naturelle de cellulases est un trait largement distribué dans le monde microbien. Les levures filamenteuses ascomycètes tels que (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp*) sont notables pour leur capacité à produire de grandes quantités d'enzymes dans leur environnement de croissance. Notamment, *T. reesei*, après des années de sélection génétique avec l'aide de mutations et d'édérations génomiques, a acquis la notoriété de la plus grande source de cellulase commercialisée. (**Mahima et al., 2026**) Les champignons anaérobies du rumen (Neocallimastigomycota) ont également suscité un intérêt croissant car ils produisent des cellulosomes fongiques et des CAZymes très actives (**Thapa et al., 2020**).

Chez les bactéries, les cellulases sont produites aussi bien par des aérobies (*Cellulomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*) que par des anaérobies (*Clostridium thermocellum*, *Acetivibrio cellulolyticus*). Les anaérobies adoptent souvent la stratégie du cellulosome, tandis que les aérobies sécrètent des enzymes libres agissant en synergie (**Thapa et al., 2020**) Les archées et les bactéries extrêmophiles (thermophiles, alcalophiles, halophiles) constituent un réservoir de cellulases adaptées aux conditions drastiques des procédés industriels (températures > 70 °C, pH alcalin, salinité élevée), ce qui réduit les risques de contamination et améliore la solubilité du substrat (**Sharma et al., 2023 ; Mohanta et al., 2023**).

6. Importance

L'importance de la cellulase dépasse largement le cadre de la recherche fondamentale et touche aujourd'hui de nombreux secteurs stratégiques de la bioéconomie .

Bioénergie : La conversion de la biomasse lignocellulosique en sucres fermentescibles pour la production de bioéthanol de deuxième génération représente le débouché le plus étudié. Le

coût des cellulases demeure un goulot d'étranglement économique majeur ; il a cependant été réduit de plusieurs ordres de grandeur grâce à l'amélioration des souches productrices et à la mise au point de formulations enzymatiques à activité LPMO renforcée (**Fang *et al.*, 2026**).

Industrie textile : Les cellulases neutres ou alcalines sont employées pour le biopolissage du coton et le délavage des jeans (biostoning), où elles éliminent les microfibrilles de surface et confèrent un aspect vieilli sans recourir aux abrasifs chimiques (**Borthakur *et al.*, 2024**)

Industrie papetière et alimentaire : Dans le secteur papetier, les cellulases facilitent le désencrage et le raffinage de la pâte. En agroalimentaire, elles améliorent le rendement en jus et la clarification des boissons, réduisent la viscosité des moûts et augmentent la digestibilité des fibres dans l'alimentation animale (**Sutaoney *et al.*, 2024**).

Bioremédiation et valorisation des déchets : L'emploi de cellulases pour hydrolyser les résidus agricoles et les déchets de transformation alimentaire s'inscrit dans une logique de bioraffinerie circulaire, où les hydrolysats sont convertis en bioplastiques, en acides organiques ou en biogaz (**Hussain *et al.*, 2025**)

Matériels et méthodes

1. Isolement des actinomycètes

Les isolats d'actinomycètes ayant servi à cette étude ont été procurés par Mme BOUBLENZA Nesrine, ces souches ont été prélevés à partir des sédiments marins (juin 2017) et conservées dans le glycérol (à 20%), la revivification de ces bactéries a été réalisée sur milieu gélose de Gausse (la composition, voir annexe 1) par la suite les boîtes de pétri ont été incubées pendant 2 à 3 semaines à 30°C jusqu'à l'apparitions des colonies bactériennes.

2. Identification et caractérisation biochimique des souches

2.1 Etude micromorphologie

L'analyse microscopique en micromorphologie a été réalisée par la technique de coloration de Gram par microscope optique au grossissement d'immersion, La coloration de Gram est une technique différentielle classant les bactéries dans deux groupes : les Gram négatif et Gram positif qui est une propriété des actinomycètes. La réaction de coloration de Gram s'appuie sur les différences structurales et chimiques des parois cellulaires des bactéries. Après fixation sur une lame des bactéries, on utilise successivement le violet de gentiane (cristal violet), ensuite le frottis bactérien a été inondé par un mordant (Iodofix ou lugol), cette étape est suivie par une décoloration par l'alcool et une deuxième coloration a été appliquée par la safranine (Adams, 1975).

2.2 caractéristiques biochimiques

_ **Utilisation du citrate comme seule source de carbone:** ce test a été entrepris sur le milieu citrate de Simmons l'utilisation du citrate par la bactérie est révélée par le virage du couleur du milieu du vert au bleu (Renaud, 2000).

_ **La fermentation du glucose, lactose et saccharose:** l'aptitude des souches actinomycétales à fermenter les trois sucres glucose, lactose et saccharose a été appréciée sur le milieu TSI (Triple Sugar Iron agar) d'autres traits peuvent être révélés sur ce même milieu dont la production de gaz et la production de H₂S qui se manifeste par un noircissement dans la partie inférieure du tube. les tubes à essais dont leurs culot a viré vers le jaune est le résultat d'une fermentation du glucose, tandis que le virage du couleur de la pente est le résultat positif de la fermentation du lactose et saccharose (Lehman, 2005)

Matériels et Méthodes

_ **Action sur le lait écrémé** : la coagulation ou la peptonisation du lait écrémé a été appréciée sur des tubes contenant 10 ml du lait écrémé stérile, la lecture a été réalisée après une incubation des tubes ensemencés par les isolats d'actinomycètes pendant 7 à 14 jours à 30°C. (Belyagoubi,2014).

_ **Recherche de catalase** : l'activité de la catalase a été recherchée selon le protocole de **Zinendine (2004)**, de ce fait , sur une lame propre une goutte de l'eau oxygénée H_2O_2 a été déposée sur laquelle une colonie bactérienne a été solubilisée, une activité cellulase positive se manifeste par une effervescence tandis qu'une absence de dégagement des bulles d'air est le reflet d'une activité catalase négative

3. Recherche de l'activité cellulase

3.1 La recherche du meilleur substrat cellulosique

L'évaluation du potentiel cellulolytique des souches d'actinomycètes isolées a été réalisée sur différents substrats de cellulose: papier filtre (papier Whatman N1) , papier filtre en poudre, le coton et l'hydroxyéthylcellulose sur deux milieux de culture de composition différente , milieu 1 (source de cellulose: 20g, $K_2H_2PO_4$: 2g, $(NH_4)SO_2$: 2g, $MgSO_4$: 0.5g , Pepton: 0.5g , $COCL_2$: 5.5mg , $FeSO_4$: 7.5mg , $MnSO_4$: 2.5mg , $ZnSO_4$: 3.56mg) (**Shi et al, 2023**), milieu 2 (source de cellulose 1g, Na_2HPO_4 2,5 g, KH_2PO_4 1,5 g, peptone 2,5 g, extrait de levure 0,5 g, 1ml de solution d'oligoélément (**Sharker et al, 2023**))

Après une période d'incubation de 7 jours à 30 °C, l'activité cellulolytique des cultures d'actinomycètes inoculées a été évaluée. Les isolats d'actinomycètes ayant subi une meilleure croissance ont été sélectionnés pour le test préliminaire de l'activité cellulase.

3.2 le test qualitatif de l'activité cellulase au rouge Congo

Les boîtes de culture qui ont prouvé une meilleure croissance sur l'un des trois substrats testés ont été investiguées pour l'hydrolyse de cellulose ou de son dérivée par la méthode classique au rouge Congo (**Teather & Wood, 1982**), de ce fait, les cultures actinomycétales ont été inondées par une solution de rouge Congo à 1% (voir annexes 2) pendant 15 à 20 minutes, l'excès du colorant a été versé, par la suite un lavage a été réalisé par une solution de NaOH (1M) pendant 15 minutes , une activité cellulase positive se révèle par une zone claire autour des colonies

3.3 Le test quantitatif de l'activité cellulase par la méthode DNS

Le substrat de cellulose et le milieu de culture qui ont favorisé une bonne croissance d'actinomycètes ont été choisis pour évaluer la quantité de cellulase produite par la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS) (**Ghose, 1987**).

