

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA –Bejaia-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité Biotechnologie Microbienne



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en
Biotechnologie Microbienne

Thème

*Optimisation statistique de la production d'une
lipase actinobactérienne dans un milieu à base
de margines*

Présenté par :

BENKHELOUF Imene & AITECHE Rabah

Soutenu le 29/09/2021

Devant le jury composé de :

Mme	ARKOUB Warda	MCA	Présidente
Mme	BOUCHERBA Nawel	Pr	Encadrant
Mr	BETACHE Azedine	Pr	Examineur

2020/2021

Dédicaces

*Ce travail n'a pas été un long fleuve tranquille mais heureusement que ma
famille et amis ont été là pour m'éclairer le chemin*

Je dédie ce mémoire

*A mes précieux parents, que nulle dédicace ne peut exprimer ce que je leur dois
pour leur bienveillance, leur affection et pour toutes les privations et sacrifices
consentis pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui*

*A mon soutien moral, à celle qui a toujours été là pour guider mes pas, source de
positivité et de sagesse, ma grande sœur Ferial*

*A mon pilier, à celui qui a su me protéger à chaque instant de ma vie, source de
générosité et de délicatesse, mon grand frère Nassim*

*Au meilleurs amis du monde, Hanane, Nissette, Zohir et Mami, qui, grâce à
leurs personnalités pétillantes pleines de gaieté ont pu semer des roses sur un
parcourt remplis d'embûches*

*A mes coéquipières et amies Dassylia et Syla qui grâce à leur nature rayonnante,
ce parcourt était des plus agréables*

A mon binôme Rabah et toute sa famille

A tous ceux et toutes celles qui me sont chers...

Imene

Dédicaces



*A mes chers parents pour leur amour et leur support continu.
Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de notre
profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour
nous.*

A mes sœurs Nawal et Souad et les petits anges neveux

A ma chère Chanez et sa famille

A mes frères Lamine et Smail

A mes beaux frères Karim et Moussa

A toute ma famille proche

A mes chers amis Iyes, Amine et Ferhat

A mes collègues de travail Samir et Norddine

A ma binôme Imene et sa famille

A tout les collègues et amis de notre promotion BM

Rabah.

Remerciements

Après avoir rendu grâce à dieu le tout puissant, nous tenons à remercier vivement tous ceux qui, de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce travail, en particulier :

Madame BOUCHERBA Nawel qui nous a laissé une large part d'autonomie dans ce travail tout en nous aiguillant sur des pistes de réflexions larges et porteuses.

Monsieur BENHOULA Mohammed pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique, & son sens d'écoute et d'échange,

Aussi nous tenons à remercier vivement,

A toutes les belles personnes du "Laboratoire de microbiologie appliquée" (LMA) de l'université de Béjaïa, en particulier Mlle AZZOUC Zahra & HAMMA Samir, qui nous ont fait bénéficier d'une formation pluridisciplinaire, de très haut niveau et très adaptée aux réalités de notre spécialité,

L'ensemble de nos professeurs, pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont prodigué au cours de ces cinq années passées à l'université Abderrahmane Mira

Tout le corps administratif du département de microbiologie pour leurs accueil chaleureux et orientations.

On remercie les membres du jury d'avoir accepté d'examiner notre travail.

De tout le fond de notre cœur, nous vous remercions infiniment.

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Partie 1 : Synthèse bibliographique	
I. Margines.....	2
I.1.Définition des margines.....	3
I .2.Composition des margines.....	4
I .2.1.Fraction minérale.....	4
I .2.2.Fraction organique.....	4
I .3.Valorisation des margines.....	5
I .3.1.Utilisation des margines comme fertilisant.....	6
I .3.2.Utilisation des margines en compostage.....	6
I .3.3.Récupération de quelques composants.....	6
I .3.4.Obtention de biogaz.....	7
II .Actinobactéries.....	8
II .1.Définition et caractéristiques.....	8
II .2.Taxonomie des actinobactéries.....	10
II .2.1.Evolution de la taxonomie des actinobactéries.....	10
II .2.2.Critères actuels d'identification.....	11
II .2.2.1. Morphologiques.....	11
II .2.2.2. Chimio –taxonomiques.....	12
II .2.2.3. Physiologiques.....	12
II .2.2.4. Moléculaires.....	12
II .3.Importances industrielles des actinomycètes.....	12
III. Lipases	13
III .1.Définition et généralités sur les lipases.....	13
III .2.Intérêt industriel des lipases.....	14
IV. Plans d'expériences.....	15

IV.1.Définition.....	15
IV.2.Méthodologie expérimentale.....	16
IV.3. Avantages d'un plan d'expérience.....	16
IV.4.Optimisation.....	17
IV .5.Plan de Box-Behnken.....	17
Partie 2 :Matériel et méthodes	
I. Matériel.....	18
I. 1. Matériel analytique.....	18
I.2. Margines.....	18
I. 3. Matériel biologique.....	18
II. Méthodes.....	18
II.1. Prélèvement d'échantillons.....	18
II.2. Isolement et sélection des actinomycètes lipolytiques	19
II.2. 1.Prétraitement des échantillons.....	19
II.2. 2.Préparations des dilutions décimales.....	19
II.2. 3.Milieus d'isolement.....	19
II.2. 4.Ensemencement et incubation.....	19
II.3.Purification.....	19
II. 4. Etude morphologique de l'isolat.....	20
II. 4.1. Observation macroscopique.....	20
II.4.2. Observation microscopique.....	20
II.5. Production de lipases.....	20
II.5.1.Screening sur milieu de culture solide.....	20
II.5.2.Screening sur milieu de culture liquide et suivi de l'activité lipolytique.....	21
II.5.2. 1.Préparation de la solution substrat.....	21
II.5.2.2.Préparation de la pré-culture.....	21
II.5.2.3. La mise en culture.....	21
II.6. Dosage de l'activité lipasique.....	21

II.7. Préparation des suspensions sporales et dénombrement	22
II.8. Cinétique de croissance de l'isolat et de production de lipase.....	22
II.9. Optimisation de la production de la lipase par un plan d'expérience...	23
II.9.1. Choix des paramètres influents sur la production de la lipase dans un milieu à base de margine.....	23
Partie 3 : Résultats et discussions	
I. Isolement et sélection des actinobactéries.....	25
I.1. Prétraitement des échantillons.....	25
I.2. Isolement et screening des actinobactéries lipolytiques.....	25
II. Observation macroscopique et microscopiques.....	26
III. Recherche des lipases	28
III.1. Criblage sur milieu solide et liquide par mesure de l'activité lipolytique	28
III.2. Cinétique de croissance de l'isolat et de production des lipases.....	31
IV. Optimisation de la production des lipases par plan Box Behnken.....	32
IV.1. Paramètres opératoires.....	32
IV.2. Analyse de variance et coefficient de corrélation.....	34
IV.3. Détermination du modèle mathématique.....	36
IV.4. Etude des effets d'interactions significatives.....	37
IV.5. Validation du modèle.....	40
Conclusion générale et perspectives.....	41
Références bibliographiques.....	43
Annexes	
Résumé	

Liste des tableaux :

Tableau I : Composition chimique des margines.....	5
Tableau II : Coefficient de Chargaff (GC%) des différents genres d'actinobactéries.....	10
Tableau III : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés.....	23
Tableau IV : Matrice d'expérience pour k=5.....	23
Tableau V : Les 13 souches obtenues après isolement.....	25
Tableau VI : Résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des isolats.....	26
Tableau VII: Résultats des diamètres des zones d'hydrolyse dans un milieu solide.....	29
Tableau VIII: Activité lipasique des 13 souches.....	29
Tableau IX : Cinétique de croissance et l'activité lipasique de la souche SC aok 10 ⁻⁴	31
Tableau X : Matrice d'expériences pour k= 5 et un nombre d'expériences N= 43.....	33
Tableau XI: Analyse de variance.....	34
Tableau XII : Statistiques d'ajustement.....	35
Tableau XIII : les coefficients de régression.....	36
Tableau XIV : Coefficients de régression après exclusion des termes non significatifs.....	37
Tableau XV : Les solutions.....	40

Liste des figures :

Fig.1 : Schéma extraction des margines.....3
 Fig.2 : Les margines.....4
 Fig.3 : Valorisation des margines.....5
 Fig.4 : Schéma de l'impact des margines sur l'environnement.....7
 Fig.5 : Actinobactéries.....9
 Fig.6 : Types de spores chez les actinobactéries.....9
 Fig.7 : Cycle de vie des actinobactéries.....13
 Fig.8 : Aspect macroscopique des isolats sur milieux ISP2 et M2.....27
 Fig.9 : Observation au microscope optique au grossissement (10*100) de la coloration de Gram de l'isolat ES3 10^{-5}28
 Fig.10 : Activité lipasique d'actinobactéries sur milieu à base de tributyrine....
 Fig.11 : Activité lipasique des 4 souches sélectionnées.....30
 Fig.12 : Cinétique de croissance et l'activité lipasique de la souche SC aok 10^{-4} 31
 Fig.13 : Représentation graphique des réponses prédites en fonction des réponses réelles.....35
 Fig.14 : Surface de réponse de l'interaction X_1X_337
 Fig.15 : Surface de réponse de l'interaction X_2X_338
 Fig.16 : Surface de réponse de l'interaction X_2X_438
 Fig.17 : Surface de réponse de l'interaction X_3X_439
 Fig.18 : Surface de réponse de l'interaction X_2X_539
 Fig.19 : Surface de réponse de l'interaction X_1X_4

Liste des abréviations :

- BHA : Beta hydroxy acid
- CO₂ : Dioxyde de carbone
- DCO : Demande chimique en oxygène
- CaCO₃ : Carbonate de calcium
- NaOH : L'hydroxyde de sodium
- Rpm : Rotations par minute
- Ma : Mycélium aérien
- Ms : Mycélium du substrat
- V/V : Volume par volume
- µl : Microlitre
- L : Litre
- M : Molaire
- GC% : Pourcentage en Guanine-Cytosine
- °C : Degré Celsius
- pH : Potentiel d'hydrogène
- UFC : Unité formant colonie
- H : Heure
- Min : Minute
- % : Pourcentage
- nm : Nanomètre
- mM : Millimolaire
- µmol : Micromolaire
- mL : Millilitre
- N : normal
- p/v : poids par volume
- G : gramme
- AGL : acide gras libre

Arbre rustique, l'olivier a été un arbre sauvage, avant d'être domestiqué par l'homme. Pour ses fruits et pour l'huile qu'on en tire. Le nom scientifique de l'arbre, OLEA, vient d'un mot qui signifiait « huile » chez les grecs de l'antiquité (**Ruby et le francois., 2004**). Il y a aujourd'hui près d'un milliard d'oliviers (*Olea europaea* L.) cultivés à travers le monde et cela sur presque tous les continents. Plus de 90% des oliviers sont cultivés dans le bassin méditerranéen, notamment en Espagne, en Italie, en Tunisie, au Maroc et en Grèce (**VEILLET, 2010**). En plus de la production principale de l'industrie oléicole qui est l'huile d'olive vierge, il en résulte deux sous produits, solides appelés les grignons et liquides appelés les margines ou eaux de végétation. Jusqu'à présent, les margines qui sont des effluents chargés en matières organiques surtout en acides gras libres, matières minérales et en polyphénols constituent un problème environnemental majeur pour les pays producteurs de l'huile d'olive, ils sont généralement déversés dans les égouts d'assainissement ou épandus directement sur le sol sans aucun traitement ce qui implique le colmatage des sols, la pollution des eaux superficielles et souterraines et le dégagement d'odeurs nauséabondes .

Les microorganismes sont de remarquables agents de dégradation. En effet, dans leur environnement naturel, ils participent à la biodégradation de la matière organique, même la plus complexe et ce par production de divers enzymes extracellulaires (**Mswaka et Magan , 1998 ; Tuomela et al., 2000 ; Perez et al., 2002**). Avec l'essor de la biotechnologie, des procédés exploitant cette propriété microbienne ont été développés. Les microorganismes sont alors utilisés en biorémédiation afin de dépolluer l'environnement (**Lu et al. 2004 ; Opatokun et al. 2011**), ou en diverses industries pour des applications variées. Les bactéries de la famille des Actinomycètes retiennent particulièrement notre attention et semblent être d'excellentes candidates productrices de substances aux propriétés intéressantes. Ces bactéries à Gram positif, à haut coefficient de Chargaff (GC%), montrant une diversité morphologique marquée (**Goodfellow et O'Donnell, 1989**) ont principalement pour habitat naturel le sol où elles jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques (lignine, cellulose...), grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extra cellulaires tels que les amylases, les xylanases et les lipases, ces dernières (les lipases) qui sont produites par les genres *Serratia* , *Pseudomonas* , *Enterobacter*, *Fusarium* et *Alternaria*, restent parmi les biocatalyseurs les plus importants à effectuer des réactions dans les milieux aqueux et non aqueux. Cela est principalement dû à leur capacité à utiliser un large éventail de substrats, une grande stabilité à des températures élevées, au pH et aux solvants organiques.

Les lipases sont utilisés dans l'industrie agro-alimentaire (industrie laitière), l'industrie des détergents et même dans la production du biodiesel (**Berto et al., 1997 ; Gao et al., 2000 ; Prazeres et al., 2006; Zhang et al., 2007; Zhen-qian et Chun-yun , 2009**).

Un plan d'expérience constitue une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique. La méthodologie des plans d'expériences est basée sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats. L'intérêt majeur des plans d'expérience réside dans le fait qu'ils permettent d'optimiser le nombre d'expérimentations à réaliser lors de la phase d'essais, en déterminant au préalable les réels facteurs ou combinaisons de facteurs influents sur la réponse du système à étudier (**Linder, 2005**).

Ainsi, le principal objectif de ce travail tourne autour de l'optimisation de la production d'une lipase actinobactérienne sur milieu liquide à base de margines, pour ce faire nous avons réparti notre recherche en trois chapitres, dont :

- Une synthèse bibliographique dans laquelle nous avons touché, des généralités sur les actinobactéries, les lipases ainsi que les plans d'expériences.
- En 2^{ème} lieu nous avons mis en pratique l'aptitude des actinobactéries à produire des lipases et l'optimisation statistique de l'effet de plusieurs paramètres sur la production de cette enzyme par méthode des plans d'expériences.
- Une dernière partie pour une discussion des résultats.
- Enfin une conclusion générale.

I. Margines

I.1. Définition des margines

La margine est un liquide d'aspect trouble, de coloration brune-rougeâtre à noire, son odeur rappelle celle de l'huile d'olive, mais elle peut devenir gênante lors des phénomènes de rancissement ou de fermentation. Elle est caractérisée par un pH acide (3-5) et une très grande conductivité électrique. Sa couleur noire est due à la présence des polyphénols (**Lesage et al ; 2001**) Les margines (figure 1) peuvent être considérées comme un complexe chargé en matières organique et minérale. Les changements dans les caractéristiques des margines résultent du type du procédé d'extraction de l'huile, de la qualité, de la variété des olives et de la conduite des opérations d'extraction (**Fadil et al., 2003**), Les composés fondamentaux des margines sont l'eau (83-96%), les matières organiques (3.5-15%) et les sels minéraux (0.5-2%) (**Ángela et al., 2011**).

