

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Bejaïa

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



Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

**Etude de l'activité kératolytique d'une  
souche d'actinobactérie du genre  
*Streptomyces sp.***

Présenté par :  
**BENSAIDOUNE Tinhinane & BOUMERAOU Souhila**  
Soutenu le : 21 Juin 2018

Devant le jury composé de :

Mme BOUCHERBA Nawel  
Melle DJINNI Ibtissem  
Melle BOUKTIT Nadia

MCA  
MCB  
MAA

Présidente  
Encadreur  
Examinatrice

**Année universitaire 2017/2018**

## Remerciements

*Nous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissance et nos vifs remerciements en premier lieu à Melle Djinni. I, qui nous a appris une infinité de choses et qui nous a aidé et conseillé tout au long de ce travail.*

*A notre enseignante Mme Arkoub qui nous a permis de réaliser une partie de ce travail, pour son aide, son soutien.*

*A Mme Boucherba N, qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider notre jury.*

*A Melle Bouktit N, pour avoir accepté d'examiner notre mémoire.*

*Nos remerciements vont aussi aux techniciennes du laboratoire de Mycologie et de Microbiologie pour nous avoir fourni le matériel et d'avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.*

## Dédicace

*Je dédie ce travail*

*A mes parents, pour m'avoir toujours permis d'aller de l'avant avec leurs encouragements, leurs précieux conseils et leur soutien inconditionnel.*

*A Nana qui a toujours su quoi me dire, pour sa sagesse et pour sa compréhension, merci de m'avoir toujours montré le chemin à suivre.*

*A mon frère, et à ma sœur qui malgré la distance sont toujours présents pour moi, je vous souhaite beaucoup de réussite.*

*A mes chers amis, surtout à Mimicheka qui a supportée mes crises de stress, qui m'a apportée son aide à chaque instant, et avec qui j'ai partagé mes plus beaux éclats de rire, tu es ma meilleure.*

*Tinhinane*

## Dédicace

*Je dédie ce travail*

*A mes parents les plus chers au monde qui m'ont mené pas à pas à la réussite et à la concrétisation de mes objectifs que dieu vous protège et vous prête toute une longue et heureuse vie.*

*A mes adorables sœurs Adja, Faiza, Souad et Djawida sans oublié leurs maris et leurs enfants.*

*A mon très cher frère Mohand said qui m'a soutenu.*

*A mes chères amies, Sabrina, Lydia, Dyhia, Hayet, Imene, Mimi, Tissou, Mouna, Dalila, Kahina, Radia et Hanane nous avons passés des bons moments ensemble.*

*A tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'au cycle universitaire.*

*Souhila*

<b>Tableau n°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires.	14
<b>II</b>	Matrice des expériences pour 04 facteurs ( $K = 4$ ) et $N_f = 2^K = 16$ .	15
<b>III</b>	Caractères morphologiques des 10 souches étudiées sur les milieux Gausse, SCA et SCA 50% eau de mer.	16
<b>IV</b>	Croissance des souches étudiées sur les milieux FBMs et les milieux nutritifs respectifs.	17
<b>V</b>	Croissance des souches étudiés sur le milieu GNL	19
<b>VI</b>	Caractéristiques macromorphologiques de la souche TS3 après 7 jours d'incubation à 28 °C sur différents milieux ISP.	21
<b>VII</b>	Matrice des expériences pour $K=4$ , $N=16$	23
<b>VIII</b>	Valeurs de l'activité kératinolytique au centre du domaine d'étude.	24
<b>IX</b>	Valeurs des coefficients du modèle de régression.	24
<b>X</b>	Valeurs de $t_j$ calculés.	25

N° de figure	Titre	Page
1	La distribution des actinobactéries dans la nature.	4
2	Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> sur milieu solide.	5
3	Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinobactéries.	7
4	Les liaisons de cohésion de la kératine.	8
5	Plan composite pour l'étude de deux facteurs ( $K = 2$ ).	10
6	Etapes d'obtention d'une poudre de plumes de poulets.	12
7	Photographies présentant la croissance et l'aspect morphologique des colonies des huit souches étudiées sur milieu FBMs.	18
8	Mise en évidence de l'activité protéolytique des 8 isolats d'actinobactéries suite à la formation d'halos clairs autour des spots.	19
9	Evaluation de l'activité kératinolytique des filtrats de cultures des isolats étudiés sur le milieu FBML.	20
10	Aspect macromorphologique de la souche TS3 sur les milieux ISP après 7 jours d'incubation à 28 °C.	21
11	Observation au microscope optique des mycéliums aériens et du substrat de la souche à l'objectif x10 (A) et à l'objectif x40 (B).	22
12	Courbe isoréponses (a) et surface de réponse (b) pour $x_1 = 0$ et $x_4 = 0$ .	28
13	Courbe isoréponses (a) et surface de réponse (b) pour $x_1 = -1$ et $x_4 = -1$ .	28
14	Courbe isoréponses (a) et surface de réponse (b) pour $x_1 = +1$ , $x_4 = +1$ .	29

**DMSO** : Diméthyle sulfo oxyde.

**FBM** : Milieu à base de farine de plumes.

**FBMS** : Milieu à base de farine de plumes solide.

**FBML** : Milieu à base de farine de plumes liquide.

**GNL** : Gélose nutritive à base du lait écrémé.

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

**K** : Nombre de facteur opératoire.

**LMA** : Laboratoire de Microbiologie Appliqué.

**MA** : mycélium aérien.

**MIB** : 2-methylisobornéol.

**MS** : mycélium du substrat.

**N** : nombre d'expérience.

**SCA** : milieu Amidon Caséine Agar.

**TCA** : Acide trichloracétique.

**Xi** : Niveau du facteur i.

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1

---

## Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---

<b>I. Généralités sur les actinobactéries.....</b>	<b>3</b>
<b>II. Ecologie, taxonomie et importance des actinobactéries.....</b>	<b>3</b>
1. Ecologie et cycle de développement.....	3
2. Taxonomie.....	5
3. Importance.....	6
<b>III. Le métabolisme des actinobactéries.....</b>	<b>6</b>
1. Métabolisme primaire .....	6
2. Métabolisme secondaire .....	7
2.1. Production d'antibiotiques.....	7
2.2. Production d'enzymes.....	8
2.2.1. Production de kératinases.....	8
2.2.2. Rôle et importance des kératinases .....	9
<b>IV. Modélisation statistique .....</b>	<b>9</b>

---

## Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

---

<b>I. Matériels .....</b>	<b>11</b>
1. Matériel analytique .....	11
2. Matériel biologique.....	11
<b>II. Criblage et sélection de souches productrices de kératinases .....</b>	<b>11</b>
1. Repiquage des souches .....	11
2. Mise en évidence de la production de kératinases.....	11
3. Mise en évidence de l'activité protéolytique et sélection de souches kératinolytiques...12	
<b>III. Evaluation de l'activité kératinolytique .....</b>	<b>12</b>
1. Préparation du substrat .....	12
2. Production de kératinases sur milieu liquide .....	13
3. Mise en évidence de l'activité .....	13
<b>IV. Etude des caractères morphologiques de l'isolat sélectionné .....</b>	<b>14</b>