Des cultures en bouillon de 7 jours des souches d'actinobactéries ont été centrifugées à une vitesse maximale (3900 rpm) pendant une heure, le surnageant récupéré a servi d'extrait enzymatique

Pour quantifier la cellulase, un mélange réactionnel a été préparé comme suit : 0,5 ml de l'extrait enzymatique le surnageant a été incubé avec 0,5 ml de la solution de substrat d'HEC (à 1%) à 50°C pendant 30 minutes, 3 mL du réactif DNS ont été ajoutés au mélange réactionnel et incubés cette fois-ci à 100°C pendant 5 minutes, la lecture de l'absorbance a été affectuée par la technique de spectrophotométrie à une longueur d'onde de 540 nm sur microplaque de 96 puits à l'aide d'un lecteur de microplaque modèle UVM 340 de la société ASYS Hitech GmbH

Une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme capable de libérer une micromole d'équivalent glucose par minute et par millilitre, dans des conditions optimales de température (50°C) et de pH (4,8) . La quantité de l'enzyme en unités par millilitre (U/ml) a été déterminé selon la formule suivante :

Enzyme (U/ml) = quantité de glucose (mg)/ 0,18016×volume de l'extrait enzymatique × temps deréaction (**Ghose, 1987**)

la solution de blanc a subi le même traitement à l'exception de l'ajout de l'extrait enzymatique, les mesures ont été donné en triplicata .

3.4 Le test quantitatif du papier filtre (la cellulase totale)

La dégradation du papier filtre est estimée selon la méthode à l'acide dinitrosalicylique (DNS) (**Ghose, 1987**). Des bouillons de papier filtre ont été filtrés et centrifugés à 3900 tr/min durant une heure. Le surnageant était prélevé pour réaliser un extrait enzymatique.

Ensuite, on procédait à la préparation de la réaction à partir des composants suivants : 0,5 mL de surnageant étaient mélangés avec 2 mL de tampon citrate (pH 4,8) (**Miller, 1959**), ainsi que 2,5 mg de papier filtre Whatman (**Ghose, 1987**). On réalisait la réaction pendant 60 min à

Matériels et Méthodes

une température de 50 °C. Après l'incubation, 3 mL de réactif DNS étaient ajoutés aux tubes, qui avaient été chauffés pendant 5 minutes à 100 °C.

Mesure de l'absorbance de l'extrait dans les microplaques 96 puits consistait à prélever 200µL de la solution et réaliser une mesure de leur absorbance à 540 nm par spectrophotomètre.



Figure 3: spectrophotomètre

4 Préparation de la gamme d'étalonnage

Tableau 2: détermine les concentrations de glucose

Solution	SM	S1	S2	S3	S4	S5
Concentration(mg/ml)	2,5	1,25	0,15	0,019	0,001	0,00062

SM : solution mère

Un stock de glucose de concentration 2,5 mg/mL a été préparé par dissolution de 15 mg de D-glucose dans 6 mL de tampon citrate. Ensuite, une série de dilution a été effectuée en prenant

Matériels et Méthodes

3 mL de la solution de stock et en la diluant à 6 mL avec le tampon citrate pour obtenir la première dilution du rapport 1/2. Cela a été répété successivement à chaque dilution pour obtenir tous les points de la courbe d'étalonnage.

À partir de chaque solution ainsi obtenue, un volume de 0,5 mL a été prélevé et introduit dans des tubes à essai. À chacun de ces tubes, 2 mL de réactif DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) ont été ajoutés. Les tubes ont ensuite été chauffés pendant 5 minutes à 100 °C dans un bain-marie bouillant

Après refroidissement, un volume de 0,2 mL de chaque mélange a été prélevé et déposé dans une microplaque. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques à la longueur d'onde 540 nm.

5 La quantification de l'activité cellulase a différents pH:

Afin d'étudier l'effet du pH sur la production enzymatique, les isolats ont été cultivés dans un milieu de production dont le pH a été ajusté à trois valeurs différentes (5,7,et 9). Chaque milieu a été ajusté par ajout d'une solution de NaOH 1N ou de HCl 1N (**Bhagat et Kokitkar, 2021**)

6 L'optimisation de l'activité cellulase par l'ajout des sels:

L'effet de différents sels sur l'activité cellulase a été évalué selon le protocole décrit par **Malik and Javed (2021)**. Brièvement, chaque sel (KCl, NaCl, MgSO₄ et ZnSO₄) a été préparé à une concentration de 10 mM dans du tampon citrate 50 mM. Le mélange réactionnel contenait 1 mL d'extrait enzymatique et 0,5 mL de solution saline (10 mM). Après une pré-incubation à 37 °C pendant 30 minutes, 0,5 mL de substrat (papier filtre, 0,025 g) a été ajouté, puis la réaction enzymatique a été réalisée à 50 °C pendant 30 minutes. Pour doser les sucres réducteurs libérés, 2 mL de réactif DNS ont été ajoutés au mélange réactionnel, suivi d'une incubation à 100 °C pendant 5 minutes. Après refroidissement, un aliquot de 0,2 mL a été prélevé et déposé dans les puits d'une microplaque pour la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre (**Miller, 1959**). Un contrôle sans sel (remplacement par du tampon citrate) a été réalisé parallèlement .

7 L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes a été évaluée par la méthode de diffusion des cylindres d'agar. Les souches ont été cultivées sur les milieux M2 et AF (voir

Matériels et Méthodes

annexe 1) jusqu'à l'obtention d'une croissance suffisante. Les microorganismes cibles utilisés étaient *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans*.

Pour chaque microorganisme test, une suspension cellulaire a été préparée dans de l'eau physiologique (voir annexe 2) stérile puis étalée uniformément sur gélose Mueller-Hinton (MHA) pour les bactéries et sur gélose Sabouraud (SDA) pour la levure. À l'aide d'un emporte-pièce stérile, des cylindres d'agar contenant les cultures d'actinomycètes ont été prélevés à partir des boîtes de culture puis déposés à la surface des milieux préalablement ensemencés avec les microorganismes cibles.

Après une phase de diffusion à 4 °C pendant 2 heures, les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et à 30 °C pendant 48 heures pour *Candida* sp. L'activité antimicrobienne a été déterminée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition (mm) observées autour des cylindres d'agar (**Andrews, 2001**).

Résultats et discussion

1. Isolement des souches d'actinomycètes :

La revivification des actinomycètes conservés dans le glycérol (20 %) sur le milieu gélose de Gausse a permis d'obtenir trois souches pures et distinctes après 2 à 3 semaines d'incubation à 30°C l'aspect macroscopique des trois isolats présente une morphologie caractéristique des actinobactéries avec des variations notables de pigmentation , suggérant une diversité phénotypique au sein de l'échantillon sédimentaire marin d'origine. Ce succès de réactivation confirme à la fois l'efficacité du glycérol comme cryoprotecteur lors d'une conservation prolongée et la bonne sélectivité du milieu de Gausse pour favoriser la croissance des actinomycètes tout en limitant les contaminations. La durée d'incubation relativement longue est cohérente avec le métabolisme ralenti des souches marines.

Tableau 3: Origine et milieux d'isolement des trois souches d'actinomycètes utilisées dans cette étude.