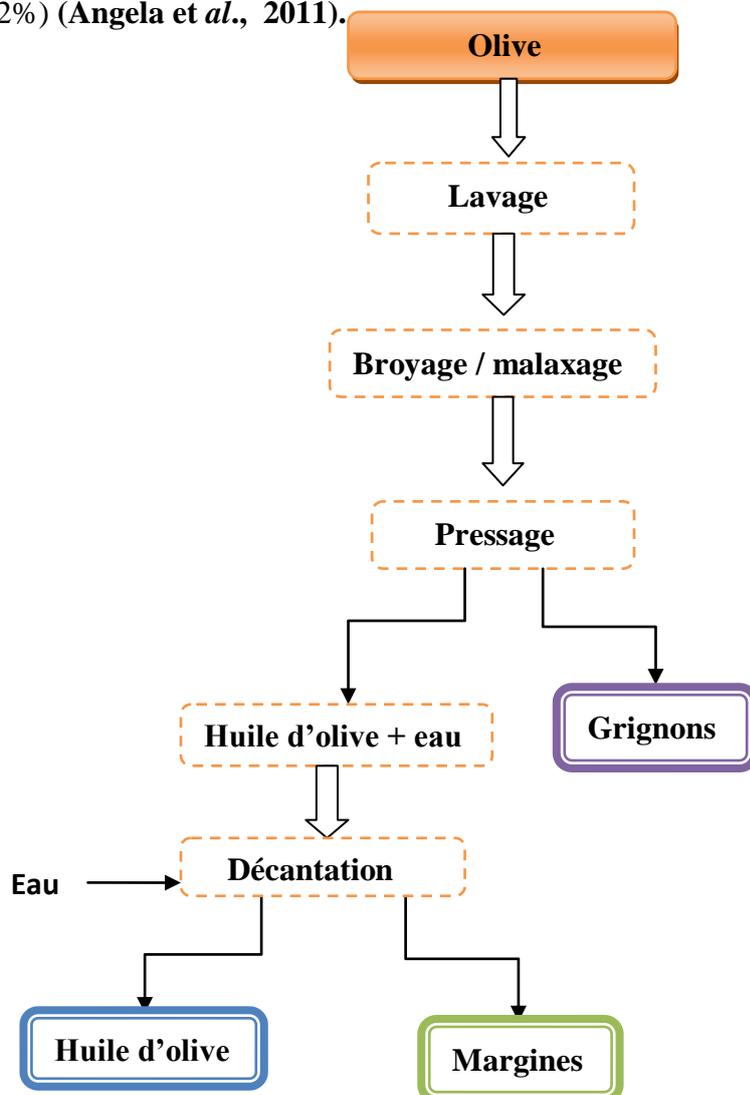


Figure 01 : Schéma d'extraction des margines



Figure 02 : les margines

I.2.Composition des margines

I.2.1.Fraction minérale

Les margines contiennent des quantités significatives de sels minéraux (**Hamdi et al., 1999**) dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures) et 20% insolubles (carbonates et silicates). Les éléments les plus représentatifs sont le potassium (47%), les phosphates (14%), les carbonates et le sodium (7%) (**Assas et al., 2009**).

I.2.2.Fraction organique

Les margines comportent deux fractions organiques : une fraction insoluble constituée essentiellement de pulpes d'olives qui représente la matière en suspension et colloïdale et une fraction soluble dans la phase aqueuse qui contient les sucres, les lipides, les composés azotés, les vitamines, les acides organiques et les composés phénoliques (**Leulmi, 2011**).

Les glucides sont essentiellement représentés par les composants pariétaux, en particulier la cellulose et les pectines, ces dernières jouent un rôle important dans la texture des olives où ils représentent environ 0,6 % du poids de la pulpe fraîche. Récemment de nombreux travaux ont montré que les margines sont très riches en sucres simples (**Leulmi, 2011**).

La composition chimique des margines est donnée dans le tableau suivant :

Tableau I: Composition chimique des margines

	Source (1)	Source (2)	Source (3)
Eau	83.5%	83.0%	88%
Matières organiques	14,7%	15%	10,5%
Matières minérales	1,8%	2%	1,5%
Matières azotées totales	2 - 8%	2,4%	1,25%
Matières grasses	0,03-0,8%	1,0%	0,1%
Polyphenols	-	1,5%	1,0%

Source (1) : Codounis, 1973.

Source (2) : Cucurachi, 1973.

Source (3) : Fiestas Ros de Ursinos, 1981.

I.3. Valorisation des margines

Les margines sont des eaux considérées très polluantes car fortement chargées en matières organiques, elles affectent particulièrement la qualité des eaux dans lesquelles elles sont déversées. Les eaux sont exposées au problème d'eutrophisation et le sol se colmate causant ainsi la destruction de la faune et de la flore, d'où l'importance du traitement ou de la valorisation de ces effluents (**Ranalli, 1991**), (figure 3).



Figure 03 : Valorisation des margines

I.3.1. Utilisation des margines comme fertilisant

Des expérimentations agronomiques menées avec des doses d'apport conforme aux règles de fertilisation, ont toutes montré l'effet favorable des margines sur la fertilité des sols, car d'une part, elles ne contiennent pas de métaux lourds et de microorganismes pathogènes, et d'autre part, elles sont riches en éléments minéraux nutritifs (K, N, P). En plus, comme elles sont constituées de matière organique, elles représentent un excellent substrat pour le développement de la microflore qui permet d'améliorer les propriétés physico-chimiques du sol (**Kuznetsova et al., 2007**)

I.3.2. Utilisation des margines en compostage

Le compostage est l'une des techniques de recyclage des margines. Ces dernières sont adsorbées sur un substrat solide avant d'être utilisés comme un compost (**Kuznetsova et al., 2007**) Donc, ce compost s'obtient principalement par une dégradation aérobie-anaérobie de substance organique des résidus solides (marges + résidus agricoles). Un temps de contact long permettra d'avoir de bons rendement (fixation de résidus agricoles dans les margines).

I.3.3. Récupération de quelques composants

Il s'agit en particulier de la récupération des composés aromatiques, phénoliques et des solutions de glucides, Les phénols et les substances antioxydantes sont des composés évaluables qui peuvent être utilisés en industries pharmaceutiques et cosmétiques (**Tanchev et al., 1980**). **Kuznetsova et al., 2007**) ont proposé l'utilisation d'un bioréacteur pour la production des antioxydants d'une pureté élevée qui sont ensuite convertis en composés pharmacologiques actifs. (**Turano et al., 2002**) ont mis au point un système intégré de centrifugation-ultrafiltration qui permet la réduction de la pollution et la séparation sélective de quelques produits utilisables (lipides, sucres et polyphénols).

L'extraction liquide-liquide a été utilisée pour obtenir des extraits de biophénols. D'après la procédure utilisée, 1 litre de marge permet d'obtenir un extrait contenant 1,2 gramme d'hydroxytyrosol et environ 0,4 gramme de flavonoïdes, qui peuvent être fractionné en produisant 1 gramme d'hydroxytyrosol purifié. Les composés aromatiques peuvent être aussi obtenus par distillation sous vide et les arômes sont récupérées par extraction par solvants (**Tanchev et al., 1980**).

Les extraits phénoliques obtenus ont été comparés aux antioxydants de synthèse, les plus connus tel que le BHA à partir des essais de résistance à l'oxydation. Il a été constaté que l'extrait de margine protège l'oxydation des huiles de manière plus efficace que l'addition du BHA. D'autre part, le coût de production de ces extraits est inférieur à celui des antioxydants de synthèse (Tanchev *et al.*, 1980).

I.3.4. Obtention de biogaz

Ce processus de digestion anaérobie implique la rupture de la substance organique, par des réactions biochimiques qui, permet de rompre les liaisons des grandes molécules afin d'en obtenir des petites, suivie d'une transformation en CH_4 CO_2 . C'est ainsi que 1 m^3 de margine à 70 kg de DCO produit 24,5 m^3 de méthane (rendement du DCO en méthane de 60% ou, 1 kg de DCO produit 0,35 m^3 de méthane) (Hamdi., 1991).

Ci-dessous un schéma résumant l'impact des margines sur l'environnement (figure 4)

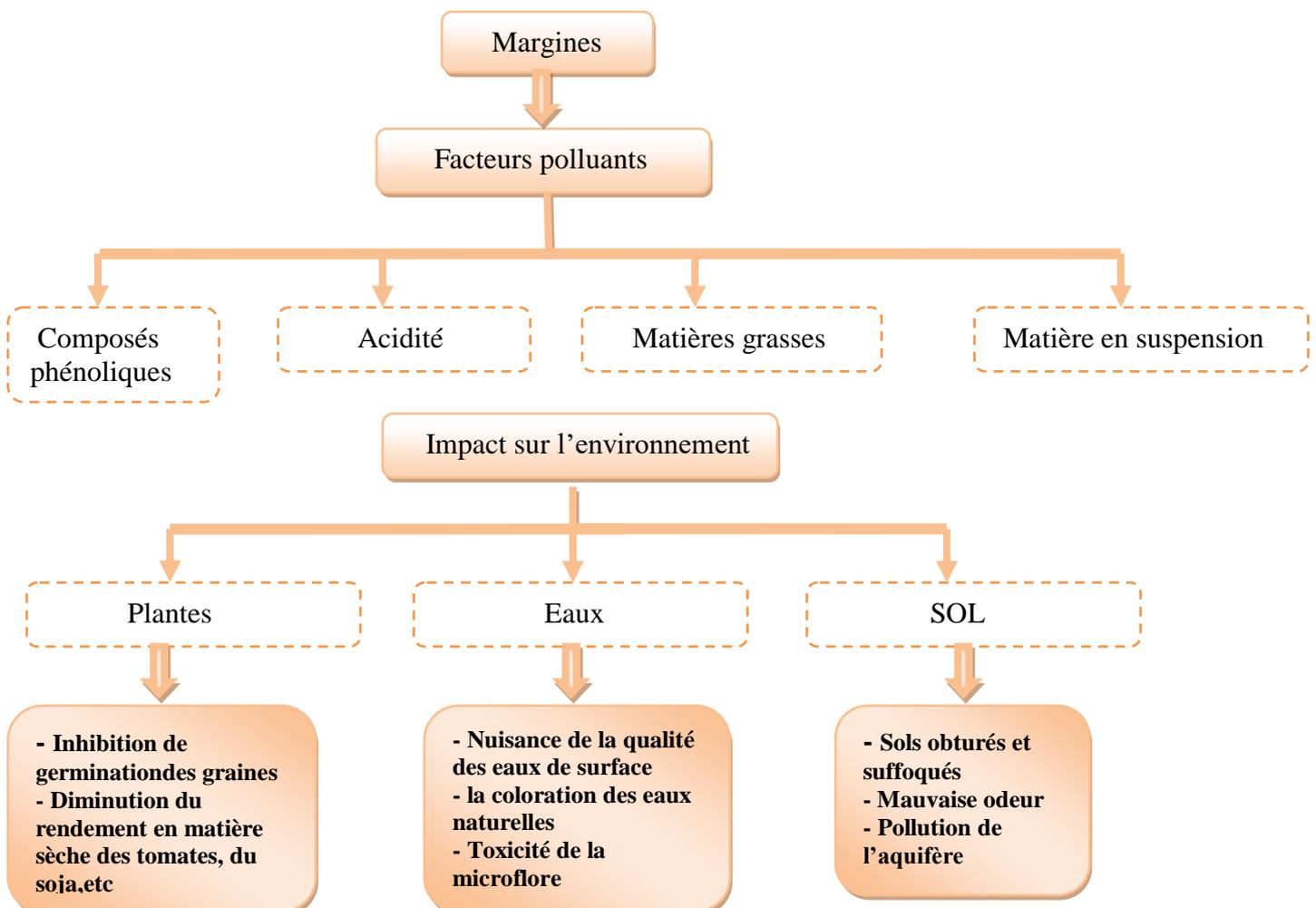


Figure 04 : schéma sur l'impact des margines sur l'environnement

II. Actinobactéries

II.1. Définition et caractéristiques

Les véritables Actinobactéries, également connus sous le nom d'actinobactéries, sont des microorganismes à coloration de Gram positif. Ils ont un type de croissance mycélien (les cellules produisent des filaments et des ramifications) rappelant celui des champignons filamenteux. Un des premiers organismes étudié dans ce groupe est le genre *Actinomyces* qui a donné son nom au groupe (**Jones et al., 2004**).

Bien que les actinobactéries soient des microorganismes procaryotes, leur morphologie ressemble fortement à celle des microorganismes eucaryotes comme les champignons filamenteux (**Osada, 1998**). La plupart des actinobactéries sont terrestres, certaines espèces sont marines (**Mincer et al., 2002**). Les actinobactéries sont répandus dans l'environnement et la plupart des espèces sont chimioorganotrophes, aérobies, mésophiles et croissent de façon optimale dans la gamme de pH 5,0 à 9,0 avec une proximité optimale à la neutralité (**Williams et Wellington, 1982a ; Goodfellow et Williams, 1983**). Les facteurs importants contrôlant l'abondance et l'activité des actinobactéries dans le sol sont : la disponibilité des nutriments, la nature et l'abondance de la matière organique, la salinité, la teneur en humidité relative, la température, le pH et la végétation du sol (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Leurs parois cellulaires, ne renferment ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimilique (formes oxydatives) et leur cytologie est celle des bactéries (**Labeda et al., 1985 ; Mariat et Sebald, 1990**).

Ils présentent des hyphes embranchés et des spores (**Betelli et al., 2013**). L'embranchement du mycélium peut se présenter sous deux formes : mycélium de substrat et mycélium aérien (**Alharbi et al., 2012**).

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

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

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

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

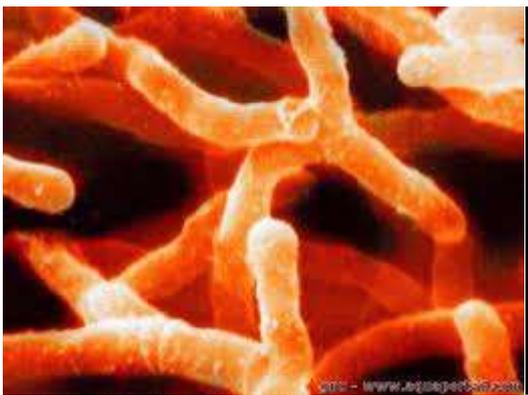


Figure 05 : Actinobactéries

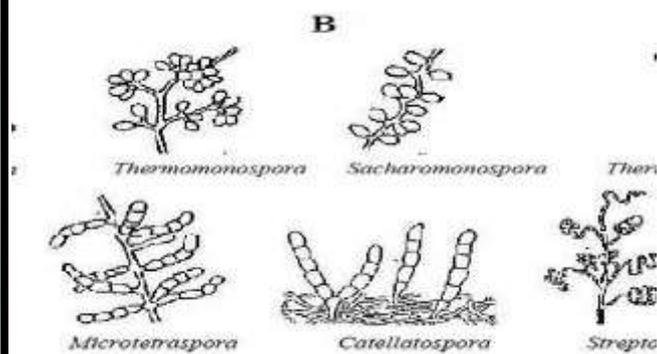


Figure06 : Types de spores chez les actinobactéries

Tableau II: Coefficient de Chargaff (GC%) des différents genres d'actinobactéries (**Larpent et Sanglier, 1989**)

Genre	G+C %
<i>Mycobacterium</i>	64-70
<i>Actinomyces</i>	63-73
<i>Nocardia</i>	67-69,4
<i>Streptomyces</i>	69-76
<i>Micromonospora</i>	71,4-72
<i>Actinoplanes</i>	70,6-76

II.2. Taxonomie des actinobactéries

II.2.1. Evolution de la taxonomie des actinobactéries

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

- Durant la première période, seuls les critères macro et micro morphologiques permettaient de différencier les genres entre eux. Ceci donna lieu à la création de nombreux genres dont les limites entre eux n'étaient pas toujours nettes ce qui créa beaucoup de confusion (**Waksman 1943 ; Couch et Bland, 1974**). Cette période s'est étendue jusqu'au début des années 60, (**Pridham et al., 1958 et Tresner et al., 1961**).
- La seconde période, qui a débuté à partir des années 60, a vu le développement de l'utilisation de la chimiotaxonomie basée sur la composition tels que les acides aminés (**Becker et al., 1964**), les sucres cellulaires (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**), les acides mycoliques, (**Mordarska et al., 1972**), les phospholipides membranaires (**Lechevalier et al., 1977 ; Collins et al., 1977**), les ménaquinones (**Collins et Jones, 1981**) et les acides gras (**Grund et Kroppenstedt, 1990**). Le métabolisme cellulaire était négligé durant cette période et seulement environ une dizaine de tests physiologiques étaient impliqués dans la différenciation des espèces. Les critères chimiques combinés aux

descriptions morphologiques, se sont révélés jusqu'à l'heure actuelle, très efficaces pour l'identification des genres d'actinobactérie.