1. Caractères macromorphologiques .....	14
2. Caractères micro-morphologiques .....	14
V. Modélisation de l'activité kératinolytique de la souche sélectionnée .....	14

---

### Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

---

I. Criblage et sélection des souches productrices de kératinases .....	16
1. Repiquage des souches .....	16
2. Mise en évidence de la production de kératinases .....	17
3. Mise en évidence de l'activité protéolytique et sélection de souches kératinolytiques .....	18
II. Evaluation de l'activité kératinolytique .....	20
1. Mise en évidence de l'activité .....	20
III. Etude des caractères morphologiques de l'isolat sélectionné .....	20
1. Caractères macromorphologiques .....	20
2. Caractères micro-morphologiques .....	22
IV. Modélisation de l'activité kératinolytique de la souche sélectionnée par un plan factoriel complet à deux niveaux avec interactions .....	23
1. Calcul des coefficients du modèle .....	24
2. Analyse statistique de l'équation de régression .....	24
2.1. Vérification de la signification des coefficients par le test de Student .....	25
2.2. Test de validation de l'équation de régression .....	26
2.3. Calcul du coefficient de corrélation .....	26
V. Optimisation .....	27
1. Recherche de l'optimum .....	27
Discussion .....	30
Conclusion .....	32

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Abstract

# Introduction

Depuis des milliers d'années, les microorganismes sont omniprésents et occupent une place importante dans l'environnement. Ils sont à l'origine de l'essor de la biotechnologie grâce aux nombreux métabolites secondaires qu'ils produisent. En effet, ils représentent une source importante de composés à diverses activités. Les actinobactéries constituent la partie la plus significative de la population microbienne, et font objet de nombreuses recherches à savoir la production d'antibiotiques et d'enzymes.

Parmi les enzymes hydrolytiques les plus importantes, on retrouve les protéases, elles représentent 60% des ventes totales d'enzymes dans le marché mondial (Rao, 1998 ; Rai, 2010). Cependant, ces enzymes n'ont pas la capacité de dégrader la kératine qu'on retrouve particulièrement dans les plumes de volailles provoquant une pollution de l'environnement quand celles-ci s'accumulent. Par ailleurs, dans la nature les kératines sont hydrolysées par certains microorganismes entre autres les actinobactéries qui synthétisent des kératinases.

Dans un but de valorisation d'un sous-produit encombrant : les plumes de volailles réduites en farine sont utilisées comme substrat de culture pour la croissance d'actinobactéries à activité kératinolytique. Cette approche est moins coûteuse et représente moins d'inconvénients écologiques.

Les kératinases de micro-organismes ont une multitude d'applications industrielles telles que dans les industries alimentaires animales, les industries des engrais, les industries de cuir, le traitement des résidus de kératine ainsi que dans les détergents. En revanche, ces enzymes sont exploitées seulement dans les deux premiers secteurs, alors que les autres sont encore à l'échelle expérimentale (Brandelli et al, 2009).

Toutefois, des études d'optimisation doivent être réalisées afin d'améliorer cette production et cela en déterminant les paramètres opératoires menant à une production maximale de ces enzymes kératinolytiques. A cet effet, plusieurs méthodes sont utilisées telles que la méthode du « One Factor At Time » (OFAT) et la méthode des plans d'expérience qui est la plus efficace à fin de déterminer les valeurs optimales des facteurs opératoires.

Dans le présent travail, nous nous sommes orientés vers l'étude et l'optimisation de la production de kératinases par des actinobactéries du genre *Streptomyces* sp, en utilisant comme seule source de carbone et d'azote la poudre de plumes.

Ce mémoire comporte trois chapitres, le premier, porte sur les généralités des actinobactéries, notamment leur écologie, systématique, importance, leur métabolisme essentiellement le métabolisme secondaire où la structure et l'intérêt des kératinases ont été détaillé, suivi de notions fondamentales relatives aux plans d'expériences.

Le deuxième chapitre expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre dans le criblage des souches étudiées, suivi par la mise en évidence de l'activité protéolytique et kératinolytique dans le but de sélectionner la souche la plus performante, ainsi que l'étude morphologique de la souche sélectionnée. Enfin la modélisation de l'activité kératinolytique par le biais d'un plan factoriel du premier degré avec interactions dans le but de déterminer les conditions optimales des variables opératoires a été effectuée.

Enfin, le troisième chapitre rapporte l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude, ainsi qu'une discussion sur ces derniers.

# Synthèse bibliographique

## I. Généralités sur les Actinobactéries

Les actinomycètes doivent leur dénomination à la combinaison de deux mots « Aktis » et « Mykes » qui signifient champignons à rayons (Lamari, 2006). Ces substantifs ont été empruntés au grec pour désigner la capacité de ces bactéries à se développer autour du germe qui leurs a donné naissance (Kitouni, 2007).

Ils sont connus sous le nom Actinobacteria (Perry et al, 2004) et constituent l'ordre des *Actinomycetales*. Ce sont des bactéries à Gram positif qui forment des filaments minces, ramifiés et septés (Dgigal, 2003). La plupart des actinobacteries sont hétérotrophes et certaines sont chimio-autotrophes (Ensign et al, 1993), aérobies, mésophiles et se développent de façon optimale dans la gamme de pH variant entre 5,0 et 9,0 avec une tendance optimale à la neutralité (William et Wellington, 1982 ; Goodfellow et Williams, 1983).

Ces microorganismes présentent de nombreuses analogies, à la fois, avec les bactéries et les champignons ce qui a permis de les classer comme étant un groupe intermédiaire. Longtemps confondus avec les champignons (eucaryotes) (Otto, 1998), du fait de l'allure mycosique et des maladies qu'ils provoquent (Lefebvre, 2008). Aujourd'hui, leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques les classent parmi les procaryotes. Ces bactéries saprophytes sont souvent immobiles, cependant, certains genres produisent des sporanges pouvant contenir des spores mobiles à l'aide de flagelles appelées Zoospores (Kalakoutski et Agre, 1976).