Souches	Type d'échantillon	Milieux d'isolement culture
ASM1	Sédiment	Gélose de Gausse
S2	Sédiment	Gélose de Gausse
S5	Sédiment	Gélose de Gausse

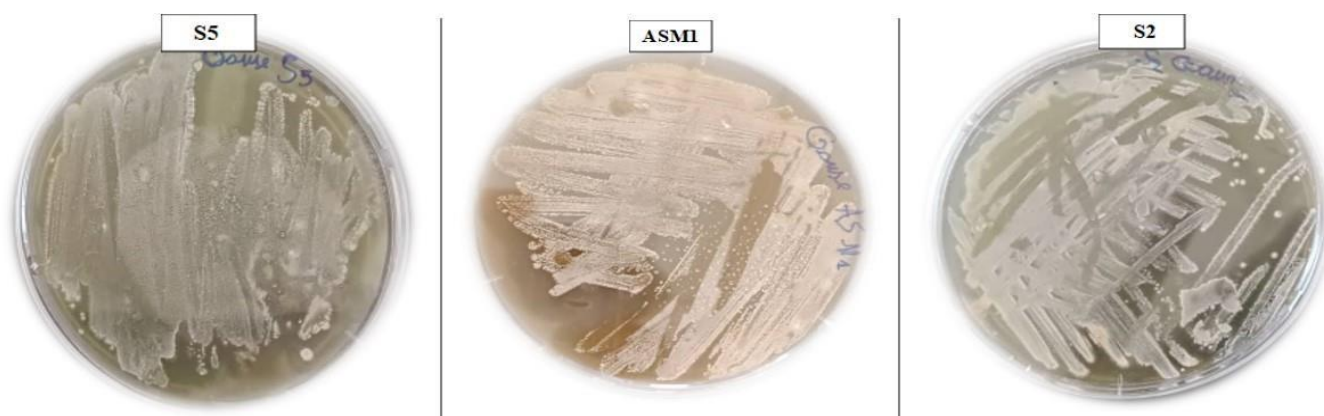


Figure 4 : l'aspect morphologique des actinomycètes

2. Résultats micromorphologie :

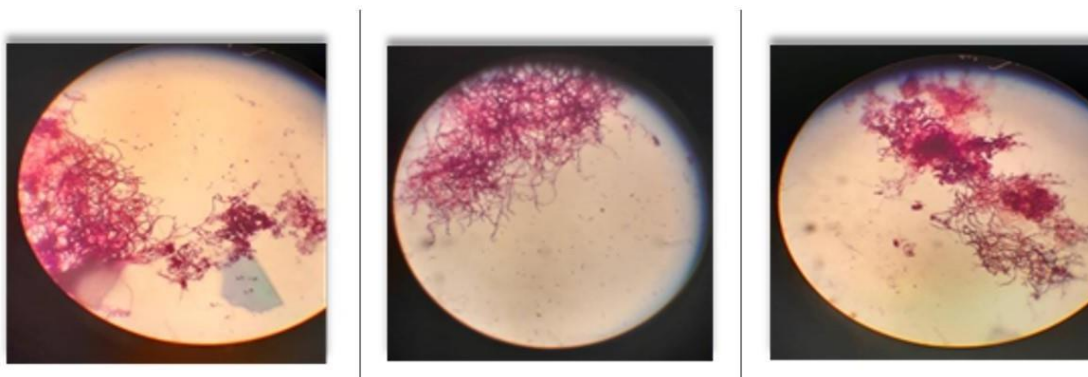


Figure 5: Observation microscopique des souches d'actinomycètes après coloration de Gram ($\times 100$).

concernant la micromorphologie étudiée par coloration de Gram, ces bactéries font partie du groupe à Gram positif, avec une structure sous forme de filaments fins, ramifiés et enchevêtrés. Cela correspond parfaitement aux observations faites par **Kitouni *et al.* (2005)** qui a signalé que les actinomycètes, plus précisément le genre de *Streptomyces*, adoptent une structure en hyphes d'où leur qualification de bactéries filamenteuses. Ils possèdent des spores qui peuvent être isolées ou agglutinées pour former des chaînes courtes ou longues entrelacées et sans fragmentation. Ce résultat confirme donc que les isolats que nous avons identifiés font partie du groupe des bactéries à Gram positives, comme le mentionne.

3. Résultats de la caractérisation biochimique :

Les résultats des divers tests biochimiques réalisés sur les trois isolats actifs sont synthétisés dans le tableau :

Tableau 4: Résultats de la caractérisation biochimique

Souches	TSI		C.S	Action sur lait écrémé		Catalase
	culot	Pente		Coagulation	Peptonisation	
ASM1	+	+	+	-	-	+
S2	+	+	+	-	+	-
S5	+	+	-	+	+	-

(+) Action positive

(-) Action négative

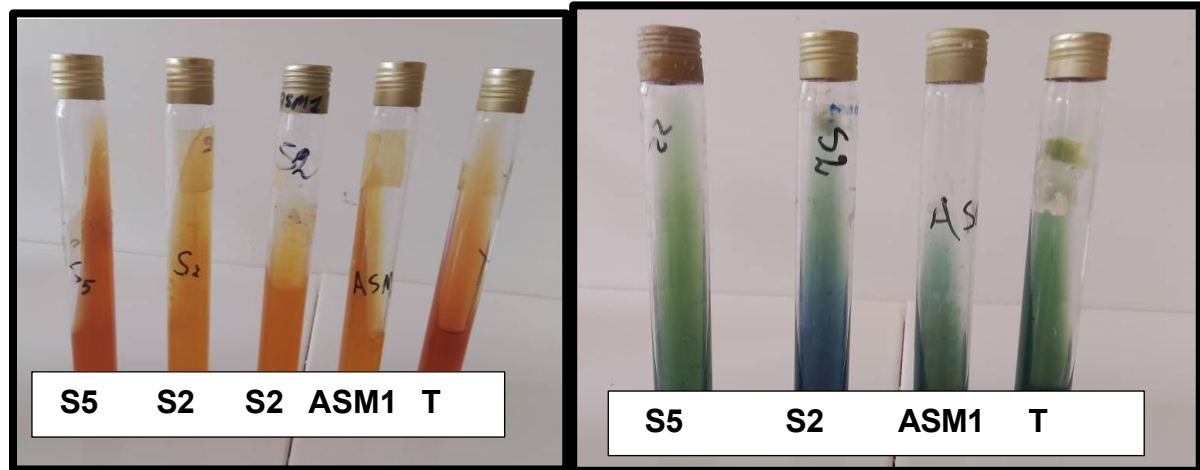
Les divers tests biochimiques effectués sur ces trois souches bactériennes (ASM1, S2 et S5) ont démontré que leurs métabolismes respectifs étaient différents.

Tous les trois isolats (ASM1, S2 et S5) ont été capables de fermenter du glucose, du saccharose et du lactose, démontrant ainsi une grande capacité à fermenter et une assimilation efficace des oses et des diholosides (**Lehman, 2016**). Ces données métaboliques témoignent du fait qu'il existe un système enzymatique complexe, capable de décomposer divers glucides, ce qui permet à ces cultures de posséder un métabolisme flexible extraordinaire, typique des actinomycètes.

Concernant le test au citrate de Simmons, il a été constaté que les deux souches ASM1 et S2 étaient capables de métaboliser le citrate comme seule source de carbone. Cependant, pour la souche S5, aucun résultat positif n'a été obtenu, signifiant qu'elle ne possède pas le métabolisme de ce composé (**Renaud, 2000**).