- La troisième période, qui a débuté dans les années 70, avec une apogée entre 1980 et 1990, est caractérisée par l'avènement de la taxonomie numérique assistée par ordinateur, dans le but de clarifier l'identification des espèces de chaque genre. Contrairement à la période précédente, ici, le métabolisme cellulaire est d'une grande importance ; le principe consiste à traiter avec un logiciel approprié les résultats de plusieurs dizaines de tests physiologiques et biochimiques ; ce qui permet d'obtenir un dendrogramme montrant les pourcentages de similitude entre les espèces dont la position taxonomique a été clarifiée pour plusieurs d'entre elles (**Goodfellow et al., 1983; Athalye et al., 1985 ; Goodfellow et al., 1989 et Grund et Kroppenstedt, 1990**).
- La dernière période, qui a débuté durant les années 80, consiste à l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires. L'hybridation ADN-ADN, le séquençage de l'ARN ribosomique 16S et 23S et la détermination du coefficient de Chargaff ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes (**Stackebrandt et al., 1997 ; Kinoshita et al., 1999 et Hu et al., 2004**). Grâce au séquençage de l'ARN ribosomique 16S, certains genres bactériens non mycéliens furent inclus dans l'ordre des Actinomycetales, tandis que d'autres en furent exclus.

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

II.2.2. Critères actuels d'identification

II.2.2.1. Morphologiques

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

- La production d'un mycélium aérien (MA) ou non (**ex Actinoplanes, Micromonospora et Rhodococcus**) :
- La présence ou non de mycélium du substrat (MS) et la couleur du MA et du MS.
- La production et la couleur de pigments diffusibles dans le milieu de culture.
- La fragmentation ou non des mycéliums.
- La présence des spores (forme, mobilité, surface, disposition sur les hyphes, nombre) origine exogène ou endogène des spores (sporangies, des porophores, des sclérotés ou de synnemata).

II.2.2.2.Chimio -taxonomiques

La composition cellulaire en acides aminées, en sucres et en lipides...etc. (**Smaoui, 2010**).

II.2.2.3.Physiologiques

Tolérance au chlorure de sodium, croissance en différentes valeurs de température et de pH, recherche des enzymes et différents métabolites intermédiaires et terminaux. (**Smaoui, 2010**).

II.2.2.4.Moléculaires

Détermination du (G+C)%, séquençage des gènes de l'ARNr 16S, Hybridation ADN-ADN (**Smaoui, 2010**).

II.3.Importances industrielles des actinobactéries

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

L'hétérogénéité métabolique des actinobactéries et leur diversité écologique assez exceptionnelle font d'eux des producteurs potentiels de nouvelles activités et spécificités enzymatiques (**Peaczinska-czoch et Mordarski, 1988**). Après les antibiotiques, les enzymes

représentent le second grand groupe de produits industriels synthétisés par les actinobactéries. En effet, ce sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que des protéases, des chitinases (Tanaka et Omura, 1990 ; Vonothini et al., 2008), des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (Park et al., 2002).

Les actinobactéries peuvent dégrader des composés organiques naturels, grâce à la production d'enzymes. Ceux-ci leur permettent d'utiliser des substrats comme les féculents, les matières grasses. Certaines espèces peuvent utiliser la pectine, la kératine, la chitine, la lignine, la cellulose et l'hémicellulose comme sources de carbone (Shouvik et al., 2012). Cependant, la production d'enzymes reste très coûteuse en raison du coût élevé de la matière première, qui représente entre 40% et 60% du coût de production. Dans cette perspective, l'apport d'une solution à la problématique de gestion des déchets agroindustriels et faire d'eux une matière première pour la production d'enzymes demeure une question capitale (Habbeche, 2014).

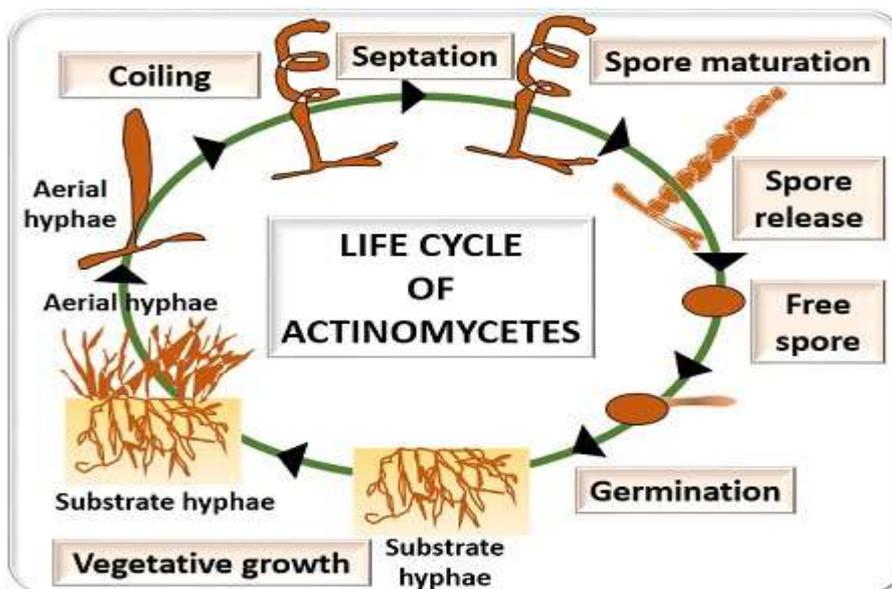


Figure 07 : cycle de vie des actinobactéries

III.Lipases

III.1.Définition et généralités sur les lipases

Encore appelées triacylglycérols acyl hydrolases (EC.3.1.1.3) (Thakur, 2012) les lipases sont des enzymes lipolytiques extracellulaires, ils appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxylique, qui peuvent agir d'une part comme hydrolases en milieu aqueux et d'autre part comme des catalyseurs dans un milieu organique sur des échelles de temps plus rapides et plus efficaces. Lagrari, C. (2019). Ces enzymes ont une capacité qui

permet d'aider les réactions chimiques à se produire plus facilement. Les lipases sont de nature hétérogène présentes chez tous les organismes vivants, jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides, elles sont largement répandues dans la nature qu'elles soient d'origine microbienne, animale, végétale, ce qui augmente leurs potentialités d'être utilisées dans de nombreuses applications d'importance industrielle. **(Cordova Lopez, 1998).**

La structure des lipases a été déterminée par cristallogénèse et diffraction des rayons x **(Najjar, 2010)**. Toutes les lipases connues à ce jour présentent une organisation tridimensionnelle commune composée d'un feuillet bêta centrale formé de huit brins parallèles connectés entre eux par des hélices alpha **(Najjar, 2010)**.

Ces enzymes présentent une grande spécificité au substrat et dégradent souvent des esters du p-nitrophenyl de l'acyle, Tweens et phospholipides avec une sélectivité vis-à-vis de la position stéréo de la longueur de chaîne. Les lipases ressemblent aux estérases, se différencient par leur capacité d'agir sur les esters insolubles dans l'eau **(Bornsheur et al., 2002 ; Petersen et Daniel, 2006)**.

Les lipases d'origine microbiennes sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram (+) que par des bactéries Gram (-). Elles sont également répandues chez les levures ainsi que chez les champignons filamenteux **(Lawrence et al, 1967)** L'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé de s'accroître au cours de ces dernières années, principalement en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent dans des domaines très variés **(Sharma R et al ; 2001)**. Les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, d'avoir des procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animale et d'autre part, d'avoir une grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques. Ces caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications pour les lipases microbiennes qui ont abouti à de nombreux produits commerciaux **(Jaeger et al., 1994; Jaeger et Eggert, 2002)**.

III.2.Intérêt industriel des lipases

White et White ont listé 34 lipases commerciales de 34 sources différentes, dont 18 sont d'origine fongique et 7 d'origine bactérienne, les lipases figurent parmi les classes les

plus importantes d'enzymes pour le monde industriel, cet intérêt provient principalement du fait que les lipases possèdent des propriétés catalytiques atypiques d'une part, et d'autre part les technologies à mettre en œuvre par les produits sont relativement simple; leurs domaines d'application sont donc très vastes et variés (**Rihani,2012**)

Les lipases sont classées après les protéases et les glycosidases dans le commerce des enzymes et occupent 5 % de ce marché. Les développements dans la purification, l'identification, la caractérisation, et la classification des lipases, ainsi que dans le domaine de l'expression de protéines, ont rendu possible la production de quantités élevées de lipase et leur utilisation comme biocatalyseurs dans des applications biotechnologiques modernes, comme dans l'industrie pharmaceutique (biosenseurs, substituts d'enzymes endogènes) l'industrie chimique tels que les produits cosmétiques, cuir, papier, oléochimie, production de monoglycérides, détergent (l'utilisation des lipases dans les détergents est le champ d'application le plus important (**Jaeger et Reetz, 1998 ; Najjar, 2010**), elles sont capables, en effet, de fragmenter en petites particules les taches de graisse, tels que le rouge à lèvres, le beurre, l'huile et des produits de beauté. Le bain de lessive pourra ensuite évacuer ces particules (**Sharma et al., 2001 ; Fickers et al., 2008**). les sciences biomédicales, en environnement dans le domaine de la bioremédiation qui est devenue la méthode la plus utilisée pour restaurer des environnements pollués, et enfin dans l'industrie alimentaire et laitière (fromage, beurre, margarine, boissons alcooliques) (**Bornscheuer et al., 2002b**).

IV. Plan d'expériences

IV.1.Définition

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt y et des variables x_i . Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse. Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur. Les principes fondamentaux de cette science seront indiqués et les principaux plans seront passés en revue. La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées (**Revue MODULAD, 2006 Jacques GOUPY**). L'objectif principal de cette méthode

peut être résumé par la devise « obtenir un maximum d'informations en un minimum d'expériences » (**W. Tinsson et al 2010**).

Pour qu'un plan d'expériences soit utilisable, il est nécessaire qu'il remplisse certaines conditions, dont la première est l'orthogonalité : En effet, il est essentiel pour ne pas introduire de biais dans le calcul des effets, que chaque niveau d'un facteur soit associé à tous les niveaux de l'autre, le même nombre de fois. Cette condition d'orthogonalité, est indispensable pour pouvoir calculer les effets d'un facteur, indépendamment des autres. On peut même ajouter, que toute l'astuce d'un plan d'expériences consiste à tester facilement l'effet d'un facteur pendant l'estimation de l'effet d'un autre facteur (**Goupy, 2006**)

IV.2.Méthodologie expérimentale

La démarche à respecter est la suivante :

- Définition de l'objectif.
- Choix des réponses expérimentales.
- Choix des facteurs et du domaine expérimental d'intérêt.
- Etablir la stratégie expérimentale.
- Construction de la matrice d'expériences.
- Expérimentation.
- Calcul des estimations des informations recherchées.
- Interprétation des résultats

IV.3. Avantages d'un plan d'expérience

Un plan d'expériences a pour avantages :

- La diminution de nombre d'essais
- La déduction des paramètres influents
- La possibilité d'évaluer les effets des interactions entre les paramètres
- Une meilleure précision des résultats
- La modélisation mathématique de l'expérience
- La prédiction et l'optimisation (**Goupy, 1999**)

La méthode des plans d'expériences permet une interprétation rapide et sans équivoque en fournissant un modèle expérimental précis du système étudié.

IV.4.Optimisation

Cette stratégie correspond à la modélisation du phénomène sous la forme d'une relation empirique qui permet de déterminer la valeur de la réponse en tout point du domaine expérimental sans qu'on soit obligé de faire l'expérience. Ainsi, l'expérimentateur peut accéder à la zone la plus intéressante du domaine (**Iboukhoulef, 2014**).

aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

IV .5.Plan de Box-Behnken

Un plan de Box-Behnken est un type de plan de surface de réponse qui ne contient pas un plan factoriel fractionnaire ou un plan factoriel imbriqué.

Dans le cas d'un plan de Box-Behnken, les points d'un plan se situent à des combinaisons des niveaux de facteurs supérieur et inférieur et de leurs points centraux.

Les plans de Box-Behnken possèdent des combinaisons de traitement qui sont situées aux points centraux des bords de l'espace expérimental et qui requièrent au moins trois facteurs (**Samed, 2011**).

Dans cette partie nous décrivons le matériel analytique et biologique ainsi que les méthodes utilisées relatives à notre travail expérimental, Qui a été réalisé au sein du laboratoire de recherche « Laboratoire Microbiologie Appliquée » (LMA) de l'université de Bejaia.

Nous avons effectué des isolements de souches d'actinobactéries à partir de trois échantillons (grignons d'olive, sol contaminé et les effluents de margines), par la suite les souches isolées ont fait l'objet d'un criblage sur milieu solide et liquide afin de sélectionner les isolats les plus performants pour la production des lipases.

I. Matériel

I. 1. Matériel analytique

L'appareillage, les réactifs et milieux de culture utilisés dans cette étude sont cités en (Annexes).

I.2. Les margines

Les margines utilisées proviennent d'une huilerie moderne de la région de N'gaous wilaya de Batna pendant la récolte saisonnière oléicole (février 2020-2021). Les échantillons de margines ont été prélevés à partir d'un bac de stockage des margines et transportés dans un récipient propre, puis ont été conservés à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leurs utilisation.

I. 3. Matériel biologique

Les isolats d'actinobactéries utilisés dans cette étude ont été prélevés à partir de trois échantillons cités ci-dessus dans deux régions différentes Souk El Ténine et Aokas wilaya de Bejaia, puis ont été conservés au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'université de Bejaia (LMA).

II. Méthodes

II.1. Prélèvement d'échantillons

Les échantillons destinés à l'isolement des microorganismes lipolytiques, ont été prélevés à partir d'un sol contaminé et des effluents issus du processus de traitement des olives. Ainsi de la plusieurs prélèvements ont été réalisés au niveau de la région de Souk EL Ténine et Aokas wilaya de Bejaia, Les échantillons sont acheminés au laboratoire dans des récipients stériles.

II.2. Isolement et sélection des actinobactéries lipolytiques

II.2.1. Prétraitement des échantillons

1 g d'un échantillon du sol séché à 60°C pendant 60 min est mélangé avec 0,1 g de CaCO₃ et incubé à 37°C pendant 4 à 7 jours. Cela conduit à une augmentation de 100 fois des colonies d'actinobactéries. En même temps se produit une diminution de la flore fongique. Quant aux bactéries, la plupart ont été éliminées par l'étape de séchage de l'échantillon (El-Nakeeb et Lechevalier, 1963).

II.2.2. Préparation des dilutions décimales

Pour chaque échantillon, 1g de sol est introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile (Annexe II), les tubes sont ensuite agités au vortex 4 à 5 minutes, à vitesse maximale. Cette suspension est considérée comme étant la solution mère. Une série de dilutions décimales est ensuite effectuée pour l'échantillon de sol de 10⁻¹ jusqu'à 10⁻⁵.

II.2.3. Milieux d'isolement

L'isolement d'actinobactéries à partir d'échantillons traités a été réalisé sur deux milieux différents : ISP2 et M2 (Annexe III).

II.2.4. Ensemencement et incubation

0,25 µl de chaque dilution est ensemencé à la surface des boîtes de pétri contenant l'un des deux milieux de culture, les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pour le milieu ISP2 et 45°C pour le milieu M2.

II.3. Purification

Les colonies qui ont montré une couleur et un aspect caractéristiques sont sélectionnées parmi l'ensemble des isolats obtenus sur milieux ISP2 et M2, tous sont retenus pour un repiquage jusqu'à l'obtention de souches pures.

Les isolats purs sont ensuite nommés et groupés en fonction de leur dilution et leur site de prélèvements.

II.4. Etude morphologique de l'isolat

II.4.1. Observation macroscopique

Cette étude est réalisée par observation à l'œil nu de la taille, la forme, la couleur et l'aspect des colonies sur milieu solide.

II.4.2. Observation microscopique

Cette étude est réalisée par l'observation sous microscope optique à l'objectif (x100) de la forme et de la disposition des bactéries à la suite d'une coloration de Gram. Les bactéries qui apparaissent en violée sont dites « Gram positif » et celles qui présentent une couleur rose sont appelées « Gram négatif ». La méthode est présentée dans (l'Annexe IV).

II.5. Production de lipase

Les isolats sont cultivés sur milieu solide (sélection qualitative) et liquide (sélection quantitative), selon la méthode de (akram *et al.*, 2006).

II.5.1. Screening sur milieu de culture solide

Les isolats qui ont été purifiés, ils seront repiqués sur un milieu à base de tributyrine (Annexe III) afin de visualiser l'activité des lipases, puis incubé à 37°C et 45°C selon la souche sélectionnée (Ayinla *et al.*, 2017).

II.5.2. Screening sur milieu liquide et suivi de l'activité lipolytique

De nombreuses méthodes destinées à mesurer l'activité des lipases sur milieu liquide, la plupart sont basées sur la production des acides gras (AGL) (Pabai, 1997 ; Vardanega *et al.*, 2008 ; Nwuche and Ogbonna, 2011; Hasan *et al.* 2013).