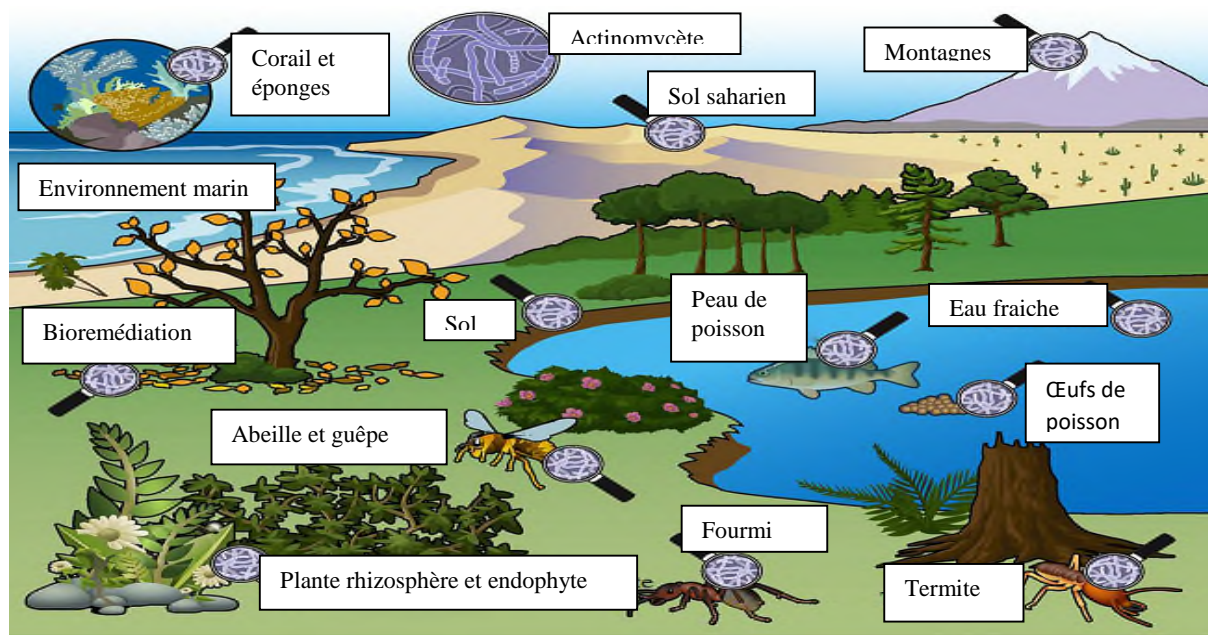
Les actinobacteries sont dotées d'un ADN chromosomique. Toutefois, certaines espèces possèdent de l'ADN plasmidique ou phagique, d'une taille de 3.7 Méga Daltons qui est deux fois plus grande que celle de l'ADN de *E. coli*. Il est caractérisé par une proportion élevée de guanine et de cytosine (Coefficient de Chargaff) d'environ 60 à 70% (Larpen et al, 1989).

## II. Ecologie, taxonomie et importance des actinobacteries

### 1. Ecologie et cycle de développement

Les actinobactéries colonisent de nombreux biotopes, elles sont majoritairement d'origine tellurique, notamment dans la rhizosphère. D'après Waksman, (1963), la couche superficielle contient au moins 80% de bactéries actinomycétales par rapport au nombre total de microorganismes, et ce rapport diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente, où il atteint 40% à une profondeur de 80 centimètre et peut aller jusqu'à 16%. Elles produisent de la géosmine et du 2-méthylisobornéol (MIB) qui contribuent à donner au sol son odeur caractéristique (Omura, 1992, Zaitlin et al, 2003). De plus, elles sont capables de noduler les racines de certaines plantes et de fixer l'azote atmosphérique, cette association est nommée

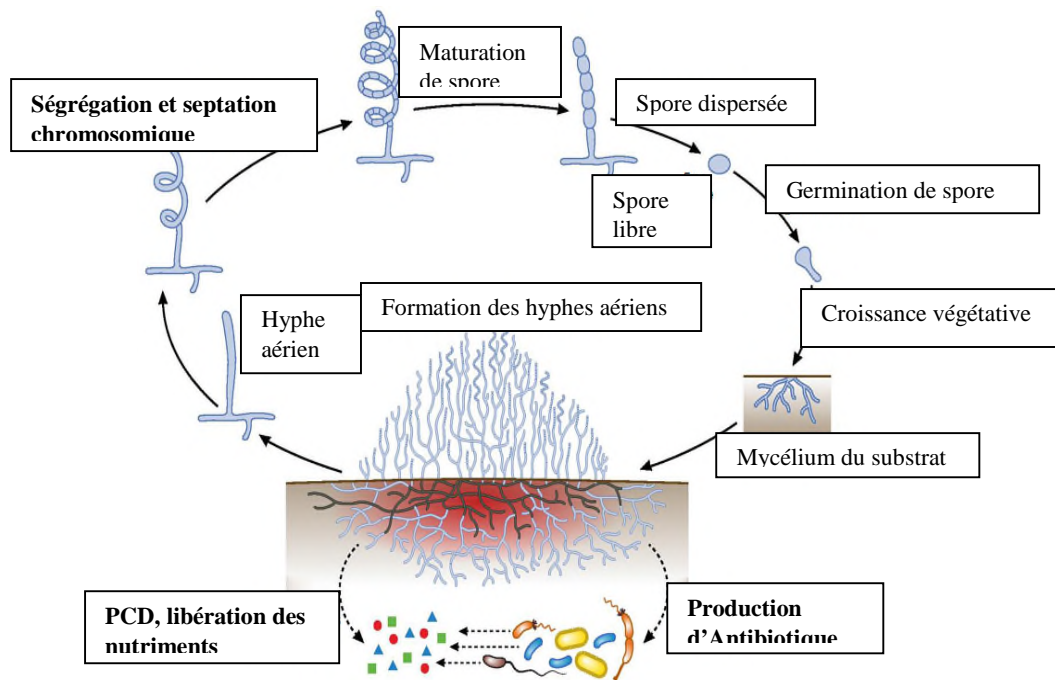
association actinorhizienne (Prescott et al, 2007). Par ailleurs, les actinobactéries ont été également isolées à partir des eaux douces et marines où elles jouent un rôle dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre (Xu et al, 1996 ; Hwang et al, 2001). Elles sont également actives, notamment, dans les derniers stades du compostage, en attaquant les structures les plus résistantes comme la cellulose et la lignine (Zermane, 2007).



**Figure 1 :** La distribution des actinobactéries dans la nature (Gilles P. van Wezelet al, 2017).

Les actinobactéries possèdent trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort (Danilenko et al, 2005).

En effet, la vie d'un Streptomycète sur un milieu solide, débute par la germination d'une spore, qui donne naissance à un mycélium primaire ramifié et modérément cloisonné qui se développe à la surface et à l'intérieur du substrat nutritif. Sur ce mycélium primaire se développe un mycélium secondaire dit aérien, il est composé d'hyphes souvent pigmentés et sont enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe ; une fois développé celui-ci couvre les colonies de surfaces donnant un aspect poudreux compact, poilu ou en chou-fleur (Kitouni, 2007). Le cycle de développement du genre *Streptomyces* est détaillé dans la figure 2 ci-après.



**Figure 2** : Cycle de développement du genre *Streptomyces* sur milieu solide (Gilles P. van Wezel et al, 2017)

Toutefois, en milieu liquide, la croissance nécessite une aération du milieu par agitation, et/ou par injection d'air vu que ces bactéries sont aérobies strictes ; les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si certaines espèces peuvent sporuler dans ces conditions (Madigan et Martinko, 2007). Les espèces du genre *Streptomyces* se développent par élongation des filaments qui peuvent par la suite présenter différents aspects morphologiques : pellets ou dispersées qui regroupe deux types : librement dispersés ou groupes mycéliales (agrégats) (Saffroy, 2006).

## 2. Taxonomie

La taxonomie est définie comme l'étude de la diversité des microorganismes et des relations susceptibles d'exister entre eux. Elle englobe : la classification qui établit les taxons selon les critères phénotypiques et moléculaires, la nomenclature qui est l'attribution d'un nom aux groupes taxonomiques selon un système binomial (lois de Linné), et l'identification qui assigne une souche inconnue à un de ces groupes (Kitouni, 2007).