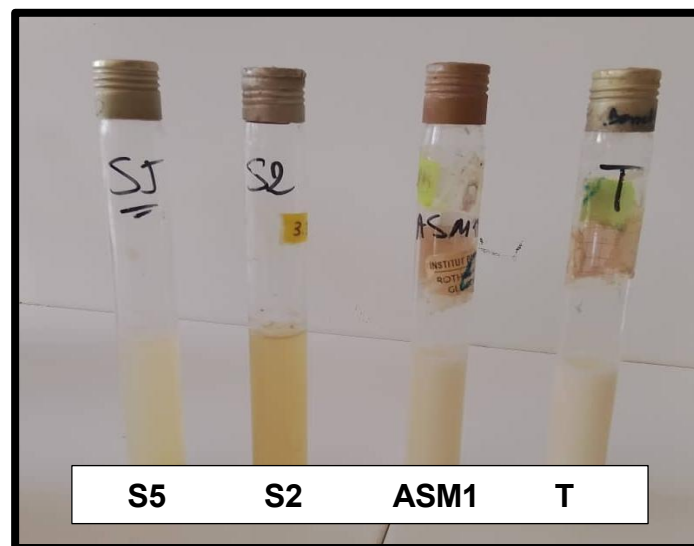
Évaluation des réactions enzymatiques au lait écrémé : ces réactions se sont réalisées sur les trois souches (ASM1, S2 et S5), et elles ont permis de voir des réactions différentes. Pour la peptonisation correspondant à l'hydrolyse protéinique de la caséine, c'est seulement pour les deux isolats S2 et S5 que cette réaction a été notée, alors que la souche ASM1 s'est révélée inactive. Pour la coagulation due à la réaction enzymatique sur le lactose, c'est encore la souche S5 qui a donné des résultats positifs (**Marchal et al, 1991**).

Seulement la souche ASM1 a été positive lors de l'application du test de la catalase, ce qui montre sa capacité à décomposer le peroxyde d'hydrogène. Nos résultats corroborent les travaux de **Qiong Ying et al. (2012)**, qui ont signalé que la plupart des actinomycètes adoptent un métabolisme aérobie avec une activité catalasique positive.



Test de TSI

Test de citrate de simmons



Action de lait écrémé

T : Témoin

Figure 6: Résultats des tests biochimiques

4. Le meilleur substrat cellulosique

La détermination du potentiel cellulolytique des trois souches (ASM1, S2 et S5) a été effectuée au cours de l'étude de l'hydrolyse de quatre substrats cellulosiques (papier filtre , papier filtre en poudre , coton et hydroxyéthylcellulose) dans deux milieux de culture (précédemment cités dans la partie matériel et méthodes). Au bout de 7 jours d'incubation à 30 °C, des divergences étaient observées concernant la croissance et l'exploitation des substrats.

Au sein des quatre substrats utilisés, l'hydroxyéthylcellulose et le papier filtre (Whatman N°1) se sont révélés comme les meilleurs substrats de cellulase permettant d'obtenir une biomasse importante dans l'isolement ASM1, par rapport aux deux autres qui ont permis d'obtenir une croissance modérée à faible. Aussi, on a constaté que le milieu 1 est plus favorable que le milieu 2 pour cette croissance.

Par contre aucune croissance n'a été observée pour les souches S2 et S5 ce qui suggère leur inaptitude à pousser dans des milieux contenant des substrats de cellulose comme source de carbone

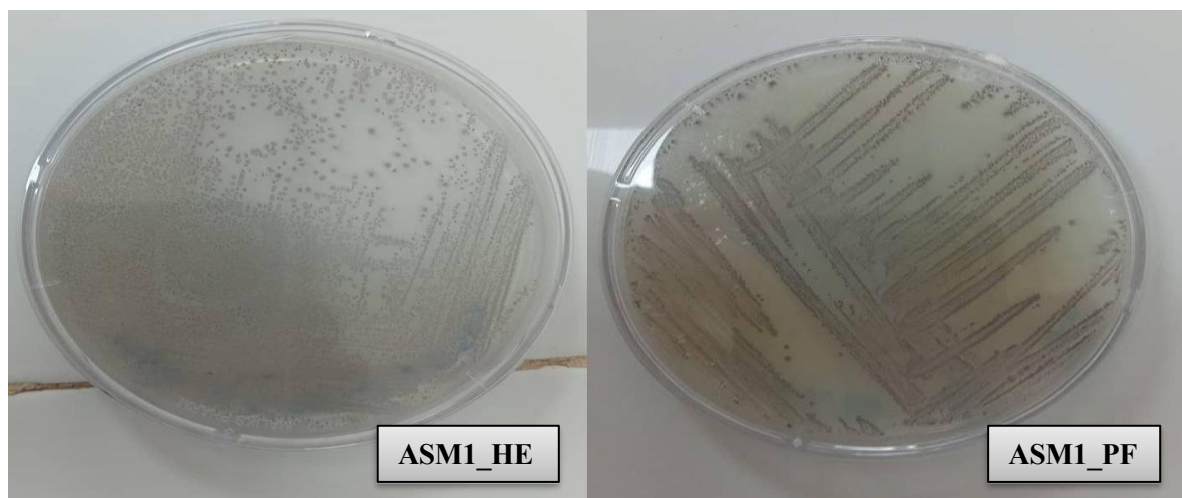


Figure 7: Résultats de test de cellulase (substrat cellulose HEC et Papier filtre)

5. Résultats de test qualitatif de l'activité cellulase

les boîtes présentant une croissance notable sur le meilleur substrat ont été sélectionnés

(papier filtre) ont été soumises au test de révélation au rouge Congo . L'application du colorant suivie d'un lavage à la soude (NaOH 1M) a permis de visualiser des zones d'hydrolyse de la cellulose.

Une zone claire translucide, a été observée autour des colonies de l'isolat ASM1 sur le milieu contenant le papier filtre . Ces halos translucides indiquent une hydrolyse des zones des substrats cellulosiques , traduisant la production d'enzymes cellulases par ces souches, ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Kasana et al. (2008)**, qui ont recommandé l'utilisation de ce test comme méthode de criblage primaire des souches d'actinomycètes productrices de cellulase.



Figure 8: Mise en évidence de l'activité cellulolytique par coloration au rouge Congo

6. Résultats du dosage quantitatif de l'activité cellulase par la méthode DNS

Les résultats du dosage quantitatif de l'activité cellulase par la méthode DNS sur le substrat hydroxyéthylcellulose (HEC) n'ont pas été reproductibles. Les valeurs d'absorbance enregistrées à 540 nm étaient systématiquement faibles, suggère que les extraits enzymatiques

obtenus présentait des concentrations insuffisantes en protéines actives, empêchant ainsi toute quantification fiable de l'activité enzymatique spécifique

Ce rendement faible en enzyme cellulase peut s'expliquer par une production enzymatique insuffisante dans les conditions de culture en bouillon utilisées (7 jours, 30 °C). L'optimisation des paramètres de culture notamment la source d'azote, le pH initial, la durée d'incubation et l'agitation apparaît comme une étape primordiale pour améliorer le rendement enzymatique chez ces souches. Cette nécessité d'ajuster les conditions de fermentation a d'ailleurs été soulignée par **Islam et al. (2019)**, qui ont démontré que la production de cellulase chez les actinobactéries est étroitement dépendante des nutriments et des inducteurs présents dans le milieu.