II.5.2.1. Préparation de la solution substrat

Dans un bécher d'un litre, on porte à l'ébullition 1L d'eau distillé. Sous agitation, 20g de la gomme arabique est versée en pluie. Quand la gomme arabique est dispersée, la solution est laissée sous agitation dans un cristalliseur remplie de glace jusqu'à ce que la solution soit clarifiée.

L'émulsion d'huile d'olive est préparée par l'ajout de 10 ml d'huile d'olive dans 90 ml de la solution de la gomme arabique, le mélange est agité 4 fois pendant 1 minute en

s'arrêtant 30 secondes entre deux agitations successives pour éviter l'échauffement de l'émulsion. (Cardenas,2001 ;Sefha,2011).

II.5.2.2.Préparation de la pré-culture

Dans le but de sélectionner la souche d'actinobactérie la plus performante en terme de production de lipase , une pré culture a été préparée par l'ensemencement de milieu de culture liquide à base d'huile d'olive (Annexe III), avec des colonies bactériennes prélevées a partir du milieu solide ISP3(Annexe III) à l'aide d'une anse de platine stérile, ensuite le milieu a été incubé a 37°C et 45°C dans un Shaker à 150 rpm pendant 4 à 7jours. Des suspensions bactériennes de 10^6 UFC/ml, ont été préparées.

II.5.2.3.Mise en culture

Les isolats potentiellement producteurs de lipases servent à ensemencer 20ml du milieu liquide à base de margines contenu dans des flacons en raison de 10% de la suspension bactérienne, ensuite les flacons sont incubés à 37°C et 45°C dans un shaker à 150 rpm pendant cinq jours (Shivareddy et al., 2010 ; Sirisha et al.,2010) .

II.6.Dosage de l'activité lipasique

1ml de bouillon de chaque culture microbienne des isolats est centrifugé à 4000 rpm pendant 30 min par une centrifugeuse de type NF400 / 400R Le surnageant de la culture est collecté dans des tubes à essais propres et utilisé immédiatement comme source de lipase brute pour les essais titrimétriques afin de doser l'activité de lipases (Sirisha et al. 2010).

Afin de mesurer l'activité de la lipase on a opté pour la méthode titrimétrique en prenant l'huile d'olive en tant que substrat à pH 7. Cette analyse a été faite selon la méthode (Aly et al., 2012), où le milieu réactionnel est préparé dans des Erlenmeyers : 0,5 ml de surnageant est additionné à un mélange préparé par 5 ml d'huile d'olive émulsionnée dans la gomme arabique à 10 % (p / v), 5 ml de tampon phosphate à 0,2 mol/L et à pH 7.

Parallèlement, le témoin est préparé en remplaçant le surnageant par 0,5 ml de l'eau distillée. Le milieu réactionnel et le témoin sont incubés dans un Shaker à 150 rpm. Après 30 min, la réaction est stoppée et les AGL sont extraits par l'ajout de 1 ml de la solution acétone éthanol (v/v) puis tourbillonnant le contenu rapidement. 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine (comme indicateur coloré de pH) sont additionnées à chaque mélange réactionnel et au témoin ensuite, ils sont titrés par une solution de NaOH à 0.1 N Jusqu'à changement de couleur vers rose claire à pH neutre.

L'activité lipasique est calculée selon la formule :

$$\mu 0 = \text{Activité } (\mu\text{mol/l. min}) = (V_s - V_B) \cdot N \cdot 1000 / V_R \cdot T$$

VS : volume de NaOH consommé pour le titrage de volume réactionnel.

VB : volume de NaOH consommé pour le titrage de témoin (blanc).

N : normalité de NaOH.

1000 : facteur de conversion de mmol au μmol .

VR : volume réactionnel (10,5 ml).

T : temps de la réaction (30 min).

Une unité (U) de lipase est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μmol d'acides gras par minute dans les conditions de la réaction (**Pinsirodom et Parkin, 2001**).

II.7. Préparation des suspensions sporales et dénombrement

Elle est effectuée par récupération des spores à partir de cultures d'actinomycète sur milieu (FBMS) en boîtes de Pétri ; en ajoutant une solution stérile d'eau distillée, à raison de 10 ml/boîte de Pétri. À l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose afin d'obtenir des suspensions sporales (**Machehalek et al., 2015**).

II.8. La cinétique de croissance de l'isolat et de production de lipase

L'étude de la croissance des souches bactériennes a été réalisée dans le but de révéler le comportement de la souche SC et de quantifier la production de lipases en fonction de croissance dans le milieu préparé. Cette cinétique de croissance est déterminée par la mesure de la densité optique à 600 nm chaque 24h pendant 10 jours.

II.9. Optimisation de la production de lipase par un plan d'expérience.

II.9.1. Choix des paramètres influents la production de la lipase dans un milieu à base de margine

Dans le but d'avoir une meilleure activité enzymatique, nous avons tenté d'optimiser les conditions de culture d'actinobactéries à savoir : la température ($^{\circ}\text{C}$), le pH, le temps d'incubation (jour), le taux d'inoculum (spores / ml) et la concentration initiale en margine (%) Les valeurs extrêmes de ces derniers sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau III : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés :

Paramètres opératoires	Niveau minimal	Centre	Niveau maximal
Z1	30 °C	37°C	44 °C
Z2	4	7	10
Z3	4 jr	7jr	10 jr
Z4	10 ⁵ spores/ml	10 ⁷ spores/ml	1,99 10 ⁷ spores/ml
Z5	5%	25%	45%

La matrice d'expériences pour k=5. $N=2k(k-1) + C0$ avec k : nombre de facteur, C0 : nombre de répétition des valeurs centrales = 3. Donc : 43 essais.

Quarante trois milieux de culture à base de margine à des paramètres variables ont été préparés selon la matrice des expériences présentée dans le tableau suivant :

Tableau IV: Matrice d'expérience pour k=5

Essais	Run	Facteur 1 A:Température °C	Facteur 2 B:pH	Facteur 3 C:Temps d'incubation Jour	Facteur 4 D:Taux d'inoculum spores/mL	Facteur 5 E:Source de carbone %
34	1	44	7	7	10 ⁷	5
26	2	44	7	7	10 ⁵	25
30	3	37	7	10	10 ⁷	5
9	4	37	4	7	10 ⁷	5
20	5	37	7	7	1,99 10 ⁷	45
43	6	37	7	7	10 ⁷	25
28	7	44	7	7	1,99 10 ⁷	25
37	8	37	4	7	10 ⁵	25
25	9	30	7	7	10 ⁵	25
39	10	37	4	7	1,99 10 ⁷	25
3	11	30	10	7	10 ⁷	25
5	12	37	7	4	10 ⁵	25
8	13	37	7	10	1,99 10 ⁷	25
16	14	44	7	10	10 ⁷	25
27	15	30	7	7	1,99 10 ⁷	25
41	16	37	7	7	10 ⁷	25
17	17	37	7	7	10 ⁵	5
11	18	37	4	7	10 ⁷	45
40	19	37	10	7	1,99 10 ⁷	25
14	20	44	7	4	10 ⁷	25
15	21	30	7	10	10 ⁷	25
2	22	44	4	7	10 ⁷	25
35	23	30	7	7	10 ⁷	45
18	24	37	7	7	1,99 10 ⁷	5
21	25	37	4	4	10 ⁷	25
23	26	37	4	10	10 ⁷	25

7	27	37	7	4	$1,99 \cdot 10^7$	25
19	28	37	7	7	10^5	45
38	29	37	10	7	10^5	25
13	30	30	7	4	10^7	25
33	31	30	7	7	10^7	5
10	32	37	10	7	10^7	5
1	33	30	4	7	10^7	25
12	34	37	10	7	10^7	45
32	35	37	7	10	10^7	45
29	36	37	7	4	10^7	5
42	37	37	7	7	10^7	25
24	38	37	10	10	10^7	25
31	39	37	7	4	10^7	45
6	40	37	7	10	10^5	25
36	41	44	7	7	10^7	45
4	42	44	10	7	10^7	25
22	43	37	10	4	10^7	25

Le modèle du second degré à développer à 5 facteurs s'écrit :

$$\hat{Y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{15}X_1X_5 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{25}X_2X_5 + b_{34}X_3X_4 + b_{35}X_3X_5 + b_{45}X_4X_5 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2 + b_{55}X_5^2$$

Avec:

\hat{Y} : Activité lipasique U/L

X_1 : Température

X_2 : pH

X_3 : Temps d'incubation

X_4 : Taux d'inoculum

X_5 : Source de carbone

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion et interprétation respectives.

I. Isolement et sélection des actinobactéries lipolytiques

I.1. Prétraitement des échantillons

Il a été constaté que le nombre d'actinobactéries est plus élevé lorsque les échantillons sont traités par rapport aux échantillons non traités (**El-Nakeeb et Lechevalier, 1963**).

Le traitement chimique au carbonate de calcium (CaCO_3) rend les milieux moins favorables à la croissance des bactéries autres que les actinobactéries et donc minimise les contaminants, (**El-Nakeeb et Lechevalier, 1963 ; Cavalla et Eberlin, 1994**).

I.2. Isolement et screening des souches d'actinobactéries lipolytiques

D'après certains auteurs une technique universelle d'isolement des actinobactéries n'existe pas, c'est pour cela qu'il faut toujours varier les milieux d'isolement dans un même screening, dans notre étude les milieux ISP2 et M2 sont utilisés, afin de réussir l'isolement de la flore actinomycétale qui compose l'échantillon étudié (**Boudemagh, 2007**).

Dans notre étude, 13 isolats ont été obtenus par la méthode des suspensions-dilutions et ce à partir des quatre échantillons, sol contaminé, grignons, les effluents de margines et les échantillons qui appartiennent au LMA.

Tableau V: Les 13 souches obtenues après isolement :

Souches	Origine	Température d'incubation (°C)
ES3 2C	Souk El Ténine	45
ES 10 ⁻²	Souk El Ténine	45
ESC3 2B	Souk El Ténine	45
ES3 10 ⁻⁵	Souk El Ténine	45
ES3 C	Souk El Ténine	45
ES3 8B1	Souk El Ténine	45
EP4 10 ⁻²	Souk El Ténine	45
ES3 10 ⁻² C	Souk El Ténine	45
ES3 10 ⁻² B	Souk El Ténine	45
ES 11	Souk El Ténine	45
EFF 10 ⁻⁴	Aokas	37
SC aok 10 ⁻⁴	Aokas	37
G aok 10 ⁻³	Aokas	37

II.Observation macroscopique et microscopique

L'aspect des isolats est représenté dans le tableau VII et la figure 10, après 7 jours d'incubation à 45 °C sur milieu M2 et 37°C sur milieu ISP2 selon les isolats sélectionnés

Tableau VI : Résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des isolats

Code de la souche	Milieux d'isolement	Aspect macroscopique
ES3 2C	M2	Colonies marron, rondes de taille moyenne
ES 10 ⁻²	M2	Colonies blanches, rugueuses et petite taille
ESC3 2B	M2	Colonies beiges, rondes et de petite taille
ES3 10 ⁻⁵	M2	Colonies beige, rondes et poudreuses de petite taille
ES3 C	M2	Colonies marron, rondes de taille moyenne
ES3 8B1	M2	Colonies blanches, rondes et rugueuses de petite taille
EP4 10 ⁻²	M2	Colonies jaunes, irrégulières et poudreuses de taille moyenne
ES3 10 ⁻² C	M2	Colonies blanches, rondes de grande taille
ES3 10 ⁻² B	M2	Colonies beige, filamenteuses
ES 11	M2	Colonies jaunes, rondes de petite taille
EFF 10 ⁻⁴	ISP2	Colonies beige, rondes et rugueuses de taille moyenne
SC aok 10 ⁻⁴	ISP2	Colonies beige, dentelées et rugueuses de grande taille
G aok 10 ⁻³	ISP2	Colonies blanches, rondes, plates et rugueuse de taille moyenne

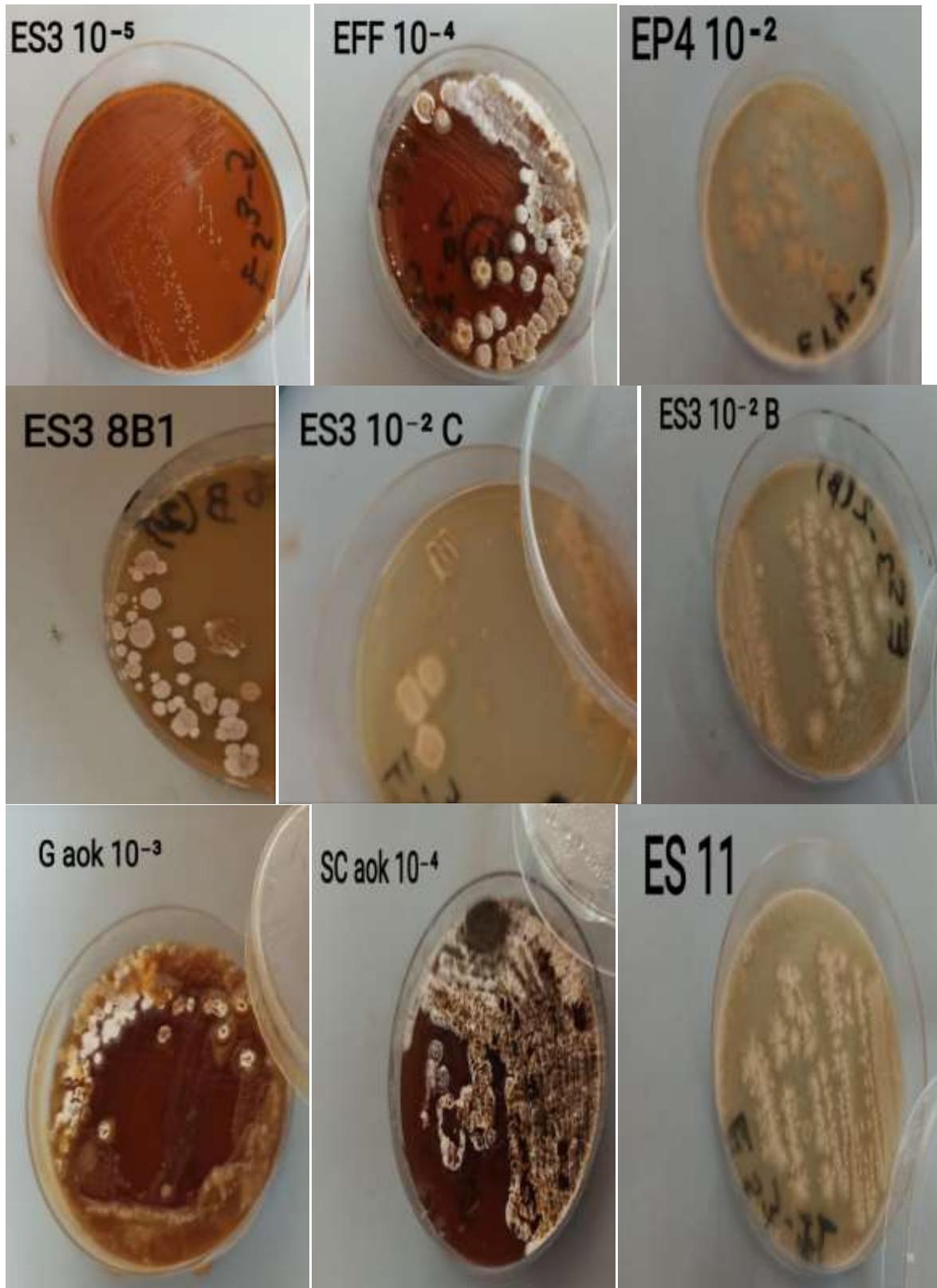


Figure 08 : Aspect macroscopique des isolats sur milieux ISP2 et M2.

Les colonies d'actinobactéries ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhérent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien (**Boudemagh, 2007**).

Coloration de Gram

Les résultats de la coloration de Gram reflètent la composition chimique de la paroi d'une manière générale et particulièrement celle des actinobactéries.

Après observation des frottis au microscope optique à l'objectif (G * 100), il s'est révélé que tous les isolats actinobactériens sont des bactéries à coloration Gram positif.