Les actinobactéries appartiennent au règne des *Procaroyotes*, à la division des *Firmicutes* et à la classe des *Thalobacteria*, contenant l'ordre des *Actinomycetales* (Larpen, 2000 ; Ouhdouch, 2003 ; Alauzet, 2009). L'étude de leur taxonomie a connu plusieurs réévaluations et modifications, et ce durant les trois dernières décennies, dues à l'applications de nouvelles techniques (Abbas, 2006), quatre périodes distinctes ont été marquées :



La première période est d'ordre descriptive, elle s'est étendue jusqu'au début des années 60, elle a permis de distinguer les différents genres en se basant sur les caractéristiques macro et micro morphologiques (Pridham et al, 1958). A partir des années 60, la seconde période a vu le jour, basée sur l'analyse des constituants cellulaires. Cette période fut caractérisée par le développement de la chimiotaxonomie combinée aux descriptions morphologiques, puis la troisième période a débuté dans les années 70, où l'outil informatique fut combiné aux tests physiologiques, le but était de clarifier l'identification des espèces (Grund et Kroppenstedt, 1990). Enfin, la quatrième période débuta à partir des années 80, caractérisée par l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires et cela pour déterminer les parentés phylogénétiques (Stakebrandt et Woese, 1981).

### 3. Importance

Les actinobactéries ont une importance capitale dans diverses applications, particulièrement dans les domaines de l'agronomie et de la biotechnologie.

**En agronomie :** le pouvoir antagoniste des actinobactéries leur confère un rôle important dans la lutte biologique contre certains agents phytopathogènes du sol (Goodfellow et Williams, 1983). En effet, elles jouent un rôle dans la décomposition de la matière organique et la transformation des composés organiques complexes grâce à leur large gamme d'enzymes (Pizzul, 2006 ; Vijiyakumaret al, 2007).

**Dans le domaine biotechnologique :** les actinobactéries sont utilisées dans la thérapie humaine et vétérinaire, mais également dans la production de plusieurs molécules bioactives telles que les antibiotiques, les antiparasitaires, les herbicides ou les pesticides ... etc

## III. Le métabolisme des actinobactéries

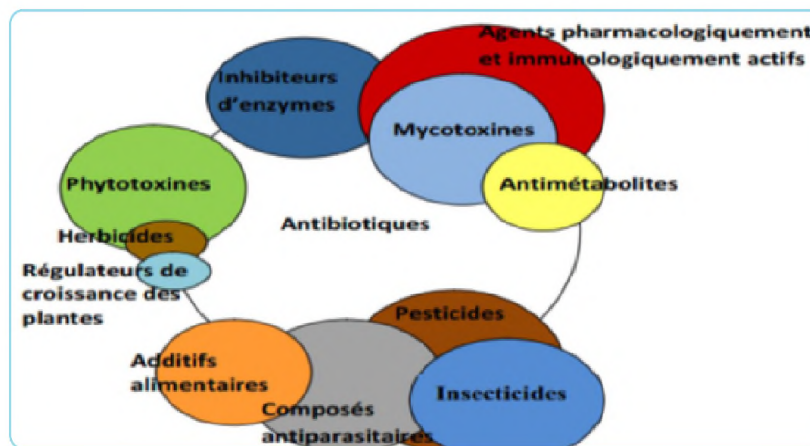
Grâce à leurs génomes potentiellement grand qui renferme des centaines de facteurs de transcription contrôlant l'expression génique, les *actinomycetaeceaes* sont dotées d'une large diversité métabolique qui leur permet de répondre à des besoins spécifiques (Singh et al., 2006). Le métabolisme des actinobactéries peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire (Strub, 2008).

### 1. Métabolisme primaire

Les actinobactéries ainsi que les autres micro-organismes possèdent un métabolisme primaire similaire. En effet, c'est au cours de la phase de croissance que les métabolites primaires sont produits, permettant le fonctionnement général du métabolisme et la formation de la structure cellulaire tel que les alcools et les enzymes (Theilleux, 2013).

## 2. Métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire est l'ensemble des voies de synthèse d'antibiotiques et de molécules permettant un meilleur accès aux nutriments et non essentiels aux fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire comme les sidérophores (Wang et al, 1999 ; Challis et Hopwood, 2003). Les métabolites secondaires sont produits, au cours de la phase stationnaire, à partir d'un petit nombre de précurseurs issus du métabolisme primaire (Teilleux, 1993 ; Mellouli et al, 2004). Ainsi, les actinobactéries peuvent produire de nombreux métabolites secondaires dont les activités diffèrent comme le montre la figure 3. Cependant ce métabolisme est influencé par plusieurs facteurs tels que la nature et les taux de sources de carbone, d'azote et de la disponibilité du phosphore (Ou et al., 2008 ; Tarkka et Hampp, 2008).



**Figure 3:** Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinobactéries (Conn, 2005).

### 2.1. Production d'antibiotiques

Le terme antibiotique désigne toute substance, naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou chimique, capable d'inhiber spécifiquement la vitalité des micro-organismes (Walsh, 2003 ; Zomahoun, 2005). On peut en distinguer deux types selon leurs activités, ceux qui inhibent la croissance microbienne appelés les bactériostatiques, et ceux qui les tuent appelés les bactéricides. Selon sa concentration, un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets (Prescott, 2003).

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme et le spectre d'action (Yala et al, 2001).

Parmi les micro-organismes producteurs de ces métabolites secondaires, les actinobactéries sont les plus prolifiques avec un pourcentage de 70% dont 95% provenant du genre *Streptomyces* (Bastide et al, 1986). Les antibiotiques des actinobactéries peuvent être classés en groupes chimiques (Berdy, 2005) : Les bêta-lactames (pénicilline), les

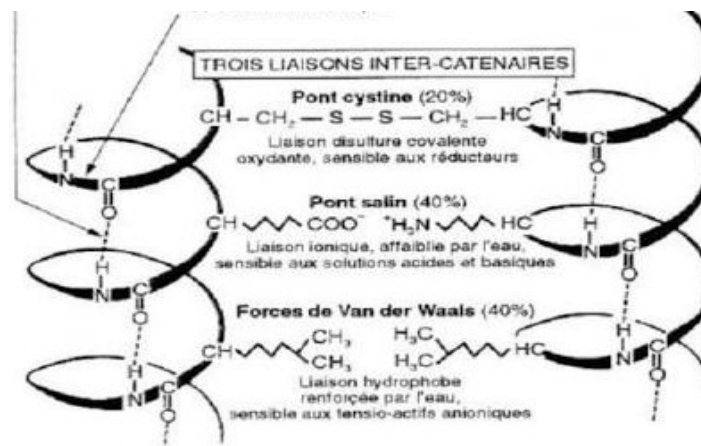
aminoglycosides (streptomycine), les glycopeptides (vancomycine), les anthracyclines (daunorubicine), les macrolides (erythromycine), les tétracyclines (minocycline) et les polyenes (nystatine).

## 2.2. Production d'enzymes

Les actinobactéries sont d'excellents producteurs d'enzymes à applications biotechnologiques variées dans différents domaines tels que : la médecine, la biologie moléculaire (Loucif, 2010), ou encore en industrie telles que les protéases, les chitinases (Vonothini et al., 2008), les glycosidases qui jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases, xylanases) et animales (chitinases) (Lechevalier, 1981).