7. Résultat de test quantitatif du papier filtre (la cellulase totale)

ce qui n'a permis ni la conversion fiable en équivalents glucose, ni le calcul d'une activité spécifique (U/mL), aucune libération significative de sucres réducteurs n'ayant été détectée après 60 minutes d'incubation. Ainsi, l'activité enzymatique mesurée sur papier filtre par la méthode DNS s'est révélée globalement faible, reflétant la capacité relativement limitée des souches à produire de la cellulase

Cette performance pourrait être due à des paramètres sub-optimaux de culture en ce qui concerne le pH, la température, le temps d'incubation et la qualité des substrats en carbone et azote. Plusieurs recherches suggèrent qu'une optimisation de ces paramètres par des méthodes statistiques comme la conception composite centrée (CCD) pourrait permettre d'améliorer le niveau de production de la Carboxyméthylcellulose. Pour preuve, **Deka et al. (2011)** ont observé une augmentation de 33 % de l'activité enzymatique de *Bacillus subtilis* AS3 suite à l'optimisation des paramètres de culture notamment du pH, de la température et de l'agitation. Cela montre l'importance de la modulation des paramètres environnementaux pour augmenter les performances enzymatiques, ce qui peut également permettre d'optimiser la production de cellulase chez nos isolats d'actinomycètes dans cette étude

8. La gamme d'étalonnage :

Une courbe d'étalonnage a été construite suite à la mesure des absorbances des solutions standard de glucose (2.5-0.00062 mg/ml) à 540nm (figure 09), la droite obtenue possède un coefficient de corrélation $R^2 = 0.97$ ce qui témoigne la convergence de la plupart de nuage de points sur la droite, cette courbe permet d'extrapoler l'absorbance de

Résultats et Discussion

l'échantillon enzymatique et de trouver la concentration en cellulase correspondante (U/min/ml)

Tableau 5: représente l'absorbance des solution glucose

Concentration glucose (mg/ml)	2,5	1,25	0,15	0,019	0,001	0,00062
Absorbance (540nm)	1,79	1,09	0,39	0,21	0,11	0,01

Courbe d'étalonnage établie à partir du glucose

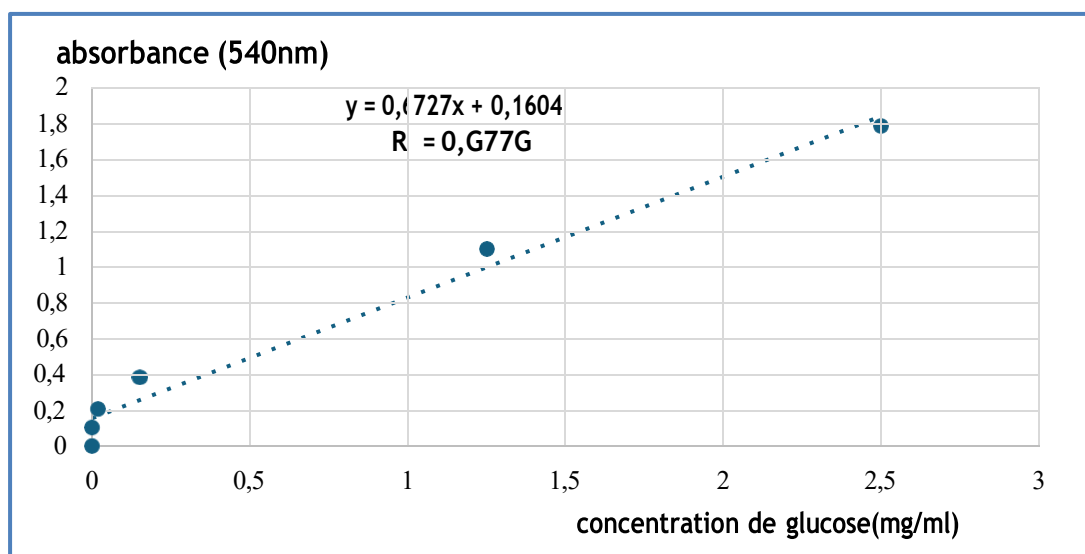


Figure 9: Courbe d'étalonnage établie à partir du glucose

9. La quantification de l'activité cellulase a différents pH

L'expérimentation sur l'influence du pH sur la production enzymatique a montré que l'activité la plus élevée a été enregistrée à pH 7. À l'inverse, aucune activité enzymatique n'a été décelé à pH= 5 et pH= 9

Ceci peut s'expliquer par un encombrement du site actif par des liaisons hydrogènes ou ioniques, ou un changement de conformation native de l'enzyme à des pH acides ou basiques et ce qui peut entraîner une perte de l'activité catalytique . Une étude antérieure menée par

Résultats et Discussion

Bhagat et Kokitkar (2021), qui ont également enregistré un pH optimal proche de la neutralité chez des isolats bactériens similaires, cette étude renforce l'intérêt de notre approche pour l'étude de l'activité enzymatique à différents degrés de pH

10. L'optimisation de l'activité cellulase par l'ajout des sels:

La supplémentation du mélange réactionnel par les quatre sels a révélé que le sulfate de magnésium (MgSO_4) a permis d'augmenter l'activité enzymatique, la quantité mesurée de la cellulase par la méthode DNS après l'ajout de ce composé était mesurée à $0,05 \text{ U/ml/min}^{-1}$ (figure 2) ; une étude antérieure menée par **Malik et Javed (2021)** ont prouvé que l'activité d'un extrait enzymatique de la cellulase provenant d'une souche de *B.subtilis* était amélioré après l'ajout de ces deux sels,

En parallèle, aucune activité n'a été signalée après l'ajout des autres sels (ZnSO_4 , NaCl et KCl), ceci peut être expliqué par l'inhibition possible de ces éléments sur le site actif de l'enzyme, **de Cassia Pereira et al., (2017)**, ont mis l'accent sur le pouvoir inhibant de certains sels sur l'activité cellulase qui peuvent rentrer en compétition avec les substrats de cellulose au niveau du site actif.

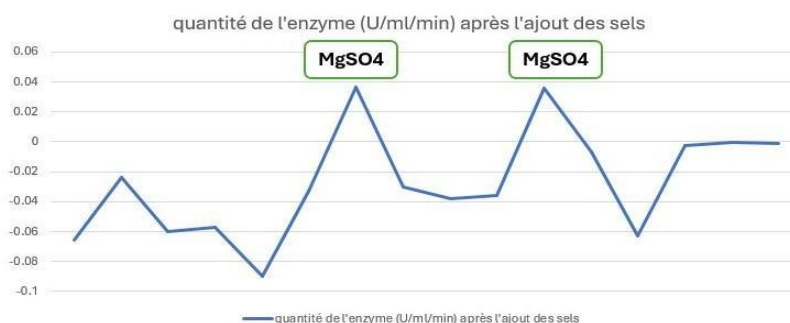


Figure 10: quantité de l'enzyme (U/ml/min) après l'ajout des sels

11. L'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes par la méthode de diffusion des cylindres d'agar n'a révélé aucune zone d'inhibition visible vis-à-vis les souches pathogènes testées (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans*.), sur les deux milieux (M2 ou AF)

l'absence de l'activité antimicrobienne observée est très probablement liée à la plasticité génomique des souches d'actinomycètes et plus particulièrement celles appartenant au genre *Streptomyces*, ce dernier est connu pour sa susceptibilité aux remaniements chromosomiques et aux mutations spontanées. La cryoconservation de ces souches dans le glycérol à vraisemblablement induit des altérations génétiques au niveau des clusters de gènes de la biosynthèse des métabolites secondaires, réprimant ainsi leur expression.

En effet, le chromosome des *Streptomyces* est très instable et subit de très grandes délétions spontanées qui peuvent atteindre une fréquence de 0,1 à 1% (Hoff et al, 2018)

Des études antérieures ont signalé que chez le genre *Streptomyces*, les gènes codant pour les métabolites secondaires sont placés dans les deux extrémités du chromosome bactérien, ces régions sont instables et subissent des recombinaisons génétiques en permanence (Xu et al, 2016)

Conclusion

Conclusion

La présente étude s'inscrit dans la problématique actuelle de valorisation biotechnologique de la biomasse lignocellulosique, en explorant le potentiel de souches d'actinomycètes isolées de sédiments marins pour la production de cellulases, enzymes clés dans les processus de biodégradation et de bioraffinerie. L'objectif principal de ce travail, à savoir l'optimisation de la production de cellulase par des souches d'actinomycètes, a été abordé à travers une caractérisation phénotypique et biochimique approfondie, suivie d'une évaluation de leurs capacités cellulolytiques dans des conditions de culture variables.