Figure 09: Observation au microscope optique au grossissement (10*100) de la coloration de Gram de l'isolat ES3 10⁻⁵

III. Recherche des lipases

La recherche des lipases est réalisée sur un milieu nutritif ajouté d'un substrat lipidique. Après 7 jours d'incubation à 37° C, l'apparition d'un halo opaque autour des colonies traduit la présence d'une lipase (**Camille, 2007**).

III.1. Criblage sur milieu solide et liquide par mesure de l'activité lipolytique

Le criblage des actinobactéries productrices des lipases est procédé par la mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse sur un milieu de culture solide additionné de tributyrrique

comme substrat (annexe III) et le dosage de l'activité lipolytique par titrage en milieu liquide (Akram et al, 2006).

La mesure de l'activité lipolytique en milieu solide a été quantifiée en mesurant la largeur de la zone claire autour de la colonie, les cultures montrant les zones maximales d'hydrolyse sont sélectionnées pour la suite des études (Wisdomkofi et al, 2006).

Les résultats des diamètres des zones d'hydrolyses dans le milieu solide sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau VII: Résultats des diamètres des zones d'hydrolyses dans un milieu solide

Les souches	ES3 2C	ES 10 ⁻²	ESC3 2 B	ES3 10 ⁻⁵	ES3 C	ES3 8B1	ES3 10 ⁻² C	ES3 10 ⁻² B	ES 11	EP4 10 ⁻²	G aok 10 ⁻³	EFF 10 ⁻⁴	SC aok 10 ⁻⁴
Diamètre (mm)	0,2	0,4	0,5	0,5	0,6	0,5	0,3	0,4	0,5	0,7	0,6	0,6	0,6



Figure10 : Activité lipasique d'actinobactéries sur milieu à base de tributyrine

L'activité lipasique en milieu liquide est calculée selon la formule :

$$\mu 0 = \text{Activité } (\mu\text{mol/L. min}) = (Vs - VB).N.1\ 000/ VR.T$$

L'activité lipasique des 13 souches est illustrée dans le tableau X.

Tableau VIII : Activité lipasique des 13 souches

Code de la souche	activité lipasique (U/l)
ES3 2C	160
ES 10 ⁻²	130
ESC3 2B	160
ES3 10 ⁻⁵	130
ES3 C	210
ES3 8B1	100
EP4 10 ⁻²	190
ES3 10 ⁻² C	190
ES3 10 ⁻² B	160
ES 11	130
EFF 10 ⁻⁴	190
SC aok 10 ⁻⁴	270
G aok 10 ⁻³	240

Les deux tests cités (la mesure du diamètre d'hydrolyse et de l'activité lipolytique par titrage) ont été appliqués pour la sélection des souches ayant un haut potentiel lipolytique. Les souches présentant une zone d'hydrolyse la plus large ainsi qu'une importante activité lipolytique sont comme suit :

- ✓ **SC aok 10⁻⁴**
- ✓ **EP4 10⁻²**
- ✓ **G aok 10⁻³**
- ✓ **ES3 C**

Afin de choisir la meilleure souche pour l'optimisation des conditions de production de l'enzyme, un autre dosage par titrage a été effectué sur les 4 souches sélectionnées précédemment, les résultats sont présentés dans le graphique ci-après :

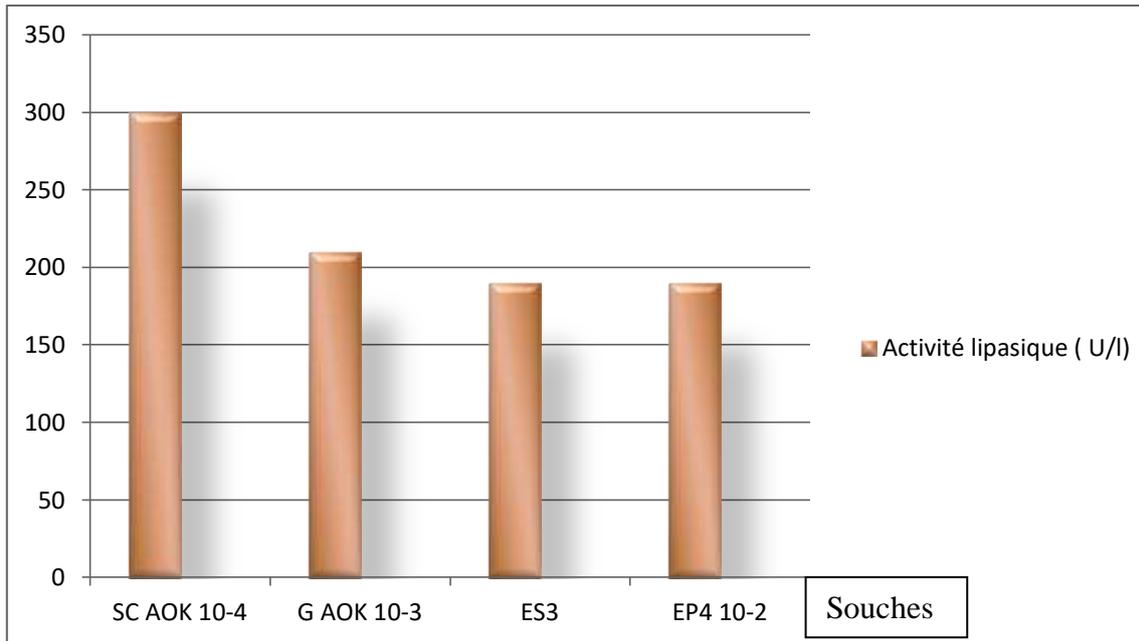


Figure 11 : Activité lipasique des 4 souches sélectionnées

D'après les résultats obtenus, on a sélectionné la souche **SC aok 10⁻⁴** comme étant la meilleure souche pour l'optimisation des conditions de production de l'enzyme, du son haut potentiel lipolytique.

III.2. Cinétique de croissance de l'isolat et de production de lipase

Cette cinétique de croissance est déterminée par la mesure de la densité optique à 600 nm chaque 24h pendant 10 jours incubée à 37°C de la souche SC aok 10⁻⁴.

La cinétique de croissance et l'activité lipasique de la souche SC aok 10⁻⁴ est illustré dans le tableau XI

Tableau IX : Cinétique de croissance et l'activité lipasique de la souche SC aok 10⁻⁴

Jours	Densité optique (600 nm)	Activité lipasique (U/l)
1	0,7	40
2	0,9	100
3	1,1	210
4	1	300
5	0,8	240
6	0,6	190
7	0,6	160
8	0,5	160
9	0,6	100
10	0,6	160

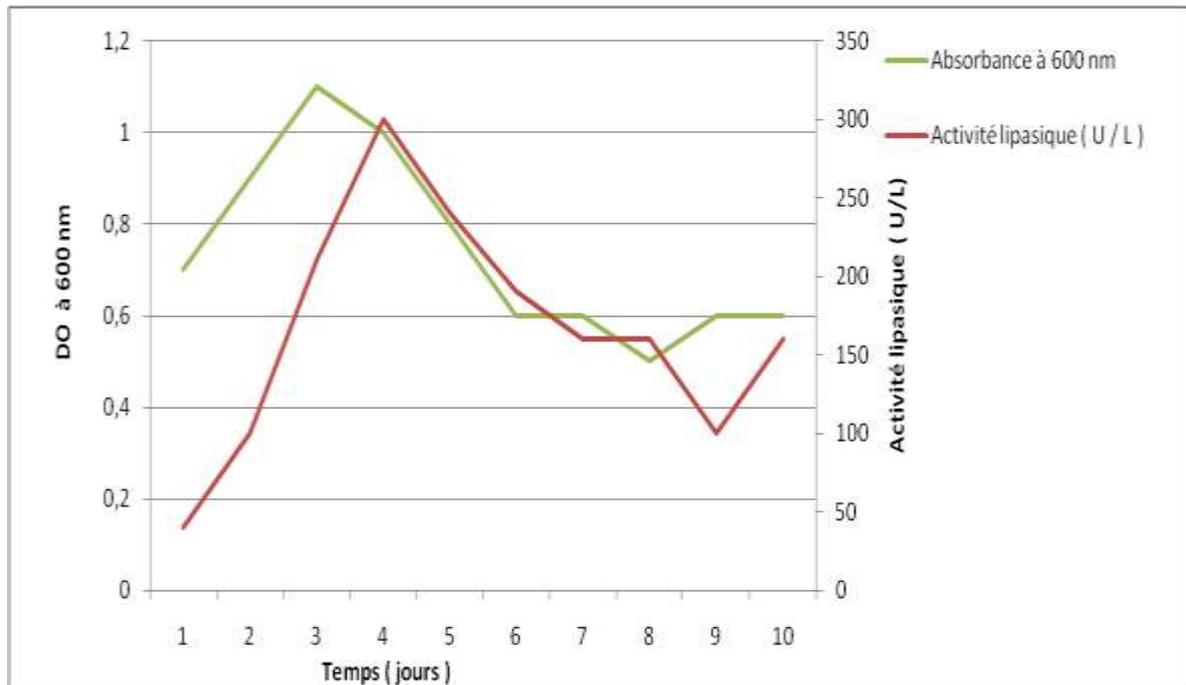


Figure 12 : Cinétique de croissance et l'activité lipasique de la souche SC aok 10^{-4} .

L'activité lipolytique de ces micro-organismes est due à leur capacité de produire et sécréter des lipases.

Le développement d'une zone claire autour de la bactérie, était également une indication de l'activité lipolytique dans un milieu solide en accord avec les travaux de **Mukunda et al., 2012**. Les zones d'hydrolyse produites par la dégradation du Tributyrine sont visibles après 4 à 7 jours d'incubation.

Seuls, les isolats potentiellement lipolytiques sont retenus pour la production de lipase sur milieu liquide.

La production des lipases par la souche SC aok 10^{-4} était partiellement associée à la croissance, l'activité maximale de cette souche (300 U/ l) est apparue au 4ème jour d'incubation, en parallèle la croissance cellulaire à atteint son maximum au bout du 3ème jour d'incubation à 37°C.

On a remarqué que la production de lipase augmente avec l'augmentation du temps d'incubation, mais arrivée à un stade elle finit par diminuer avec l'augmentation de la période d'incubation, cette tendance de la diminution de la production de lipase pourrait être attribuée à la dégradation protéolytique du système enzymatique, des résultats similaires ont été documentés par (**Ire et al., 2014**).

IV. Optimisation de la production de la lipase par le plan de Box behnken

IV.1. Paramètres opératoires

Les paramètres opératoires étudiés son respectivement :

- ✓ La température (°C)
- ✓ le pH
- ✓ le temps d'incubation (jr)
- ✓ le taux d'inoculum (spores / ml)
- ✓ la concentration initiale en margine (%)

La matrice d'expériences avec réponses est présentée dans le tableau XI

Tableau X : Matrice d'expériences pour un nombre de facteur k= 5 et un nombre d'expériences N= 43

		Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4	Facteur 5	Réponse 1	Valeurs prédites
N° essais	Run	Température	pH	Temps d'incubation	Taux d'inoculum	Source de carbone	Activité lipasique	Activité lipasique
		°C		Jour	spores/ml	%	U/L	U/L
34	1	44	7	7	10 ⁷	5	3	-8,50
26	2	44	7	7	10 ⁵	25	53	59,35
30	3	37	7	10	10 ⁷	5	79	87,94
9	4	37	4	7	10 ⁷	5	47	46,46
20	5	37	7	7	1,99 10 ⁷	45	97	125,23
43	6	37	7	7	10 ⁷	25	64	64,67
28	7	44	7	7	1,99 10 ⁷	25	107	126,23
37	8	37	4	7	10 ⁵	25	160	149,56
25	9	30	7	7	10 ⁵	25	220	193,60
39	10	37	4	7	1,99 10 ⁷	25	380	322,94
3	11	30	10	7	10 ⁷	25	130	142,46
5	12	37	7	4	10 ⁵	25	120	118,17
8	13	37	7	10	1,99 10 ⁷	25	99	90,17
16	14	44	7	10	10 ⁷	25	9	13,19
27	15	30	7	7	1,99 10 ⁷	25	130	116,48
41	16	37	7	7	10 ⁷	25	57	64,67
17	17	37	7	7	10 ⁵	5	100	98,60
11	18	37	4	7	10 ⁷	45	290	287,21
40	19	37	10	7	1,99 10 ⁷	25	58	59,44
14	20	44	7	4	10 ⁷	25	160	158,06
15	21	30	7	10	10 ⁷	25	190	197,44
2	22	44	4	7	10 ⁷	25	160	165,21
35	23	30	7	7	10 ⁷	45	90	85,50
18	24	37	7	7	1,99 10 ⁷	5	47	68,48
21	25	37	4	4	10 ⁷	25	130	149,27
23	26	37	4	10	10 ⁷	25	290	308,90
7	27	37	7	4	1,99 10 ⁷	25	219	228,04
19	28	37	7	7	10 ⁵	45	100	105,35

Résultats et Discussions

38	29	37	10	7	10 ⁵	25	195	243,06
13	30	30	7	4	10 ⁷	25	97	98,31
33	31	30	7	7	10 ⁷	5	90	85,75
10	32	37	10	7	10 ⁷	5	180	170,46
1	33	30	4	7	10 ⁷	25	190	217,46
12	34	37	10	7	10 ⁷	45	5	-6,79
32	35	37	7	10	10 ⁷	45	69	73,69
29	36	37	7	4	10 ⁷	5	68	64,81
42	37	37	7	7	10 ⁷	25	73	64,67
24	38	37	10	10	10 ⁷	25	57	41,40
31	39	37	7	4	10 ⁷	45	150	142,56
6	40	37	7	10	10 ⁵	25	230	210,29
36	41	44	7	7	10 ⁷	45	67	55,25
4	42	44	10	7	10 ⁷	25	80	70,21
22	43	37	10	4	10 ⁷	25	262	246,77

IV.2. Analyse de variance et coefficient de corrélation

Tableau XI: Analyse de variance

Source	Somme des carrés	Df	Carré moyen	F-value	p-value	
Model	2,763E+05	20	13816,78	25,41	< 0,0001	Significatif
X ₁ -Température	15500,25	1	15500,25	28,50	< 0,0001	Significatif
X ₂ -Ph	28900,00	1	28900,00	53,14	< 0,0001	Significatif
X ₃ -Temps d'incubation	2093,06	1	2093,06	3,85	0,0626	Non significatif
X ₄ -Taux d'inoculum	105,06	1	105,06	0,1932	0,6646	Non significatif
X ₅ -Source de carbone	4032,25	1	4032,25	7,41	0,0124	Significatif
X ₁ X ₂	100,00	1	100,00	0,1839	0,6722	Non significatif
X ₁ X ₃	14884,00	1	14884,00	27,37	< 0,0001	Significatif
X ₁ X ₄	5184,00	1	5184,00	9,53	0,0054	Significatif
X ₁ X ₅	1024,00	1	1024,00	1,88	0,1838	Non significatif
X ₂ X ₃	33306,25	1	33306,25	61,24	< 0,0001	Significatif
X ₂ X ₄	31862,25	1	31862,25	58,59	< 0,0001	Significatif
X ₂ X ₅	43681,00	1	43681,00	80,32	< 0,0001	Significatif
X ₃ X ₄	13225,00	1	13225,00	24,32	< 0,0001	Significatif
X ₃ X ₅	2116,00	1	2116,00	3,89	0,0612	Non significatif

Résultats et Discussions

X_4X_5	625,00	1	625,00	1,15	0,2953	Non significatif
X_1^2	328,71	1	328,71	0,6044	0,4452	Non significatif
X_2^2	37945,60	1	37945,60	69,77	< 0,0001	Significatif
X_3^2	12912,04	1	12912,04	23,74	< 0,0001	Significatif
X_4^2	17361,11	1	17361,11	31,92	< 0,0001	Significatif
X_5^2	1922,84	1	1922,84	3,54	0,0734	Non significatif
Lack of Fit	11835,71	20	591,79	9,20	0,1025	Non significatif
Pure Error	128,67	2	64,33			
Cor Total	2,883E+05	42				

Les valeurs P inférieures à 0.05 indiquent que les termes du modèles sont significatifs dans notre cas X_1 , X_2 et X_5 sont significatifs tandis que X_3 et X_4 sont non significatifs, et pour ce qui est des interactions (X_1X_2 , X_1X_5 , X_3X_5 , X_4X_5) sont non significatifs et (X_1X_3 , X_1X_4 , X_2X_3 , X_2X_4 , X_2X_5 , X_3X_4) sont significatifs et enfin (X_1^2 , X_5^2) sont non significatifs et (X_2^2 , X_3^2 , X_4^2) sont significatifs.