### 2.2.1. Production de kératinases

Les kératinases (EC 3.4.21/24/99,11) appartiennent au groupe des sérines ou métalloprotéases. Ce sont des enzymes extracellulaires produites dans un milieu contenant des substrats kératiniques tels que les plumes (Selvam et Vishnupriya, 2012). Elles sont capables de dégrader la kératine, dont la structure est présentée dans la figure 4, par réduction des liaisons disulfures et la protéolyse (Gupta et Ramnani, 2006). En effet elles agissent comme catalyseur potentiel dans la dégradation des déchets kératiniques sans affecter les protéines structurales (Macedo et al., 2005).



**Figure 4** : Les liaisons de cohésion de la kératine (Berrada, 2007).

Ces enzymes sont très répandues, elles peuvent être isolées à partir des eucaryotes, des microorganismes et des archaebactéries. Toutefois les kératinases microbiennes présentent une grande diversité due à leurs propriétés biochimiques et biophysiques (Saha, 2009).

Les actinobactéries du genre *Streptomyces* sont communément décrites comme des bactéries kératolytiques avec une capacité d'agir sur une grande variété de substrats, y compris la kératine des cheveux, de la laine et des plumes (Gupta et Ramnani, 2006).

### 2.2.2. Rôle et importance des kératinases

Les kératinases sont des enzymes à utilisation biotechnologique intéressante. En effet, elles peuvent être exploitées dans divers domaines, en l'occurrence dans le marché des détergents. Néanmoins le besoin d'élargir le champ de leur application est toujours d'actualité. Les kératinases peuvent aider à éliminer des taches kératiniques qui sont souvent rencontrées dans la blanchisserie (Gupta et Ramnani, 2006). De plus, elles peuvent être utilisées comme additifs pour le nettoyage des canalisations bouchées par des déchets kératiniques (Frag et Hassan, 2004) ainsi que dans la dégradation des prions. En effet, les kératinases semblent être les seules enzymes aptes à dégrader les prions qui sont des particules protéiques responsables de maladies neurodégénératives appelées Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) (Van raamsdonk et al, 2004).

Ces enzymes sont également utilisées dans le tannage qui est un procédé chimique, consistant à transformer les peaux en les rendant plus souples (Deré, 2007). Cette approche moderne offre un avantage économique et environnementale par la diminution de l'emploi des produits chimiques (Andersen, 1998 ; Gupta et al, 2002).

Plusieurs autres applications potentielles ont été rapportées telles que la récupération de l'argent dans le bioprocédé des films photographiques, la digestion anaérobie des déchets de volaille pour produire du gaz naturel comme combustible (Brutt et Ichida, 1999), mais aussi elles peuvent servir en médecine et en pharmacie où elles sont employées dans le traitement de l'acné, dans la préparation de vaccins pour la dermatophytose ou dans les agents à action éclaircissante de la peau car ils stimulent la dégradation de la kératine (Vingnardeta et al, 2001).

## IV. Modélisation Statistique

La méthode des plans d'expériences permet d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique, ils sont applicables dans de nombreuses disciplines du moment où en recherche le lien qui existe entre une valeur d'intérêt  $Y$  et des variables  $X_i$ . Elle a de nombreux avantages comme la diminution du nombre d'essais, la déduction des paramètres influents, l'évaluation des interactions entre les paramètres, la prédiction et l'optimisation. (Lewis et al, 1999) ; Goupy, 2005 ; Fadil et al, 2014)

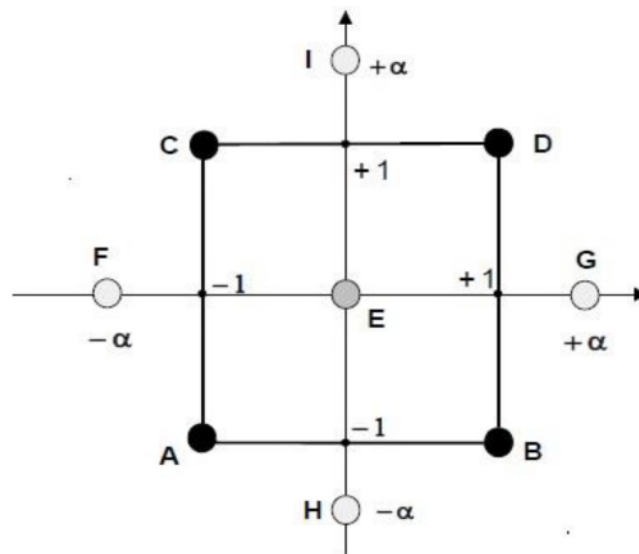
Les plans composites centrés, proposés par Box et Wilson en 1951, s'avèrent particulièrement utiles dans les expériences séquentielles (Goupy et Creighton, 2006). Le plan se compose généralement d'une conception factorielle complète  $2^k$  (Kuehl, 2000). Ça consiste

à réaliser les essais d'un plan factoriel, complété par des expériences au centre du domaine d'étude et des essais en étoile comme l'illustre la figure 5 ci-dessous.

Ainsi, un plan composite centré comporte trois types de points :

- Les  $N_f$  sommets d'un plan factoriel à deux niveaux
- Les  $N_0$  points au centre
- Les  $N_a$  points « en étoile », situés symétriquement sur les axes du domaine à une distance plus ou moins du centre ( $N_a = 2k$ ).

Le nombre  $N$ , des essais de ce plan est donné par la relation  $N = N_f + N_0 + N_a$ . (Keharom et al, 2016).



**Figure 5 :** Plan composite pour l'étude de deux facteurs ( $K = 2$ ) (Goupy, 2006)

Le modèle mathématique postulé utilisé avec les plans composites est un modèle du second degré avec interactions (Shivakumar et al, 2008). Pour deux facteurs on aura l'équation de régression suivante :

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_{12} + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2$$

# Matériel et méthodes

## **I. Matériels**

### **1. Matériel analytique**

Le matériel utilisé dans cette étude est rapporté en Annexe I.

### **2. Matériel biologique**

Les micro-organismes étudiés sont des actinobactéries appartenant à la collection du laboratoire de microbiologie appliqué (LMA), isolées par Dr Djinni.I, à partir de niches écologiques variées (sol, sédiments de rivière et marins, invertébrés marins).

## **II. Criblage et sélection des souches productrices de kératinases**

### **1. Repiquage des souches**

Les dix isolats de l'étude ont été repiqués à partir de cultures, sur milieu solide, conservées à 4°C, sur leurs milieux d'isolement respectifs, à savoir le milieu Amidon Caséine Agar (SCA), le milieu Amidon Caséine Agar à 50% eau de mer (Williams et Kuster, 1964), et le milieu Gausse (Ivantiskaya et al., 1978), puis incubé à 28°C pendant 7 à 10 jours, afin de s'assurer de leur pureté.