Trois isolats d'actinomycètes, désignés par ASM1, S2 et S5, ont été revivifiés et identifiés comme des bactéries à Gram positif filamenteuses, conformément aux caractéristiques morphologiques typiques de ce groupe. L'étude biochimique a révélé des profils métaboliques distincts entre les souches, notamment dans leur capacité à utiliser le citrate comme source de carbone unique et dans leurs réactions enzymatiques sur le lait écrémé, témoignant d'une diversité phénotypique intéressante au sein des isolats marins.

Le test pour le potentiel cellulolytique a démontré que le papier filtre est le substrat le plus propice à la croissance de la souche ASM1

L'optimisation de la production de la cellulase en étudiant plusieurs paramètres (le meilleur substrat, le pH, le type de milieu de culture et l'ajout des sels) a montré que l'activité de la cellulase est optimale à un pH 7, en utilisant le papier filtre comme substrat de cellulase et avec une incubation du mélange réactionnel avec le $MgSO_4$ à une concentration de 10 mM

Ces résultats confirment que les sédiments marins peuvent être considérés comme une source prometteuse d'actinomycètes cellulolytiques, et sont des meilleurs candidats en bioremédiation

Cette étude s'ouvre sur des perspectives :

- Comme l'optimisation de la production par la mutagénèse, dont la plupart des souches sauvages bactérienne ont un rendement faible de production de métabolites secondaires,
- L'étude de l'effets d'autres paramètres sur la productivité enzymatiques: la température, d'autres oligoéléments

Conclusion

- La purification de la protéine cellulase issue de la souche ASM1 et l'étude de sa structure cristallographique afin d'enrichir la banque de donnée de protéines (PDB) par des structures de la cellulase provenant des actinomycètes

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abdelrahman, O., Coxon, Q., Abou-Mansour, E., L'Haridon, F., Falquet, L., Allard, P. M., & Weisskopf, L. (2025). Mining Actinomycetes' Metabolomes and Genomes for Anti-Phytophthora infestans Compounds. *Microbial biotechnology*, 18(12), e70269.
- Adams, E. (1975). Studies in Gram staining. *Stain Technology*, 50(4), 227–231.
- Akhtar, N., Goyal, D. et Goyal, A. (2016). Biodiversité des bactéries productrices de cellulase et leurs applications. *Chimie et technologie de la cellulose*, 50 (09-octobre), 983- 995
- Alliouch-Kerboua, A. (2017). Isolement, caractérisation et étude du potentiel antibiotique d'actinomycètes d'origines diverses [Thèse de doctorat, Université Frères Mentouri Constantine 1]. DSpace Repository.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(Suppl. 1), 5–16
- Belyagoubi, L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat, Université Aboubaker Belkaïd - Tlemcen.
- Belyagoubi, L., Belyagoubi-Benhammou, N., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C., & Djebbar, A. (2018). Antimicrobial activity of actinomycetes isolated from Algerian arid soils. *Journal of Arid Environments*, 150, 36-44
- Bhagat, S. A., & Kokitkar, S. S. (2021). Isolation and identification of bacteria with cellulose-degrading potential from soil and optimization of cellulase production. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 9(6), 1–6.
- Birch, A., Häusler, A., & Hüttler, R. (1990). Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4138–4142.
- Borthakur, I., Devi, R. P., Karthikeyan, S., Ramesh, D., & Murugananthi, D. (2024). Microbial cellulase production: Current technologies and future prospects. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 18(4), 2188–2204.
- Breitling, R., Avbelj, M., Bilyk, O., Del Carratore, F., Filisetti, A., Hanko, E. K., ... & Takano, E. (2021). Synthetic biology approaches to actinomycete strain improvement. *FEMS Microbiology Letters*, 368(10), fnab060.
- Chaudhary, P., Sharma, A., & Singh, B. (2024). Actinobacteria as potential biocatalysts: Cellulase production and industrial applications. *Bioresource Technology Report*, 25, 101-112.
- Co, R., & Hug, L. A. (2020). A need for improved cellulase identification from metagenomic sequence data. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(1), e01928-20.
- Coelho, M. P., Suárez-Moo, P., Rocha, M., Matos, A. O. G., Marques, V., Margarida, S., Mil-Homens, M., Prieto-Davó, A., Rodrigues, C. M. P., Bauermeister, A., Sobral, R. G., & Gaudêncio, S. P. (2026). Taxonomic Diversity and Metabolic and Pharmacological Profiles of Marine-Derived Actinomycetes from the Lisbon and Setúbal Coast, Portugal. *Marine Drugs*, 24(2), 68.
- de Cassia Pereira, J., Giese, E. C., de Souza Moretti, M. M., dos Santos Gomes, A. C., Perrone, O. M., Boscolo, M., & da Silva, R. (2017). Effect of metal ions, chemical agents and organic compounds on

Références Bibliographiques

- lignocellulolytic enzymes activities. In A. M. El-Shemy (Ed.), *Enzyme inhibitors and activators* (Vol. 29, pp. 139–164). InTech
- De Simeis, D., & Serra, S. (2021). Actinomycetes: A Never-Ending Source of Bioactive Compounds—An Overview on Antibiotics Production. *Antibiotics*, 10(5), 483.
- Deka, D., Jawed, M., Goyal, A., Rathore, A. S., & Lal, R. (2011). Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. *Enzyme Research*, 2011, Article ID 151656.
- Devanshi, S., R. Shah, K., Arora, S., & Saxena, S. (2022). Actinomycetes as An Environmental Scrubber. In *Crude Oil - New Technologies and Recent Approaches*. IntechOpen.
- Dhahbi, S., Lee, J., Ryu, D., Akinniyi, G., & Yang, I. (2025). Actinomycetes studies in Tunisia. *Research in Microbiology*, 176, Article 104279.
- Fang, H., Li, C. F., Zhao, J. J., & Zhao, C. (2026). Biotechnological advances and trends in engineering *Trichoderma reesei* towards cellulase hyperproducer. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 19(1), 25.
- Farda, B., Djebaili, R., Vaccarelli, I., Del Gallo, M., & Pellegrini, M. (2022). Actinomycetes from caves: An overview of their diversity, biotechnological properties, and insights for their use in soil environments. *Microorganisms*, 10(2), 453.
- Froidurot, A., & Julliard, V. (2022). Cellulolytic bacteria in the large intestine of mammals. *Gut Microbes*, 14(1), Article 2031694.
- Gaete, A. V., Valenzuela, L., Zamorano, M., et al. (2025). Cellulase production by *Bacillus smithii* QT03 using agro-industrial residues as substrate. *Bioresource Technology*, 395, 130412.
- Gause, G. F., Preobrazhenskaya, T. P., Sveshnikova, M. A., Terekhova, L. P., & Maximova, T. S. (1983). A guide for the determination of actinomycetes. Nauka.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activity. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257–268.
- Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2015). Microbial systematics in the post-genomics era. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(4), 883-931
- Hashim, H. S., Zayan, M. M., Mohamed, A. A., & Abulila, H. I. A. (2026). Actinomycetes in the spotlight: biodiversity and their role in bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 42, 44.
- Helmi, N. R. (2025). Exploring the diversity and antimicrobial potential of actinomycetes isolated from different environments in Saudi Arabia: A systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 16, Article 1568899.
- Hussain, M. H., Iqbal, A., Nazir, M., & Demirci, A. (2025). From waste to wealth: Unlocking the potential of cellulase characteristics for food processing waste management. *Foods*, 14(21), 3639.
- Ilic, N., Milosavljevic, A., Lončar, N., et al. (2023). From lignocellulosic biomass to improved production of cellulases: a review. *Process Safety and Environmental Protection*, 172, 814-828.