La valeur F de 9.20 lui correspond une p-value > 0.05 ce qui signifie que le manque d'ajustement n'est pas significatif et le modèle est valide et adéquat.

Tableau XII : Statistiques d'ajustement

R^2	0,9585
Adjusted R^2	0,9208

La valeur du coefficient $R^2 = (0.9585)$ ce qui implique que le modèle explique à 95.8 % les variations de la réponse.

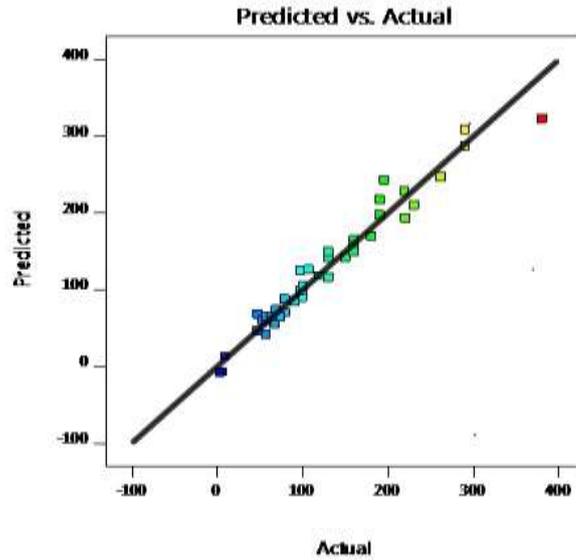


Figure 13 : Représentation graphique des réponses prédites en fonction des réponses réelles.

Les points sont répartis autour de la droite de régression. Le modèle peut être donc jugé de qualité suffisante (Figure 13).

L'examen du diagramme des réponses prédites en fonction des réponses montre une bonne corrélation entre les deux.

IV.3.Déterminations du modèle mathématique

Tableau XIII : les coefficients de régression

Coefficients	=	Signification
+64,67		
-31,13	X_1	Significatif
-42,50	X_2	Significatif
-11,44	X_3	Non significatif
-2,56	X_4	Non significatif
+15,88	X_5	Significatif
-5,00	X_1X_2	Non significatif
-61,00	X_1X_3	Significatif
+36,00	X_1X_4	Significatif
+16,00	X_1X_5	Non significatif
-91,25	X_2X_3	Significatif
-89,25	X_2X_4	Significatif

-104,50	X_2X_5	Significatif
-57,50	X_3X_4	Significatif
-23,00	X_3X_5	Non significatif
+12,50	X_4X_5	Non significatif
+7,17	X_1^2	Non significatif
+77,00	X_2^2	Significatif
+44,92	X_3^2	Significatif
+52,08	X_4^2	Significatif
-17,33	X_5^2	Non significatif

L'équation de régression polynomiale pour le modèle primaire (avant d'exclure les coefficients non significatifs), est comme suit :

$$\hat{Y} = 64,67 - 31,13X_1 - 42,50X_2 - 11,44X_3 - 2,56X_4 + 15,88X_5 - 5X_1X_2 - 61X_1X_3 + 36X_1X_4 + 16X_1X_5 - 91,25X_2X_3 - 89,25X_2X_4 - 104,50X_2X_5 - 57,50X_3X_4 - 23X_3X_5 + 12,50X_4X_5 + 7,17X_1^2 + 77X_2^2 + 44,92X_3^2 + 52,08X_4^2 - 17,33X_5^2$$

Tableau IX : coefficients de régression après exclusion des termes non significatifs

Activité lipasique	=	Signification
+64,67		
-31,13	X_1	Significatif
-42,50	X_2	Significatif
+15,88	X_5	Significatif
-61,00	X_1X_3	Significatif
+36,00	X_1X_4	Significatif
-91,25	X_2X_3	Significatif
-89,25	X_2X_4	Significatif
-104,50	X_2X_5	Significatif
-57,50	X_3X_4	Significatif
+77,00	X_2^2	Significatif
+44,92	X_3^2	Significatif
+52,08	X_4^2	Significatif

Ainsi l'équation de régression finale est comme suit :

$$\hat{Y} = 64,67 - 31,13X_1 - 42,50X_2 + 15,88X_5 - 61X_1X_3 + 36,00X_1X_4 - 91,25X_2X_3 - 89,25X_2X_4 - 104,50X_2X_5 - 57,50X_3X_4 + 77X_2^2 + 44,92X_3^2 + 52,08X_4^2$$

L'équation codée est utile pour identifier l'impact relatif des facteurs en comparant les coefficients.

IV.4. Etude des effets d'interactions significatives

Un effet d'interaction apparaît lorsqu'une relation entre deux variables est modifiée par une autre variable, les interactions significatives de notre étude sont illustrées ci-après:

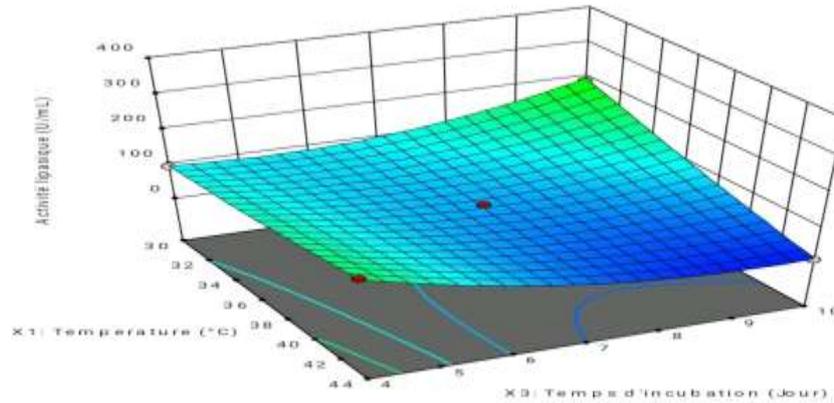


Figure 14 : Surface de réponse de l'interaction X_1X_3

L'analyse de la courbe (fig14) montre que l'activité lipasique augmente quand la température est entre 40 - 44°C et le temps d'incubation est entre 4 - 5 jours pour atteindre un maximum de (200 U / L).

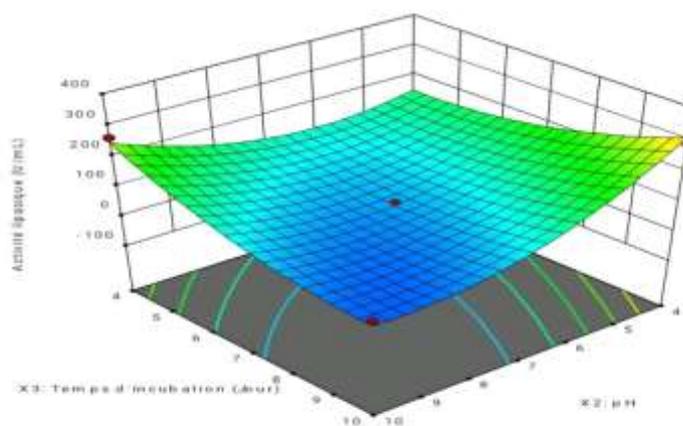


Figure 15 : Surface de réponse de l'interaction X_2X_3

L'analyse de la courbe (fig15) montre que l'activité lipasique atteint un maximum de (200 U/L) quand le temps d'incubation est entre 4 – 5 jours et le pH entre 5 – 6

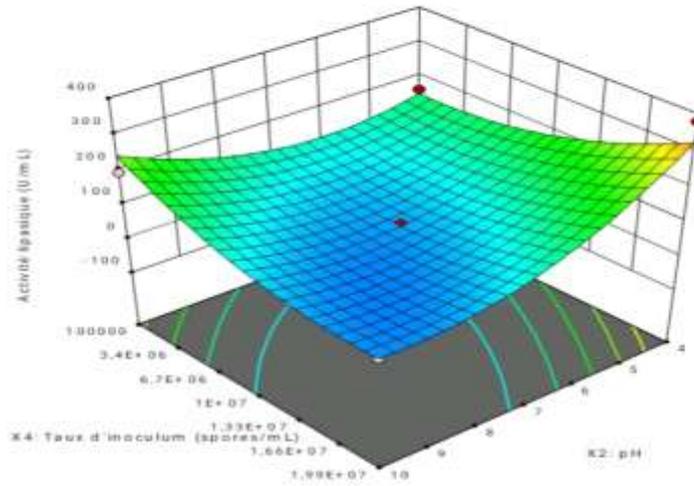


Figure 16 : Surface de réponse de l'interaction X₂X₄

L'analyse de la courbe (fig16) montre qu'une activité lipasique maximale est observée quand le taux d'inoculum est entre 100000 - 3.4E + 0.6 spores/mL et un pH allant de 5 à 6.

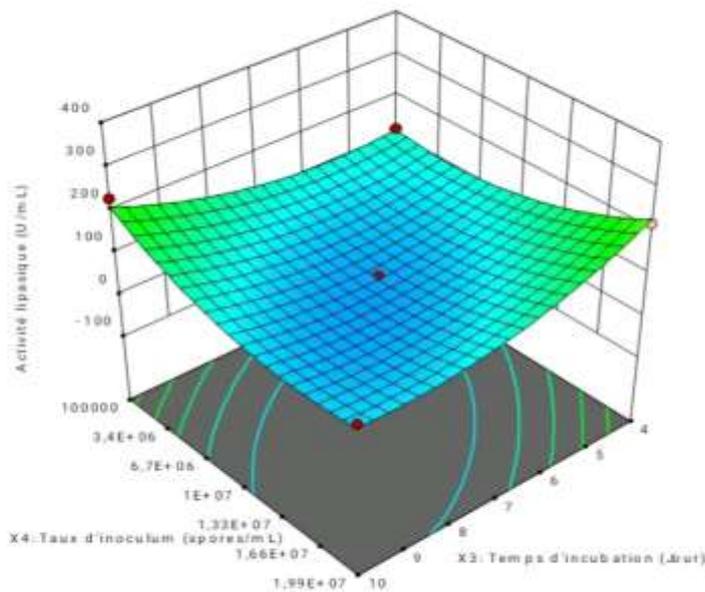


Figure 17 : Surface de réponse de l'interaction X₃X₄

L'analyse de la courbe (fig17) montre que l'activité lipasique atteint son maximum (200 U/L) quand le taux d'inoculum est entre 100000 - 6.7E+06 et un temps d'incubation de 4 – 5 jours.

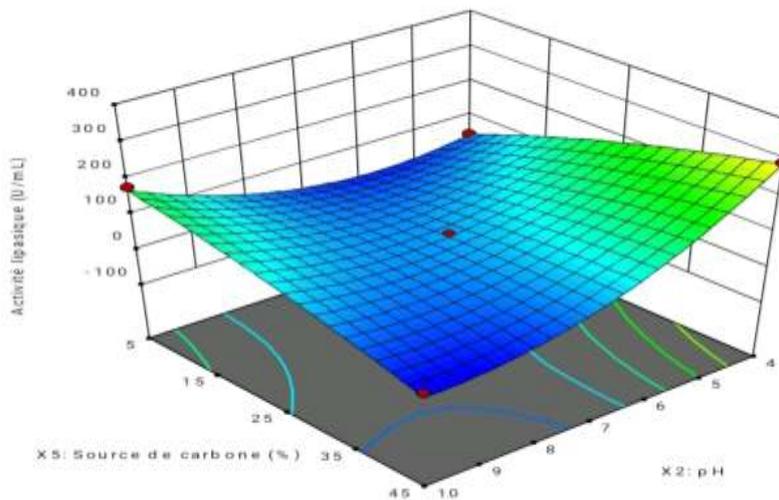


Figure 18 : Surface de réponse de l'interaction X_2X_5

L'analyse de la courbe (fig18) montre une activité maximale (200 U/L) quand la source carbone varie de 5 à 15 et le pH entre 5 – 6.

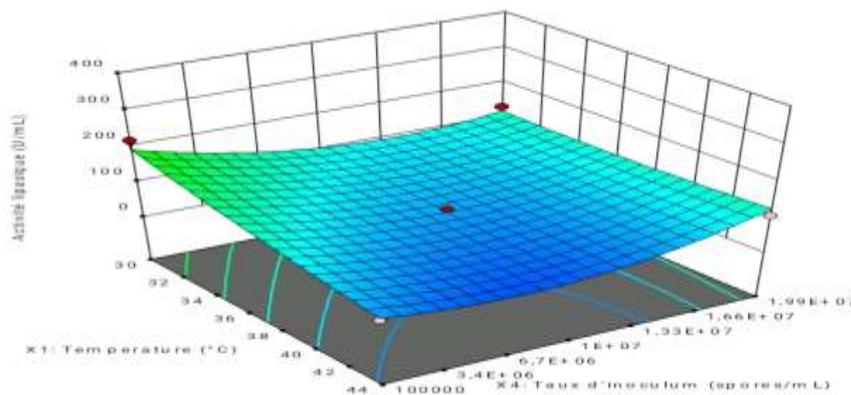


Figure 19 : Surface de réponse de l'interaction X_1X_4

L'analyse de la courbe (fig19) montre une activité maximale (200 U/L) que quand la température est entre 30-34 et le taux d'inoculum dans les environs de $1.99 \cdot 10^7$

D'après le modèle obtenu, nous remarquons que l'effet d'interaction le plus important est celui du couple (X_2X_5) correspondant respectivement au temps d'incubation et le taux d'inoculum, suivi du couple (X_2X_3) correspondant à la température et le temps d'incubation, après vient celui du couple (X_2X_4) correspondant au pH et le taux d'inoculum.

IV.5. Validation du modèle

La validation par les points tests consiste à réaliser des expériences supplémentaires en des points situés à l'intérieur du domaine d'étude, et à comparer les valeurs mesurées à celle calculées à partir du modèle.

Afin de choisir l'optimum, logiciel de design expert nous a proposé trois solutions, elles sont citées dans le tableau ci-après :

Tableau XV : les solutions

Numéro	Température	pH	Temps d'incubation	Taux d'inoculum	Source de carbone	Valeurs prédites (activité lipasique)	Erreur standard (Activité lipasique)	Valeurs réelles (activité lipasique)
1	43,874	4,636	4,023	$1,9 \cdot 10^7$	27,128	380,691	29,803	160
2	34,478	4,005	6,878	$2 \cdot 10^7$	36,283	382,576	20,237	78
3	44,000	10,000	4,000	$1,7 \cdot 10^7$	20,317	320,043	31,745	350

Après réalisation des trois essais, on a trouvé que le 3ème essai se rapproche le plus de la valeur prédite ce qui implique qu'on valide le 3ème modèle avec une valeur prédite de 320U/L et une valeur réelle de 350 U/L (la différence entre les deux valeurs n'est pas significative).

Les valeurs des facteurs qui nous ont permis d'avoir l'optimum sont comme suit :

- ✓ Une température de 44°C
- ✓ Un pH de 10
- ✓ Un temps d'incubation de 4jours
- ✓ Un taux d'inoculum de $1,7 \cdot 10^7$ spores/mL
- ✓ Une source de carbone de 20.317%

Cette étude a été réalisée dans le but de produire des lipases dans un milieu liquide à base de margines par des actinobactéries, prélevées à partir de quatre types d'échantillons de trois sites différents, ce qui nous a permis d'isoler treize souches d'actinobactéries dans deux milieux différents ISP2 et M2 toutes aptes à dégrader un substrat lipidique.

L'observation microscopique et macroscopique révèle que les isolats sont des Gram positif majoritairement de taille moyenne dentelée et ronde, se regroupent en colonies rugueuses.

La mise en évidence de l'activité lipolytique est faite sur milieu solide additionné de tributyrine par mesure des diamètres des halos, et sur milieu liquide à base d'huile d'olive comme substrat et cela par le dosage des AG libérés, au vu des résultats préliminaires qui nous ont permis de sélectionner la souche SC Aok 10^{-4} , celle qui a révélé une activité lipasique importante de 300 U/l, ces études doivent être poursuivies et approfondies en ciblant une production qualitative et quantitative des lipases, Il serait également important d'établir une optimisation statistique par l'effet de certains paramètres physico-chimiques sur la production des lipases par la souche SC Aok 10^{-4} en utilisant la méthode des plans d'expériences.