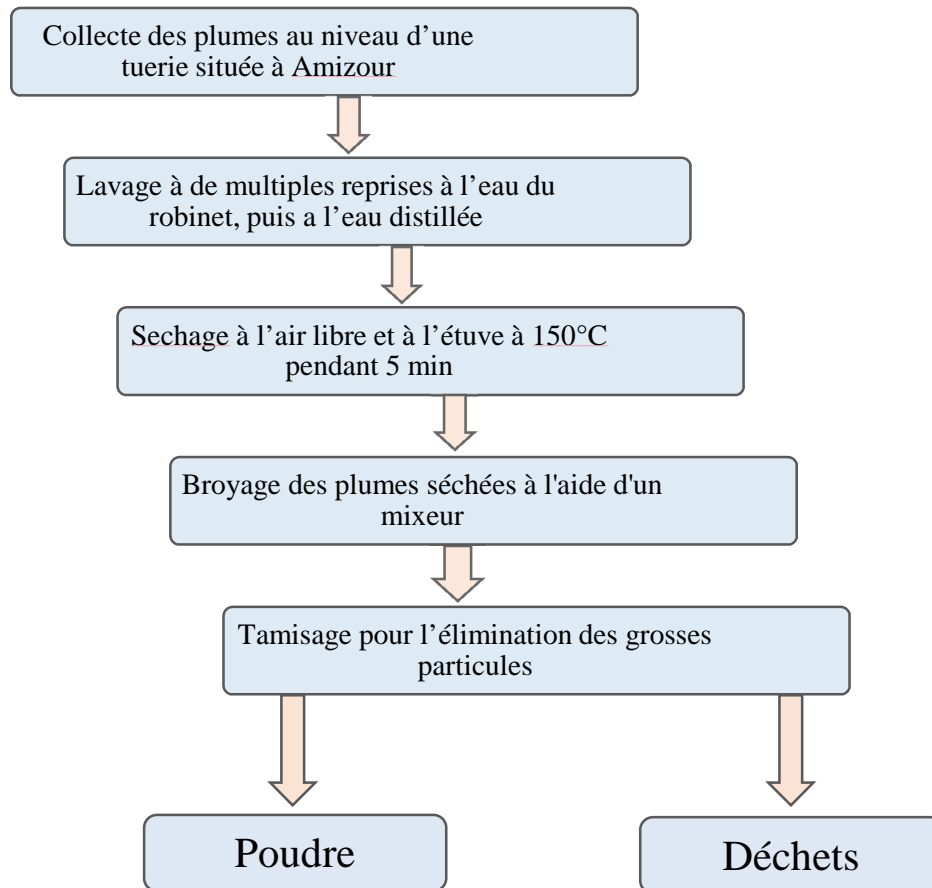
La composition de ces milieux de culture est donnée en Annexe II.

### **2. Mise en évidence de la production de kératinases**

Afin de mettre en évidence la production de kératinases par les 10 souches étudiées, ces dernières ont été ensemencées sur un milieu sélectif solide à base de farine de plumes (FBMs) (Annexe II). En effet ce dernier a été préparé selon la méthode de Williams et collaborateurs en (1990).

En premier lieu, une poudre de plumes de volailles a été préparée suivant les étapes décrites dans la figure 6. Le milieu préparé a été autoclavé à 121 °C/20 min après avoir ajouté la poudre à la composition de base. L'ensemencement des 10 isolats a été effectué par la méthode des stries serrées, et les boîtes incubées à 28 °C pendant 7 jours.

L'appréciation de la production de kératinase est représentée par la capacité des isolats à se développer sur ce milieu.



**Figure 6** : Etapes d'obtention d'une poudre de plumes de poulets

### 3. Mise en évidence de l'activité protéolytique et sélection de souches kératinolytiques

L'activité protéolytique des 10 souches étudiées a été évaluées par un ensemencement par touches sur une gélose nutritive à base de lait écrémé (GNL) (Annexe II), puis incubées à 28°C pendant 7 jours.

L'appréciation de l'activité protéolytique est assurée par la présence de zones de dégradation de la caséine du lait autour des colonies.

### III. Evaluation de l'activité kératinolytique

Dans le but d'évaluer l'activité kératinolytique des isolats préalablement sélectionnés, une culture liquide sur milieu à base de farine de plumes de volailles (FBML) (Annexe II) a été préparée selon le protocole suivant

#### 1. Préparation du substrat

La première étape consiste à dissoudre 5 g de plumes dans 250 ml de diméthyle sulfo oxyde (DMSO), qu'on chauffe dans un rotavapeur à 80 °C pendant 4 heures, ce qui va engendrer une kératine soluble qui sera précipité par l'ajout de 500 ml d'acétone refroidis à (-80 °C) pendant 2 heures.



Le précipité a été récupéré par centrifugation réfrigérée à 5000 g pendant 20 min, puis laver à l'eau distillée, filtrer sur papier whatman et enfin un sécher à 50 °C jusqu'à l'obtention d'une poudre ( $\approx$  3g).

La deuxième étape a été réalisé par la dissolution de 1g de cette poudre dans 20 ml de NaOH (1N), avec un ajustement du pH à 8 par une solution de HCl (1N), qui a été par la suite dilué dans 200 ml de Tris-HCl (0.05M) (Annexe III) (Gradisar et al, 2005 ; Park et son, 2009) ainsi on aura un substrat prêt a l'emploi et conservé à 4 °C dans des flacons.

## 2. Production de kératinases sur milieu liquide

L'évaluation de l'activité kératinolytique a été effectuée sur milieu liquide où 05 flacons de 250 ml contenant 75 ml de milieu FBML ont été préparés puisensemencés avec un inoculum sporale (3 cylindres). Les cultures sont par la suite mises à incuber dans un shaker sous agitation permanente (120 tours/min) à 28 °C pendant 7 jours.

## 3. Mise en évidence de l'activité




Le test d'activité a été réalisée par le mélange de 1 ml de surnageant de culture avec 1 ml de substrat pour chaque souche sélectionnée, puis une incubation dans un bain Marie à 50°C pendant 10 min a été réalisée. Les réactions ont été ensuite arrêtées par l'addition de 2 ml de l'acide trichloracétique 0.4M (TCA) (Annexe III), puis le mélange a été plongé dans un bain de glace pendant 5 min suivi d'une centrifugation à 5000 g pendant 20 min.

Les témoins ont été préparé exactement de la même manière, à l'exception de l'ajout du surnageant après avoir incubé dans le bain marie.

L'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 280 nm en utilisant un spectrophotomètre. L'activité kératinolytique est exprimée comme une unité enzymatique (U/ml) correspondant à l'augmentation de la  $DO_{280}$  avec le blanc, dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus.

L'activité est calculée selon la formule :  $U = (4 \times n \times A_{280}) / (0.01 \times 10)$

où :

-  n : Taux de dilution
-  4 : Volume réactionnel final (ml)
-  10 : temps d'incubation (min)

La souche ayant présentée l'activité kératinolytique la plus importante est sélectionnée pour la suite de notre étude.

## IV. Etude des caractères morphologiques de l'isolat sélectionné

### 1. Caractères macromorphologiques

Après avoir sélectionné la souche la plus performante une étude macroscopique a été réalisée dans le but de déterminer les caractères culturels de la souche sélectionnée qui consiste en l'appréciation de la couleur du mycélium aérien et du substrat ainsi que les pigments diffusibles produits sur les différents milieux de culture suggérés par « l'International *Streptomyces* Project » (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP7) (Annexe II).