Références Bibliographiques

- Islam, M. T., Hossen, M. J., Uddin, M. N., & Hossain, M. M. (2019). Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from *Bacillus* sp. *Malaysian Journal of Halal Research*, 2(1), 15–21.
- Jose, P. A., Maharshi, A., & Jha, B. (2021). Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiological research*, 246, 126708.
- Kadoguchi, E. A., de Oliveira, D. P., de Souza, R. F., et al. (2024). Optimization of cellulase production from agri-industrial residues by *Aspergillus* spp. under solid-state fermentation. *Microorganisms*, 12(3), 512.
- Karimi, K., Taherzadeh, M. J., & Lennartsson, P. R. (2021). Lignocellulosic waste: a renewable resource for sustainable bioproducts. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(2), 375–391.
- Karthik, L. (2024). Bioactive compounds from marine actinomycetes: Isolation, characterization, and applications. *Marine Biotechnology Journal*, 12(2), 115–128.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503–507.
- Kitouni, M. (2005). Identification d'une Actinomycétales productrice d'antibactériens, isolée de sols arides des régions de Biskra. *Sciences & Technologie*, n°22, 48–54.
- Law, J. W.-F., Letchumanan, V., Hong, K.-W., Wong, S. H., Ab Mutalib, N. S., He, Y.-W., Chan, K.-G., & Tan, L. T.-H. (2023). *Streptomyces learnhanii* sp. nov., unveiling a Mangrove-Derived Novel “Modern Actinobacteria” in Malaysia. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 6(1).
- Lehman D., 2005. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Protocols. American Society for Microbiology, 1 Sept. Available at: ASM website (PDF) [Accessed 13 Jun. 2025].
- Mahima, M., Verma, P., & Singh, R. (2026). Fungal cellulases: A comprehensive review on production, innovations, and applications. *Archives of Microbiology*, 208(6), 291.
- Mariat, F., & Sebald, M. (1989). *Techniques en bactériologie anaérobie*. Institut Pasteur.
- Mawang, C. I., Azman, A. S., Mohd Fuad, A. S., & Ahamad, M. (2021). Actinobacteria: An eco-friendly and promising technology for the bioaugmentation of contaminants. *Biotechnology Reports*, 32, e00679.
- Meenakshi, S., Hiremath, J., Meenakshi, M. H., & Shivaveerakumar, S. (2024). Actinomycetes: Isolation, cultivation and its active biomolecules. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 18(1), 118–143.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Miyadoh, S., & Nippon Actinomycetum Gakkai. (1997). *Atlas of actinomycetes*. Asakura Shoten.
- Mohanta, S., Bahuguna, M., Baley, J. D., Sharma, S., & Sharma, V. (2023). Extremophilic cellulases: A comprehensive review. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 8(3), 74986.

Références Bibliographiques

- Nargesi, N., Gheshlaghi, R., Mahdavi, M. A., et al. (2023). Environmental impact of lignocellulosic waste accumulation and bioconversion strategies. *Journal of Environmental Management*, 325, 116589.
- Nazari, M. T., Machado, B. S., Marchezi, G., Crestani, L., Ferrari, V., Colla, L. M., & Piccin, J. S. (2022). Use of soil actinomycetes for pharmaceutical, food, agricultural, and environmental purposes. *3 Biotech*, 12(9), 232.
- Ngamcharungchit, C., Chaimusik, N., Panbangred, W., Euanorasetr, J., & Intra, B. (2023). Bioactive metabolites from terrestrial and marine actinomycetes. *Molecules*, 28(15), 5915.
- Osorio-González, C. S., Hegde, K., Brar, S. K., et al. (2022). Lignocellulosic biomass-based biorefinery: challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 343, 126066.
- Pappu, J. S. M., Kumar, K., & Kumari, R. (2026). Cellulases and hemicellulases in lignocellulose degradation: A comparative analysis of wild-type and recombinant systems. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 815, 15367.
- Patel, A. K., Singhania, R. R., Sim, S. J., & Pandey, A. (2019). Thermostable cellulases: Current status and perspectives. *Bioresource Technology*, 279, 385–392.
- Pérez-Corral, D. A., Ornelas-Paz, J. J., Olivas-Orozco, G. I., Acosta-Muñiz, C. H., Salas-Marina, M. A., Berlanga-Reyes, D. I., Ruiz-Cisneros, M. F., & Rios-Velasco, C. (2022). Molecular, morphological and biochemical characterization of actinomycetes and their antagonistic activity against phytopathogenic fungi. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 45(1), 103-115.
- Rai, R., Shrivastava, A., & Gupta, M. K. (2023). Technological road map of cellulase: A comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications. *Biotechnology Advances*, 67, 108202.
- Renaud, F. N. R. (2000). *Précis de bactériologie clinique*. Paris : ESKA.
- Rui, S., Fengrui, G., Yining, Z., Hong, S., Xuwen, Y., Changping, W., & Chunjia, Y. (2025). Biological activity of secondary metabolites of actinomycetes and their potential sources as antineoplastic drugs: A review. *Frontiers in Microbiology*, 16, Article 1550516.
- Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., & Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 72.
- Setiawati, S., & Yusan, R. T. (2022). Actinomycetes as a source of potential antimicrobial and antibiofilm agents. *Medical and Health Journal*, 2(1), 50-70.
- Shaikh, M., Shaikh, I., Shaikh, A., et al. (2025). Response surface optimization for cellulase production by *Bacillus* sp. using agricultural residues. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(1), 123-136.
- Sharker, S., Sultana, S., & Uddin, M. N. (2023). Isolation, screening, and optimization of cellulase-producing bacteria from environmental sources. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 45-56.

Références Bibliographiques

- Sharma, N., Kaur, M., & Singh, S. (2023). Lignocellulolytic extremozymes and their biotechnological applications. *Extremophiles*, 27(3), 30.
- Sharma, S., Sharma, P., Sharma, V., et al. (2023). Bioremediation of lignocellulosic wastes: a sustainable approach for circular economy. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(15), 43210-43228.
- Shi, Y., Li, X., & Zhang, L. (2023). Cellulase production by Actinomycetes: Optimization of culture conditions and industrial applications. *Bioresource Technology*, 372, Article 128640
- Sidar, A., Albuquerque, P. M., Vos, G. P., & Ram, A. F. J. (2020). Carbohydrate binding modules: Diversity of domain architecture in amylases and cellulases from filamentous microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 870.
- Silva, G. C., Kitano, I. T., Ribeiro, I. A. F., & Lacava, P. T. (2022). The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture. *Frontiers in Soil Science*, 2, 833181.
- Singh, A., Bajar, S., Bishnoi, N. R., et al. (2021). An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100652.
- Sukharnikov, L. O., & Alper, H. S. (2020). A need for improved cellulase identification from metagenomic sequence data. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(19), e01928-20.
- Sutaoney, P., Rai, S. N., Sinha, S., Choudhary, R., & Gupta, A. (2024). Current perspective in research and industrial applications of microbial cellulases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 264(Pt 1), 130639.
- Swarna, D., & Gnanadoss, J. J. (2020). Screening and molecular characterization of actinomycetes from mangrove soil producing industrially important enzymes. *Journal of Scientific Research*, 64(2), 86-95.
- Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777–780
- Thapa, S., Mishra, J., Arora, N., Mishra, P., & Thakur, S. (2020). Microbial cellulolytic enzymes: Diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(3), 621–648.
- Traxler, M. F., & Rozen, D. E. (2022). Ecological drivers of division of labour in *Streptomyces*. *Current opinion in Microbiology*, 67, 102148.
- Tuli, D. K., & Kuila, A. (Eds.). (2021). Current status and future scope of microbial cellulases. Elsevier.
- Van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., & van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 392-416