Le suivi de la croissance de la souche SC Aok 10^{-4} à travers la mesure de la densité optique d'une part, et l'activité lipasique à travers le dosage des acides gras libérés d'une autre part, nous a permis de déterminer le jour maximal de production estimé entre 3 et 4 jours d'incubation.

L'étude de la modélisation et de l'optimisation de la production des lipases a été réalisée en sélectionnant cinq facteurs comme variables : la température, le pH du milieu le temps d'incubation, le taux d'inoculum et la source de carbone. En vue de sélectionner les paramètres influençant cette production, ainsi que leurs interactions, un plan Box Behnken a été étudié.

L'activité lipasique produite chez la souche SC aok 10^{-4} choisie après réalisation des trois solutions proposées par le logiciel est de (350 μ mol/l/min) à une valeur de pH 10 une concentration en carbone de 20%, un taux d'inoculum de 1.7E+07 et un temps d'incubation de 4jours et une température de 44 °C.

Perspectives :

- Purification et caractérisation de l'enzyme
- Extraction des polyphénols afin de favoriser la croissance
- Identification moléculaire de l'isolat
- Transplantation des gènes réponsables de la production des lipases
- Elargir l'étude à d'autres facteurs nutritionnelles et culturaux dans le but d'optimiser la production des lipases .
- Récupération des AGL à partir des sous produits issus des raffineries d'huiles, pour diverses utilisations.
- Transformation des margines en huile acide pour diverses utilisations industrielles et alimentation du bétail comme aditif .

-A-

- ♦ **Akram K, Ahmad Ad and Beenech W. (2006).** African journal of biotechnologie, production, purification and partial characterisation of lipase, 878.
- ♦ **Alharbi, S. A., Mashat, B. H., Al-Harbi, N. A., Wainwright, M., Aloufi, A. S., & Alnaimat, S. (2012).** Bismuth-inhibitory effects on bacteria and stimulation of fungal growth in vitro. Saudi journal of biological sciences, 19(2), 147-150.
- ♦ **Al-Malah K., Azzam M.O.J., Abu-Lail N.I. (2000).** Olive mills effluent (OME) wastewater posttreatment using activated clay. Separation and Purification Technology, 20 :225-234.
- ♦ **Aly M.M., Tork S., Al-Garni S.M. & Nawar L. (2012).** Production of lipase from genetically improved *Streptomyces exfoliates* LP10 isolated from oil-contaminated soil. African Journal of Microbiology Research 6, 1125-37.
- ♦ **Ángela Ang, Ane Ur, Inmaculada Or, Dionissios Ma, Evan Di. (2011).** Treatment of municipal and leachate by catalytic wet air oxidation: Assessment of the role of operating parameters by factorial design, waste management 31: 1833-1844.
- ♦ **Assas N., Ayed L., Marouani L., Hamdi M. (2009).** Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*, International Biodeterioration & Biodegradation 63:407-413.
- ♦ **Athalye, M., Goodfellow, M., Lacey, J., & White, R. P. (1985).** Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 35(1).
- ♦ **Ayinla Z.A., Ademakinwa A.N., & Agboola F.K. (2017).** Studies on the Optimization of Lipase Production by *Rhizopus* sp. ZAC3 isolated from the Contaminated Soil of a Palm Oil Processing Shed. Journal of Applied Biology & Biotechnology. 5 (02) : 030-037.

-B-

- ♦ **Badji, B., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2006).** Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. Canadian journal of microbiology, 52(4), 373-382.
- ♦ **Becker, H. S. (Ed.). (1964).** The other side: Perspectives on deviance (pp. 2-3). New York: Free Press of Glencoe
- ♦ **Benoist D. Tourbier Y. Germain – Tourbier S. (1994).** Plans d'expériences Construction et analyse Editeur Lavoisier TEC & DOC.

- ♦ **Bergey's Manuel. (2007).** Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall. B.J. In: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae. Coyright, Michigan State University Board of Trustees.
- ♦ **Berto P, Belingheri L and Dehorter B. (1997).** Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. *Biotechnology letters* ; 19 (6):533-536.
- ♦ **Betelli, L. (2013).** Développement et évaluation d'une méthode fondée sur la PCR temps réel pour la caractérisation des bioaérosols: application au groupe des actinomycètes (Doctoral dissertation, Dijon).
- ♦ **Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R., & Krishna, S. H. (2002).** Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *TRENDS in Biotechnology*, 20(10), 433-437.
- ♦ **Boudemagh, A. (2007).** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives, Université Mentouri Constantine : 1-200.

-C-

- ♦ **Camille D., (2007).** Microbiologie pratiques pour le laboratoire d'analyse et de controle sanitaire. Lavoisier. 126-173.
- ♦ **Cardenas F., Alvarez E., Castro Alvarez M.S., Sanchez- Montero J.M., Valmaseda M., Elson S.W. & Sinisterra J.V. (2001).** Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. 14:111-123.
- ♦ **Cavalla M., Eberlin T., (1994).** Isolement des streptomycetes du sol. L'opéron. XIX, 13-17.
- ♦ **Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M., & Minnikin, D. E. (1977).** Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *Microbiology*, 100(2), 221-230.
- ♦ **Collins M. D. and Jones D. (1981).** Distribution of isoprenoid quinone structural type in bacteria and their taxonomic amplification. *Microbiol. Rev.* 45 : 316-354.
- ♦ **Couch J. N. and Bland C. E. (1974).** Family IV. Atinoplanaceae. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 Th Ed., Buchaan R. E. and Gibbon N. E. (Eds). Williams and ilkins C. O. Baltimore, Pp.706-723.

-D-

- ♦ **Dehorter B. (1997).** Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. *Biotechnology letters* ; 19 (6):533-536.
- ♦ **Dommergues, Y., & Mangenot, F. (1970).** *Ecologie microbienne du sol* (No. 631.46). Masson,

-E-

- ♦ **El-Nakeeb, M. A & Lechevalier, H. A. (1963).** Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Applied microbiology*, 11(2), 75-77.

-F-

- ♦ **Fadil K., Chahlaoui, A., Ouahbi, A., Zaid A., Borja R. (2003).** Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 51: 37-41.
- ♦ **Favela-Torres, E., Córdova-López, J., García-Rivero, M., & Gutiérrez-Rojas, M. (1998).** Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*, 33(2), 103-107.
- ♦ **Fickers, P., Destain, J., & Thonart, P. (2008).** Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 12(2), 119-130.

-G-

- ♦ **Gao XG, Cao SG and Zhang K. (2000).** Production, properties and application to non aqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzym. Microb. Technol.* 27, 74–82.
- ♦ **Gazenko SV, Reponen TA, Grinshpan SA, Willeke IC, (1998).** Analysis of airborne actinomyete spores with flurogenic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4410-4415.
- ♦ **Goodfellow M and Williams ST. (1983).** Ecology of actinomycetes. -*Ann. Rev. Microbial.* 37. p 189-216.
- ♦ **Goodfellow M and O'Donnell AG. (1989).** Search and discovery of industrially significant actinomycetes. *Proceeding of the 44th Symposium on Society for General Microbiology, (SCGM'89).* Cambridge University Press, Cambridge. pp 343-383.
- ♦ **Goupy, J. (1999).** Plans d'expériences pour surfaces de réponse.
- ♦ **Goupy, J. (2006).** Introduction aux plans d'expériences (p. 1). Dunod.

- ♦ **Grund E. and Kroppenstedt R. M.(1990).** Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 5-11.

-H-

- ♦ **Habbeche, A., Saoudi, B., Jaouadi, B., Haberra, S., Kerouaz, B., Boudelaa, M., ... & Ladjama, A. (2014).** Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *Journal of bioscience and bioengineering*, 117(4), 413-421.
- ♦ **Hamdi M., Bouhamed H., Ellouz R. (1991).** Optimisation of *Aspergillus niger* growth on olive mill wastewaters, *Appl. Microbiol. Biothechnol.*, 36: 285-288.
- ♦ **Hamdi, M. (1991).** Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse Doctorat : Biologie Cellulaire et Microbiologie. Aix-Marseille 1. Université de Provence, 166p.
- ♦ **Hasan S., Ahmad A., Purwar A., Khan N., Kundan R. & Gupta G.(2013)** Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation* 9: 238-242
- ♦ **Hu Y. T., ZhounP. J., Zhou Y.G., Liu Z. H. and Liu S. J. (2004).** *Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi lake, Xinjiang, China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1-9.

-I-

- ♦ **Iboukhoulef. H.(2014).** Traitement des margines des huileries d'olive par les procédés d'oxydation avancée basés sur le système Fenton-Like (H₂O₂/Cu). Université de Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.
- ♦ **Ire F.S. & Ike V.C. (2014).** Screening and Optimization of Process Parameters for the Production of Lipase in Submerged Fermentation by *Aspergillus carbonarius* (Bainier) IMI 366159 Annual Research & Review in Biology. 4(16): 2587-2602.
- ♦ **Ishizawa S. and Arargi M. (1976).** Composition of actinomycetes population in soil. In : *Actinomycetes, the boundary minroorganisms*. Arai T. (Eds) Toppan Co. Ltd, Tokyo, pp. 97 107.

-J-

- ♦ **Jaeger, K.E; Ransac, S; Dijikstra, B.W. et al. (1994).** Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 15(1): 29-63.

- ♦ **Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998).** Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, *16*(9), 396-403.
- ♦ **Jaeger K. E. & Eggert T. (2002).** Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*. *13*: 390-397.
- ♦ **Jones, A. L., Brown, J. M., Mishra, V., Perry, J. D., Steigerwalt, A. G., & Goodfellow, M. (2004).** *Rhodococcus gordoniae* sp. nov., an actinomycete isolated from clinical material and phenol-contaminated soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *54*(2), 407-411.
- ♦ **Justin T. C and Christopher M. M. F. (2003).** Visualization of an Endophytic *Streptomyces* Species in Wheat Seed . *Appl. Environ. Microbiol.* *69*(7): 4260-4262.

-K-

- ♦ **Kadded, K. (1993).** Optimisation de forme de machines électriques à l'aide d'un logiciel éléments finis et de la méthode des pénalités intérieures étendues (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Grenoble (INPG)).
- ♦ **Kinoshita N., Igarashi M., Ikeno S., Hori M. and Hamada M. (1999).** *Saccharothrix tangerinus* sp.nov., the producer of the new antibiotic formamicin : taxonomie studies. *Actinomycetologica*. *13*: 20-31.
- ♦ **Kuznetsova NI, Kirillova NV, Kuznetsova LI, Smirnova MY, Likholobov VA. (2007).** Hydrogen peroxide and oxygen–hydrogen oxidation of aromatic compounds in catalytic systems containing heteropoly compounds. *J. Hazard. Mater.* *146*:569-576

-L-

- ♦ **Labeda, D. P., Testa, R. T., Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. A. (1985).** *Glycomyces*, a new genus of the Actinomycetales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *35*(4), 417-421.
- ♦ **Lagrari C. (2019).** Production améliorée des lipases à partir du *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 en utilisant la biomasse lignocellulosique dans un milieu de fermentation liquide .Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
- ♦ **Larpent JP, Sanglier JJ. (1989).** *Biotechnologie des antibiotiques*. Masson. Paris.p 481.
- ♦ **Lawrence R.C., Fryer T. F. & Reiter B. (1967).** The Production and Characterization of Lipases from a *Micrococcus* and a *Pseudomonad*. *J. gen. Microbial.* *48*: 401-418.

- ♦ **Lechevalier, M. P, Lechevalier, H. (1970).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20(4), 435-443.
- ♦ **Lechevalier, M. P, De Bievre, C, Lechevalier, H. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5(4), 249-260.
- ♦ **Lechevalier AH. (1981).** Introduction to the order Actinomycetales, Springer-Verlag Edition Berlin: vol. 2, p. 1915-1922.
- ♦ **Lesage-Meessen. L, Navarro D, Maunier S, Sigoillot J-C, Lorquin, J, Delattre M, Simon J-L. et Labat M. (2001).** Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75, 501-507.
- ♦ **Leulmi N. (2011).** La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Université Mentouri Constantine.
- ♦ **Linder R. (2005).** Les plans d'expériences un outil indispensable à l'expérimentateur. Presses de l'école nationale des ponts et chaussées, Paris. (Norme ISO 3535-3).
- ♦ **Loria P, Carulli N, Medici G, Menozzi D, Salvioli G, Bertolotti M, & Montanari M. (1986).** Effect of ursolic acid on bile lipid secretion and composition *Gastroenterology*, 90(4), 865-874.
- ♦ **Lu WJ, Wang HT and Nie YF (2004).** Effect of inoculating flower stalks and vegetable waste with ligno-cellulolytic microorganisms on the composting process, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, Vol. 39, No. 5-6, pp 871– 887.

-M-

- ♦ **Machehaleka F., Yakhlef M. (2015).** Production de la protéase alcaline par des moisissures isolées de source thermale sur milieu à base de plumes de poulet. Université des frères Mentouri Constantine.
- ♦ **Mariat F. et Sebald M. (1990).** Actinomycetes In : *Bactériologie Médicale*. Le Minor L. et véron M. 2ème édition, Flammarion. Paris. 935-949).
- ♦ **Mazodier J. (1974).** Société industrielles et déchets solides. *Science et vie*. 106: 109-115.
- ♦ **Mc Carthy A. J. and Williams S. T. (1992).** Actinomycetes as agents of biodegradation. *Environm. review*. 115 (1-2): 189-192.

- ♦ **Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., & Fenical, W. (2002).** Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 5005-5011.
- ♦ **Mordarska, H, Mordarski M., & Goodfellow M. (1972).** Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *Microbiology*, 71(1), 77-86.
- ♦ **Mswaka AY and Magan N. (1998).** Wood degradation, and cellulase and ligninase production by *Trametes* and other wood-inhabiting basidiomycetes from indigenous forests of Zimbabwe. *Mycological Research*, Vol. 102, No. 11, 1399–1404.
- ♦ **Mukunda S., Onkarappa R. & Prashith Kekuda T.R. (2012).** Isolation and Screening of Industrially Important Fungi from the Soils of Western Ghats of Agumbe and Koppa, Karnataka, India. *Science, Technology and Arts Research Journal*. 1:27-32.

-N-

- ♦ **Najjar, A. (2010).** Etude quantitative de la sécrétion de lipase de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowialipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Université de la méditerranée (Aix Marseille II) 132P.
- ♦ **Nwuche C.O & Ogonna J.C. (2011).** Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (pome) dump sites at nsukka. *Brazilian archives of Biology and technology*. 54:113-116.

-O-

- ♦ **Opatokun SA, Kabbashi N, Alam MZ, Salihu A, Abass A and Ruqayyah TLD. (2011).** Composting of food and yard wastes by locally isolated fungal strains. *Afr J Biotechnol* 10:18800–18806.
- ♦ **Osada H. 1998.** Bioprobes for investigating mammalian cell cycle control. *J Anti Biot* 51 :973-981.
- ♦ **OSKAY, A. Mustafa, ÜSAME, Tamer, et CEM, Azeri. (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African journal of Biotechnology*, vol. 3(9), pp. 441-446.

-P-

- ♦ **Pabai F. (1997).** Production, Purification, Characterization of selected microbial lipases and their application for interesterification of better fat. Department of food

science & agricultural chemistry. McGill University, Montréal, Canada. Applied image. INC. PP: 179.

- ♦ **Park J.O., El-Tarabily K. A., Ghisalberti E. L. and Sivasithamparam K. (2002).** Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 35 :361-365.
- ♦ **Peaczinska-czoch W. and Mordarski H. (1988).** Actinomycetes enzymes. In: “Actinomycetes in biotechnology”. Goodfellow M., Williams S.T., and Mordarski M. (Eds), London: Academic Press, pp. 219-283.
- ♦ **Peltola J. S.P., Anderson M. A., Kampfer P., Auling G., Kropensstedt R. M., Busse H. J., Salkinoja-Salonen M. S. and Rainey F. A. (2001).** Isolation of toxigenic *Nocardiosis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardiosis* species, *N. exhalans* sp.nov. and *N. umidischholae* sp. nov. *Appl. Env. Microbiol.* 67: 4293-4304.
- ♦ **Perez J, Munoz-Dorado J, de la Rubia T and Martinez J. (2002).** Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose. *Int Microbiol* 5:53–63.
- ♦ **Pinsirodom P. & Parkin K.L. (2001).** Lipase assays. *Current protocols in food analytical chemistry*.
- ♦ **Prazeres JND, Cruz JAB and Pastore GM (2006).** **Characterization** of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Braz. J. Microbiol* ; 37:505-509.
- ♦ **Pridham T. G., Hesseltine C. W. and Benedict R. G. (1958).** A guide for the classification of *Streptomycetes* according to selected groups: placement of strains in morphological selection. *Appl. Microbiol.* 6:5-79.