Cette observation est réalisée à l'œil nu, après 7 jours d'incubation à 28 °C.

### 2. Caractères micro-morphologiques

Dans le but d'étudier l'agencement des spores de la souche sélectionnée, ainsi que la fragmentation des mycéliums aérien et du substrat, des observations ont été réalisées directement sur les boîtes de Pétri à l'aide d'un microscope optique aux grossissements (X10) et (X40) après 14 jours d'incubation à 28 °C sur le milieu ISP.

## V. Modélisation de l'activité kératinolytique de la souche sélectionnée

Un plan composite centré est réalisé afin de modéliser l'activité kératinolytique sur le milieu FBML. Les paramètres opératoires pris en considération sont respectivement : la quantité de farine de plumes, le nombre d'inoculum, la température d'incubation et le pH. Leurs valeurs sont résumées dans le tableau I ci-dessous.

**Tableau I :** Valeurs extrêmes des paramètres opératoires

Paramètres opératoires	Niv.minimal (-1)	Point au centre	Niv.maximal (+1)
<b>Z<sub>1</sub></b>	15	20	25
<b>Z<sub>2</sub></b>	2	3	4
<b>Z<sub>3</sub></b>	20	30	40
<b>Z<sub>4</sub></b>	6	7	8

**Note :** Z<sub>1</sub> : Farine de plume (g/l), Z<sub>2</sub> : taille de l'inoculum, Z<sub>3</sub> : Température (°C), Z<sub>4</sub> : pH.

Le modèle mathématique postulé est un modèle à 16 coefficients, il s'écrit sous la forme suivante :

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_{12} + b_{13}x_{13} + b_{14}x_{14} + b_{23}x_{23} + b_{24}x_{24} + b_{34}x_{34} + b_{123}x_{123} + b_{124}x_{124} + b_{134}x_{134} + b_{234}x_{234} + b_{1234}x_{1234}$$

$x_1, x_2, x_3$  et  $x_4$  sont des variables sans dimensions correspondant respectivement Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> et Z<sub>4</sub>.

Les valeurs des variables naturelles  $Z_j$  et  $x_j$  des différents paramètres opératoires sont regroupés dans le tableau II, que représente la matrice des expériences.

**Tableau II** : Matrice d'expériences pour 04 facteurs ( $k = 4$ ) et  $N_f = 2^k = 16$ .

N° D'essai	$Z_1$ (g/l)	$Z_2$	$Z_3$ (°C)	$Z_4$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$
1	-1	-1	-1	-1	15	2	20	6
2	+1	-1	-1	-1	25	2	20	6
3	-1	+1	-1	-1	15	4	20	6
4	+1	+1	-1	-1	25	4	20	6
5	-1	-1	+1	-1	15	2	20	8
6	+1	-1	+1	-1	25	2	20	8
7	-1	+1	+1	-1	15	4	20	8
8	+1	+1	+1	-1	25	4	20	8
9	-1	-1	-1	+1	15	2	40	6
10	+1	-1	-1	+1	25	2	40	6
11	-1	+1	-1	+1	15	4	40	6
12	+1	+1	-1	+1	25	4	40	6
13	-1	-1	+1	+1	15	2	40	8
14	+1	-1	+1	+1	25	2	40	8
15	-1	+1	+1	+1	15	4	40	8
16	+1	+1	+1	+1	25	4	40	8
17	0	0	0	0	20	3	30	7

**Note** :  $Z_1$  : Farine de plume (g/l),  $Z_2$  : taille de l'inoculum,  $Z_3$  : Température (°C),  $Z_4$  : pH.

Les 17 expériences ont été réalisées suivant l'ordre et les conditions de chaque expérience dans 50 ml de leurs milieux FBML respectifs.

# Résultats et Discussion

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats et les discussions relatifs au criblage de dix souches d'actinobactéries, la mise en évidence de leurs activité protéolytique et kératinolytique, la sélection de la meilleure souche la plus performante ainsi que l'étude de ses caractères morphologique. L'élaboration du modèle mathématique décrivant les variations de l'activité kératinolytique en fonction des conditions opératoires par le biais d'un plan factoriel complet avec interactions a également été abordés.

## I. Criblage et sélection de souches productrices de kératinases

### 1. Repiquage des souches

Ce travail s'est intéressé à l'étude de dix isolats d'actinobactéries appartenant à la collection du LMA, isolés de différents écosystèmes (marins, telluriques et endophyte) dans le but de mettre en évidence leur capacité à produire des protéases de type kératinases.

Après incubation à 28 °C pendant 7 jours, les isolats ont été repiqués sur différents milieux de cultures dans le but d'obtenir des cultures jeunes et par ailleurs l'étude des caractéristiques culturales des dix souches a été réalisée et consignées dans le tableau III.

**Tableau III** : Caractères morphologiques des 10 souches étudiées sur les milieux Gausse, SCA, SCA 50% eau de mer.

Souches	Milieux	Aspect morphologique				
		Croissance	Couleur du M.A	Couleur du M.S	Aspect	Pigments diffusibles
TS1	SCA 50%	+	Gris	Marron	Craie	Rose clair
TS2	SCA 50%	+	Beige	Jaune clair	Craquelé	-
TS3	Gausse	++	Crème	Beige	Duveteux	-
TS4	SCA 50%	+++	Blanc gris	Beige	Duveteux	-
TS5	SCA 50%	++	Blanc	Marron clair	Craie	Rose clair
TS6	SCA	+++	Crème	Maron	Cotonneux	Marron
TS7	SCA 50%	++	Crème	Jaune clair	Craie	-
TS8	Gausse	++	Beige	Jaune	Craie	-
TS9	SCA 50%	++	Crème	Marron	Duveteux	Marron
TS10	Gausse	+	Gris	Gris foncé	Craie	-

**Note** : +++ : Très bonne croissance, ++ : Bonne croissance, + : Croissance moyenne, - : Absence de croissance.

Les dix souches présentent une bonne croissance sur les différents milieux de culture à savoir SCA, SCA 50% eau de mer et Gausse. En effet, ces milieux sont utilisés pour l'isolement des actinobactéries qui sont facilement reconnaissables grâce à leurs aspects morphologiques caractéristiques et du fait de leur composition riche en nutriments.

Une variation de la couleur du mycélium aérien (Beige, crème et gris) ainsi que celle du mycélium du substrat (Maron, beige et jaune) a été observée en fonction du milieu de culture considéré. Par ailleurs, les colonies sont de tailles différentes allant de 3 à 9 mm de diamètre. Toutefois, quatre isolats seulement ont produit des pigments diffusibles de couleur rose clair et marron.

## 2. Mise en évidence de la production de kératinases

Les dix isolats étudiés ont été ensemencés sur le milieu sélectif FBMs qui est composé principalement de farine de plumes qui joue le rôle aussi bien de source de carbone que d'azote, qui se révèle être très important pour la croissance des souches à activité kératinolytique, les boîtes sont ensuite incubées à 28 °C/ 7 jours.

A titre de comparaison de la croissance, les isolats ont également été ensemencé sur leurs milieux nutritifs respectifs (voir le tableau IV).