Références Bibliographiques

- Volff, J. N., & Altenbuchner, J. (1998). Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Molecular Microbiology*, 27(2), 239–246.
- Waheeb, M. S., El-Gendi, H., El-Bondkly, A. M., et al. (2024). Optimized production and characterization of a thermostable cellulase from *Streptomyces thermodiastaticus* strain. *AMB Express*, 14, 129.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. et Tingey, S. V. (1990). Les polymorphismes de l'ADN amplifiés par des amorces arbitraires sont utiles comme marqueurs génétiques. *Nucleic Acids Res* 18(22):6531-6535
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090.
- Xu, Y., Zhao, X., Jin, J., Zhang, R., Zhou, C., Wang, Z., Yao, S., Wang, X., Xiang, W., & Song, J. (2024). *Amycolatopsis melonis* sp. nov., a novel protease-producing and cellulose-degrading actinobacterium isolated from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 74(10), 10.1099/ijsem.0.006559.
- You, C., Liu, Y.-J., Cui, Q., & Feng, Y. (2023). Glycoside hydrolase family 48 cellulase: A key player in cellulolytic bacteria for lignocellulose biorefinery. *Fermentation*, 9(3), 204.
- Zinedine, A. (2004). Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines. Thèse de doctorat en microbiologie, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc.

Annexes

Annexe 1

La composition des milieux de culture :

M2

Amidon	10 g
Caséine	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,05 g
CaCO ₃	0,02 g
FeSO ₄	0,01g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH : 7,4	

Gélose de Gause

Amidon	20 g
KNO ₃	1 g
NaCl	0,5 g
MgSO ₄ ×7 H ₂ O	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
FeSO ₄	10 mg
Agar	15 g
Eau distillée	1000ml
pH : 7,4	

Milieu AF

Extrait de malt	10 g
Extrait de levure	4 g
Glucose	2 g
NaCl	2,5 g

Annexes

CaCO ₃	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH 7,0

Mueller Hinton

Infusion de viande de boeuf	2 g
Amidon	15 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 ml

pH 7,3

Milieux 1 et 2 :

Milieu 1

source de cellulose	20 g
K ₂ H ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄)SO ₂	2 g
MgSO ₄	0,5 g
Pepton	0,5 g
COCL ₂	5,5 mg
FeSO ₄	7,5 mg
MnSO ₄	2,5 mg
ZnSO ₄	3,56 mg

Milieu 2

source de cellulose	1g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
peptone	2,5 g
extrait de levure	0,5 g
solution d'oligoélément	1ml

Annexe 2

La composition des solutions :

Tampon Citrate :

Acide citrique	10,5g
Eau distillé	1000ml

Eau Physiologique :

Na Cl	1g
Eau distillé	100ml

Réactif DNS :

DNS	2g
Soude Na OH	3,2g
Tartrate double Sodium potassium	60g
Eau distillé	100ml

Solution Substrat à1% :

Cellulose	1g
Tampon citrate	100ml

Solution rouge Congo 1%

Rouge Congo	1g
Eau distillé	100ml

Solution Na OH à 1M

Na OH	4g
Eau distillé	100ml

Solutions glucose :

Solution mère :

Annexes

Glucose	1,8g
Eau distillé	100ml

Annexe 3

Coloration de Gram :

La technique de coloration de Gram est réalisée sur un frottis bactérien préalablement étalé sur une lame propre. Ce frottis est tout d'abord recouvert de violet de gentiane, un colorant basique, et laissé à incuber pendant une minute. L'excès de colorant est ensuite éliminé par l'application d'une solution de Lugol, agissant comme mordant, durant trente secondes, afin de fixer le complexe coloré au sein des parois bactériennes. Après un premier rinçage délicat à l'eau distillée, la lame est soumise à une décoloration progressive par un écoulement doux d'alcool à 90°, cette action étant immédiatement interrompue par un second rinçage à l'eau distillée pour éviter une décoloration excessive. La contre-coloration est effectuée par l'application de la fuchsine pendant une minute, suivie d'un rinçage final à l'eau distillée. Enfin, le frottis est séché par tapotement entre deux feuilles de papier absorbant, avant le dépôt d'une goutte d'huile à immersion sur la lame, permettant l'observation microscopique à l'objectif x100 à immersion (**Adams,1975**).

الملخص :

تهدف هذه الدراسة إلى تحسين إنتاج السليولاز من سلالات الأكتينوميستيات المعزولة من الرواسب البحرية. استُخدمت ثلاث عزلات (ASM1، S2، وS5). أُعيد تنشيط العزلات، ووصفت مورفولوجيًا وكيميائيًا حيويًا، ثم قُيِّمت قدرتها على النمو على ركائز سليولوزية مختلفة.

أظهرت النتائج أن هيدروكسي إيثيل السليولوز وورق الترشيح كانا أفضل الركائز للنمو، وخاصةً لسلالة ASM1. كشف اختبار الكونغو الأحمر عن وجود حالات تحلل مائي، مما يشير إلى نشاط سليولازي نوعي. مع ذلك، أظهرت التحليلات الكمية باستخدام طريقة DNS إنتاجًا منخفضًا للإنزيم في ظل الظروف التجريبية. لوحظ أعلى نشاط عند درجة حموضة 7، بينما لم تُظهر الأملاح المختبرة أي تأثير محفز. لم يُرصد أي نشاط مضاد للميكروبات ضد الكائنات الدقيقة المستهدفة. تُبرز هذه النتائج أهمية تحسين ظروف الاستزراع لزيادة إنتاج السليولاز.

الكلمات المفتاحية : أكتينوميستيات، سليولاز، هيدروكسي إيثيل السليولوز، تحسين، نشاط سليولازي.

Abstract:

This study aims to optimize cellulase production from actinomycete strains isolated from marine sediments. Three isolates (ASM1, S2, and S5) were reactivated and characterized at both morphological and biochemical levels, and subsequently evaluated for their ability to grow on different cellulosic substrates. The results showed that hydroxyethylcellulose and filter paper were the most favorable substrates for growth, particularly for strain ASM1. The Congo red assay revealed the presence of hydrolysis zones (clear halos), indicating qualitative cellulolytic activity. However, quantitative assays using the DNS method demonstrated low enzymatic production under the applied experimental conditions. The highest activity was observed at pH 7, while the tested salts showed no stimulatory effect. No antimicrobial activity was detected against the target microorganisms. These findings highlight the importance of optimizing culture conditions to enhance cellulase production.

Keywords: Actinomycetes, cellulase, hydroxyethylcellulose, optimization, cellulolytic activity.

Résumé :

Cette étude vise à optimiser la production de cellulase à partir de souches d'actinomycètes isolées de sédiments marins. Trois isolats (ASM1, S2 et S5) Dans ce cadre, les isolats ont été réactivés, caractérisés sur les plans morphologique et biochimique, puis évalués pour leur capacité à croître sur différents substrats celluloseux.

Les résultats ont montré que l'hydroxyéthylcellulose et le papier filtre constituaient les substrats les plus favorables à la croissance, particulièrement pour la souche ASM1. Le test au rouge Congo a révélé la présence d'halos d'hydrolyse indiquant une activité cellulolytique qualitative. Cependant, les dosages quantitatifs par la méthode DNS ont montré une faible production enzymatique dans les conditions expérimentales adoptées. L'activité maximale a été observée à pH 7, tandis que les sels testés n'ont présenté aucun effet stimulant. Aucune activité antimicrobienne n'a été détectée contre les microorganismes cibles. Ces résultats soulignent l'intérêt d'optimiser les conditions de culture afin d'améliorer la production de cellulases.

Mots-clés : Actinomycètes, cellulase, hydroxyéthylcellulose, optimisation, activité cellulolytique.