-R-

- ♦ **Ranalli A. (1991).** The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, 37: 30-39.
- ♦ **Ruby et Lefrançois, (2004).** Ruby Françoise et Lefrançois Pierre. Fiche: Plantes et suppléments / Probiotiques,
- ♦ **Reponen, T. A., Gazonko, S. V., Grinshpun, S. A., Willeke, K., & Cole, E. C. (1998).** Characteristics of airborne actinomycete spores. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 3807-3812.

- ♦ **Rihani, A. (2012).** Screening de microorganismes producteurs de lipases : application dans la biodécontamination de surface. Université Badji mokhtar, 55P.

-S-

- ♦ **Samed B. (2011).** Etude prédictive de fiabilité de nouveaux concepts d'assemblage pour des « system-in-package » hétérogènes. UNIVERSITÉ BORDEAUX I.
- ♦ **Sefha F. (2011).** Etude de l'activité enzymatique d'une lipase végétale sous forme libre et immobilisée. Doctoral dissertation, Université Yahia Farès de Médéa.
- ♦ **Sharma, R; Chisti, Y; Benerjee, UC. (2001).** Production purification characterization and application of lipases. *Biotechnol Adv* 19(8): 627-662.
- ♦ **Shivareddy D., Ksheerasagar R. & Abhilash M. (2010).** Isolation, optimization, production and molecular characterization of lipase from *Bacillus* and *Pseudomonas* species and protein profiling. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences* 1, 27-38.
- ♦ **Shouvik, S., Pranab, R., & Sutanu, S. (2012).** Actinomycetes from hospital dump soil produce highly active antibiotic. *International Journal of Microbiology Research*, 4(6), 258-262.
- ♦ **Sirisha, E., Rajasekar, N., & Narasu, M. L. (2010).** Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Advances in Biological Research*, 4(5), 249-252.
- ♦ **Smaoui S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Université de Toulouse. France. 251p.
- ♦ **Stackebrandt, E., Rainey, F. A., & Ward-Rainey, N. L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 479-491.

-T-

- ♦ **Tanaka, Y., & Omura, S. (1990).** Metabolism and products of actinomycetes-an introduction. *Actinomycetologica*, 4(1), 13-14.
- ♦ **Tanchev S., Joncheva N., Genov N., Codounis M. (1980).** Identification of anthocyanins contained in olives. *Georgike Ereuna*, 4 : 5-13.
- ♦ **Thakur S. (2012).** Lipases, its sources, Properties and Applications: A Review. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 3: 1-29.

- ♦ **Tinsson, W. (2010).** Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques (Vol. 67). Springer Science & Business Media.
- ♦ **Tracy J. M., Jensen P. R., Kauffman C. A. and Fenical W. (2002).** Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Appl. Env. Microbiol.* 68 (10): 5005-5011.
- ♦ **Tresner, H. D., Davies, M. C., & Backus, E. J. (1961).** Electron microscopy of Streptomyces spore morphology and its role in species differentiation. *Journal of Bacteriology*, 81(1), 70-80.
- ♦ **Tuomela M, Vikman M, Hatakka A and Itavaara M. (2000).** Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bio resour Technol* 7:169–183.
- ♦ **Turano, E, Curcio, Stefano, DE PAOLA, Maria G., et al (2002).** An integrated centrifugation–ultrafiltration system in the treatment of olive mill wastewater. *Journal of Membrane Science*, 2002, vol. 209, no 2, p. 519-531.

- V-

- ♦ **Vardanega R., Remonato D., Arbter F., Polloni A., Rigo E., Ninow J. L., Treichel H., Oliveira D. & Diluccio M. (2008).** A systematic study on extraction of lipase obtained by solid state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium* sp. *World journal of chemistry*. 3: 55-60.
- ♦ **Veillet, S. (2010).** Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive: Entre Tradition et Innovation. Université d'Avignon).
- ♦ **Vonothini G., Murugan M., Sivakumar K., Sudha S. (2008).** Optimization of protease production by an actinomycete Strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *African Journal of Biotechnology*, 7, p. 3225-3230.

- W-

- ♦ **Waksman, S. A., & Henrici, A. T. (1943).** The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of bacteriology*, 46(4), 337-341.
- ♦ **Williams, S.T., Wellington, E.M.H. (1982).** Principales and problems of selective isolation of microbes. In: *Bioactive microbial products: Search and discovery*. Academic Press, London. 9–26.
- ♦ **Williams S.T., Lanning S and Wellington E.M.H. (1984).** Ecology of Actinomycetales, In: “The Biology of Actinomycetes” Goodfellow M., Moradasski M. and Williams S.T. (Eds.), Academic Press. London. p. 481- 528.

- ♦ **Wisdomkofi Amoa- Awua, Nora NarkiTerlabie, Esther Sakyi-Dawson. (2006).** Screening of 42 Bacillus isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa. International journal of microbiology.106 343-347.

-Z-

- ♦ **Zhang De Long, Jian-He Xu and Jiang Pan. (2007).** Significant Improvement of Serratia marcescens Lipase fermentation, by optimizing medium, induction and oxygen supply. Appl Biochem Biotechnol; 142: 148-157.
- ♦ **Zhen-qian Z and Chun-yun G (2009).** Screening for lipase-producing Enterobacter agglomerans for biodiesel catalyzation. Afr J Biotechnol; 8 (7) :1273–9.

Webographie

- ◆ support.minitab.com

Annexe I :

Matériel utilisé :

1. Appareillages :

- ✓ Balance (Adventurer) (RADWAG).
- ✓ Etuve (Mettler).
- ✓ Bain Marie agitateur (Mettler).
- ✓ Bain Marie (Julabo).
- ✓ Centrifugeuse (BEIJING ERA BEI LI CENTRIFUGE CO, LTD).
- ✓ pH-mètre (BANTE).
- ✓ Spectrophotomètre (RAYLEIGH UV 1800).
- ✓ Rotavapeur (BuchiRotavapor R-114).
- ✓ Plaque chauffante agitatrice (VELP SCientifica, Trade Raypa).
- ✓ Vortex (VELP scientifica référence : ZX3).
- ✓ Shaker (GFL)

2. Verrerie

- ✓ Boites Pétri
- ✓ Tubes à essai
- ✓ Pipette Pasteur
- ✓ Eprouvettes, falcons, bécher, pipettes

Annexe II :

Les solutions utilisées :

Eau physiologique :

- NaCl 9 g
- H₂O distillée..... 1000ml

Solution d'oligo-éléments :

- FeSO₄ 7H₂O.....0,1g
- MnCl₂ 4H₂O0,1g
- ZnSO₄ 7H₂O.....0,1g
- Eau distillée.....100ml

Solution saline

- H₂O qsp.....0.1L
- FeSO₄ 7H₂O..... 0.1g /L
- MnCl₂ 4H₂O..... 0.1g/L
- ZnSO₄ 7H₂O.....0.1g/L
- Agar.....20g

Solution d'hydroxyde de sodium NaOH à (0,1N)

Pour la préparation de 1000ml d'hydroxyde de sodium qui représente une masse molaire de 40g/mol, 4g du NaOH sont dissout dans 1000ml d'eau distillé suivis d'une agitation vigoureuse.

Annexe III :

Milieu liquide pour la production de lipase :

- KH₂PO₄.....0.4g
- K₂HPO₄.....2.1g
- MgSO₄.....0.2g
- CaCl₂.....0.023g
- FeCl₃.....0.002g
- NH₄NO₃.....0.5g
- Eau distillé.....1L
- Substrat lipidique.....2%

Milieu de culture agar ou tributyrine :

- Extrait de levure.....0.2%
- NaH₂PO₄.....0.1%
- MgSO₄.....0.05%
- NaCl.....0.1%
- NH₄SO₄.....0.1%
- Tributyrine.....2%
- pH.....7

Milieu extrait de malt-extrait de levure (ISP 2) :

- Extrait de levure.....4 g
- Extrait de malt.....10 g
- Glucose4 g
- Agar.....20 g
- Eau distillée.....1 L
- pH.....7,3

Milieu farine d'avoine Agar (ISP3) :

- Farine d'avoine.....20g
- Solution saline standard.....1ml
- Agar.....20g
- Eau de mer 50%.....1L

M2 (Milieu à amidon extrait de levure peptone)

- Amidon..... 10g
- Extrait de levures.....4 g
- Peptone..... 2g
- Agar..... 18 g

Annexe IV:

Coloration de gram :

- Faire un frottis
- Coloration avec une solution de violet de Gentiane (cristal violet) pendant une minute
- Rinçage des lames par une solution de lugol
- Décoloration des frottis par lavage avec un mélange d'éthanol et d'acétone
- Recoloration avec (la fuchsine de Ziehl) diluée pendant 15 secondes
- Rinçage abondant à l'eau du robinet
- Une fois séchées, les lames sont examinées sous microscope optique

Annexe V :

Surfaces des réponses des interactions non significatives

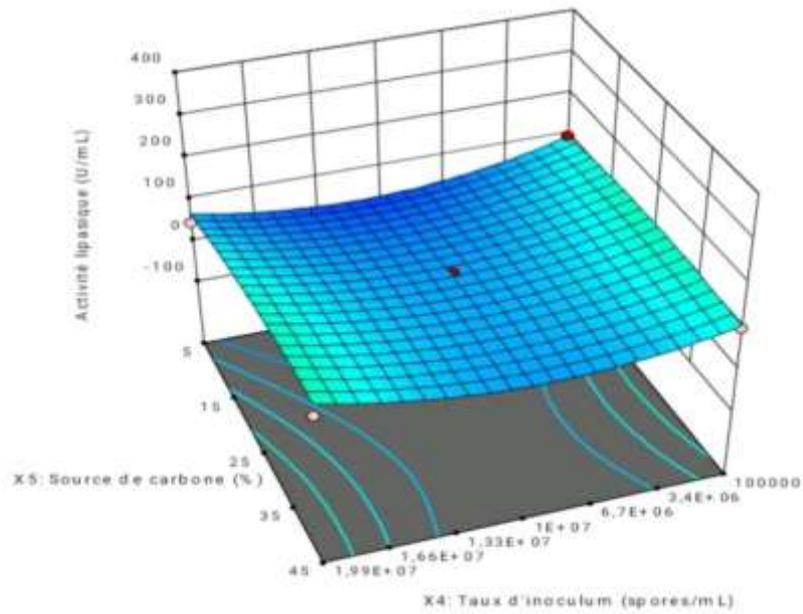


Figure 1 : Surface de réponse de l'interaction X_4X_5

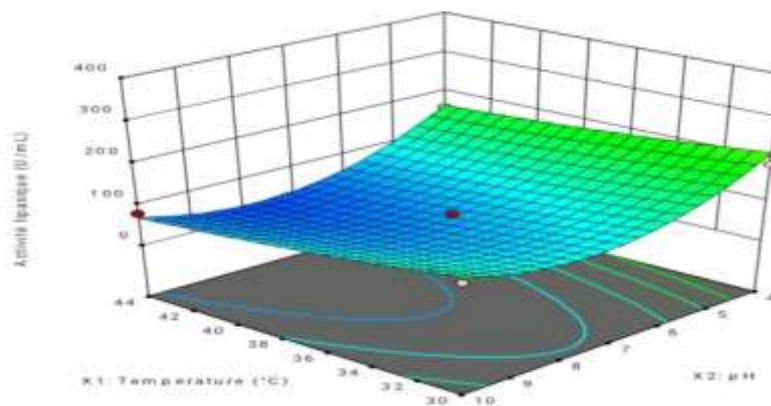


Figure 2 : Surface de réponse de l'interaction X_1X_2

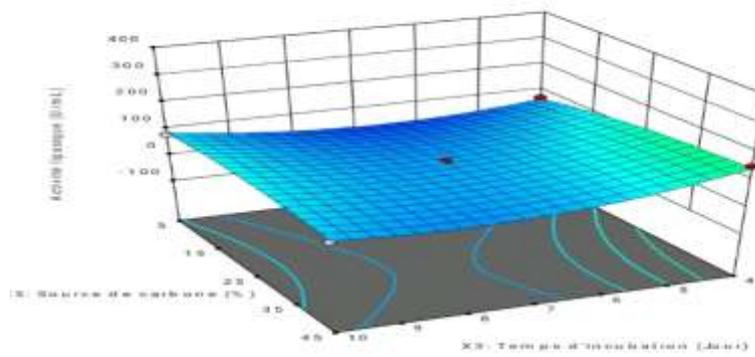


Figure 3 : Surface de réponse de l'interaction X_3X_5

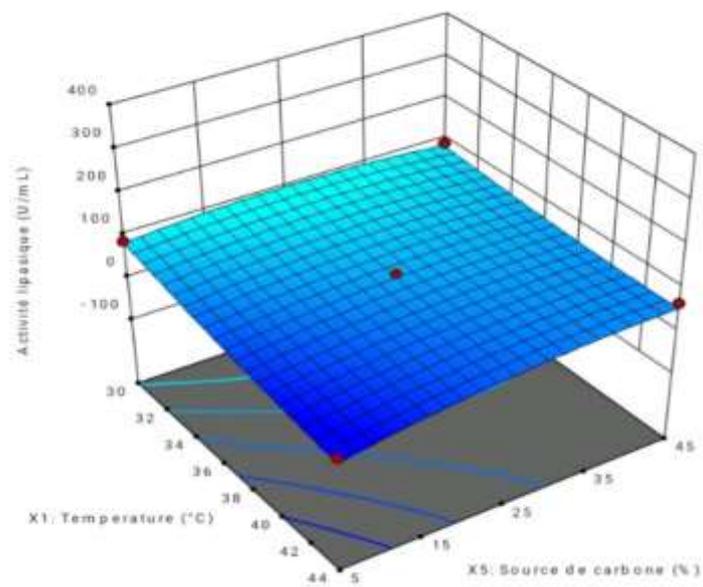


Figure 4 : Surface de réponse de l'interaction X_1X_5

Résumé

Dans cette étude, 13 souches actinobactériennes ont été prélevées de quatre échantillons de Souk El Ténine et Aokas wilaya de Bejaia, et isolées sur les deux milieux Isp2 et M2. notre travail s'est intéressé à la caractérisation morphologique des actinobactéries ainsi qu'une mise en évidence de leur aptitude à produire des lipases dans des milieux à base de margines, la révélation de l'activité lipasique en milieu solide est précédée par la mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse et par titrage en milieu liquide, en parallèle un suivi de la cinétique de croissance de la souche sélectionnée pour l'optimisation (SC aok 10^{-4}) est réalisé par la mesure de la densité optique à 600 nm chaque 24h pendant 10 jours.

En vue d'améliorer la production de lipases, un plan Box Benkhen design a été adopté en variant le temps d'incubation (jours), le pH ; la température °C, le taux d'inoculum (spores / ml) et la concentration initiale en margine (%).

Les résultats d'optimisation obtenus, ont montré qu'une meilleure activité a été atteinte au bout de 4 jours d'incubation à un pH de 10, un taux d'inoculum de $1.7E+07$, une température de 44°C et une source de carbone de 20 %.

Mots clé : Lipase, margines, actinobactéries, optimisation, plans d'expériences

Abstract

In this study, 13 actinobacterial strains were collected from four samples in the regions of Souk El Ténine and Aokas wilaya of Bejaia, and isolated on the two media Isp2 and M2.

Our work was interested in the morphological characterization of actinobacteria as well as a highlighting of their ability to produce lipases in media based on margines, The quantification of lipase activity in solid medium is carried out by measuring the diameter of the hydrolysis zone and by titration in liquid medium, in parallel a follow-up of the growth kinetics of the strain selected for the optimization (SC aok 10^{-4}) is carried out by measuring the optical density at 600 nm every 24 hours during 10 days

In order to improve the production of lipases, a Box Benkhen design plan was adopted by varying the incubation time (days), the pH, the temperature °C, the inoculum rate (spores / ml) and the initial concentration of margine (%). The optimization results obtained, showed that a better activity was achieved after 4 days of incubation at pH 10, inoculum rate $1.7E+07$ (spores/mL=), temperature 44°C and carbon source 20%.

Key words: Lipase, margines, actinobacteria, optimization, experimental design.