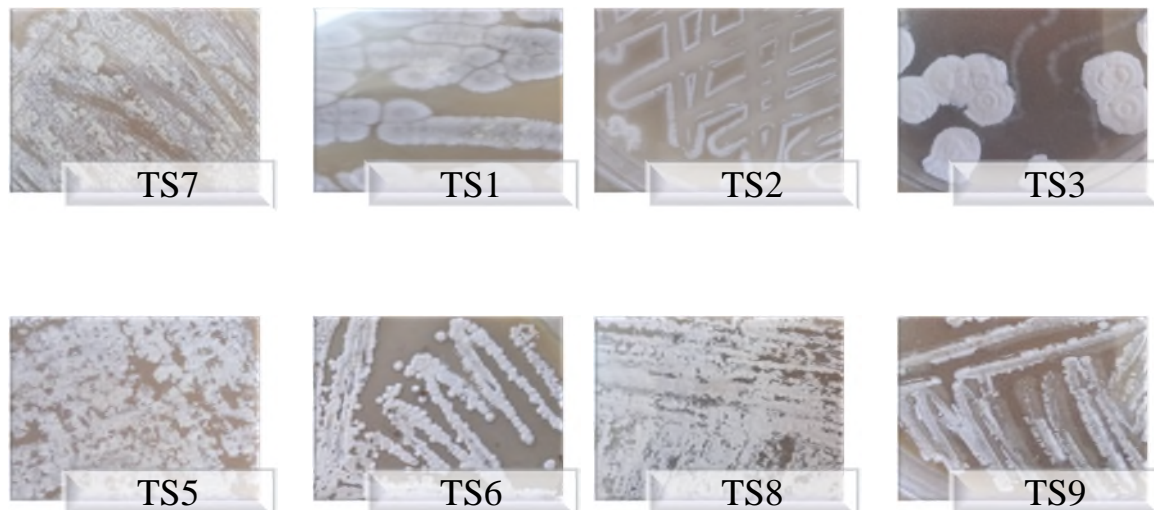
**Tableau IV :** Croissance des souches étudiées sur les milieux FBMs et les milieux nutritifs respectifs.

Souches	Croissance	
	FBMs	Milieux nutritifs
TS1	-	+
TS2	++	+
TS3	+++	++
TS4	+	+++
TS5	++	++
TS6	+++	+++
TS7	+++	++
TS8	+++	++
TS9	+++	++
TS10	-	+

**Note :** +++ : Très bonne croissance, ++ : Bonne croissance, + : Croissance moyenne, - : Absence de croissance.

D'après les résultats obtenus huit souches sur dix se sont développées sur le milieu FBMs. En effet, les souches TS3, TS6, TS7, TS8, TS9 ont présenté une très bonne croissance, avec un développement meilleur du mycélium aérien en comparaison avec les milieux nutritifs d'origine. Par ailleurs, la croissance des isolats TS2 et TS5 était plutôt bonne par rapport aux précédentes et plus ou moins similaire sur milieux nutritifs. Toutefois, la souche TS4 a présenté une croissance faible, tandis que aucun développement n'a été enregistré pour les isolats TS1 et TS10. Nous pouvons conclure que les 08 souches ont la possibilité d'utiliser la farine de plumes comme source de carbone et d'azote, et par conséquent elles peuvent être considérées comme productrices d'enzymes de type kératinases.

Quelques photographies illustrant la croissance et l'aspect morphologique des colonies des huit isolats étudiés sur milieu FBMs sont présentées dans la figure 7 ci-dessous.



**Figure 7 :** Photographies présentant la croissance et l'aspect morphologique des colonies des huit souches étudiées sur milieu FBMs.

### 3. Mise en évidence de l'activité protéolytique et sélection de souches kératinolytiques

Les isolats étudiés ont été ensemencés par touches sur le milieu GNL qui est composé essentiellement de lait qui représente une source importante de caséine.

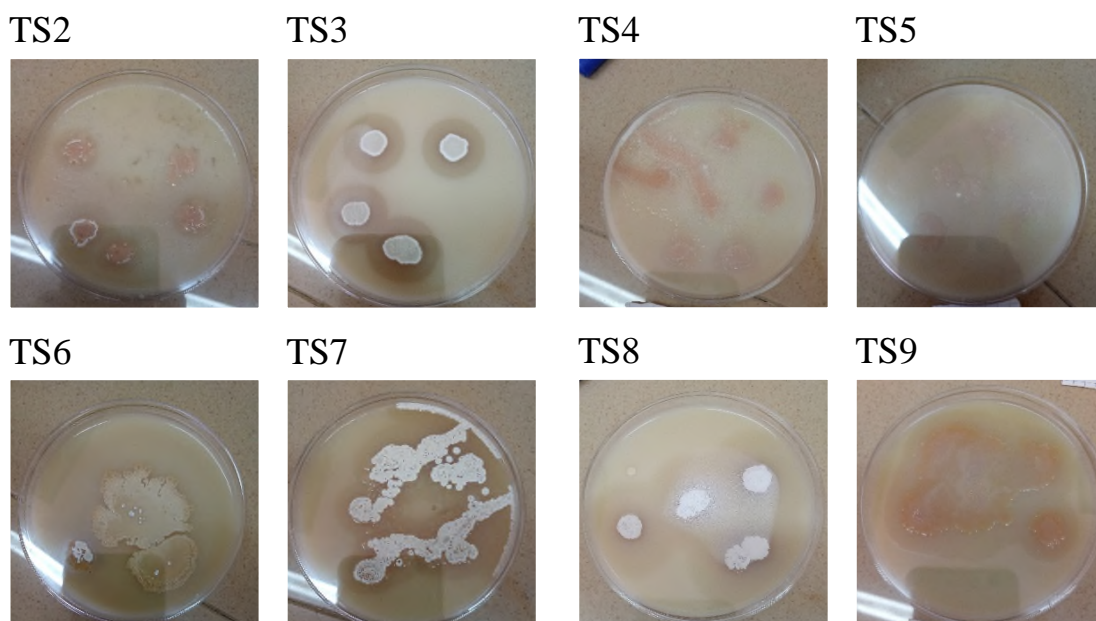
Les résultats obtenus après 7 jours d'incubation à 28 °C sont rapportés dans le tableau V ci-après.

**Tableau V:** Croissance des souches étudiées sur le milieu GNL.

Souches	Croissance
TS1	-
TS2	+
TS3	+++
TS4	+
TS5	+
TS6	++
TS7	+++
TS8	+++
TS9	++
TS10	-

**Note :** +++ : Très bonne croissance, ++ : Bonne croissance, + : Croissance moyenne, - : Absence de croissance.

D'après les résultats obtenus, huit souches sur dix se sont développées sur le milieu GNL où une très bonne croissance a été enregistrée pour 3 isolats TS3, TS7 et TS8, preuve de la dégradation de la gélatine du lait. Une bonne croissance a été observée pour les deux isolats TS6 et TS9, due à la dégradation de la caséine du lait formant des halos clairs autour des colonies. Par ailleurs, un faible développement a été enregistré pour les souches TS2, TS4 et TS5 sur ce milieu, comme le montre la figure 8 ci-dessous.



**Figure 8 :** Mise en évidence de l'activité protéolytique des 8 isolats d'actinobactéries suite à la formation d'halos clairs autour des spots.

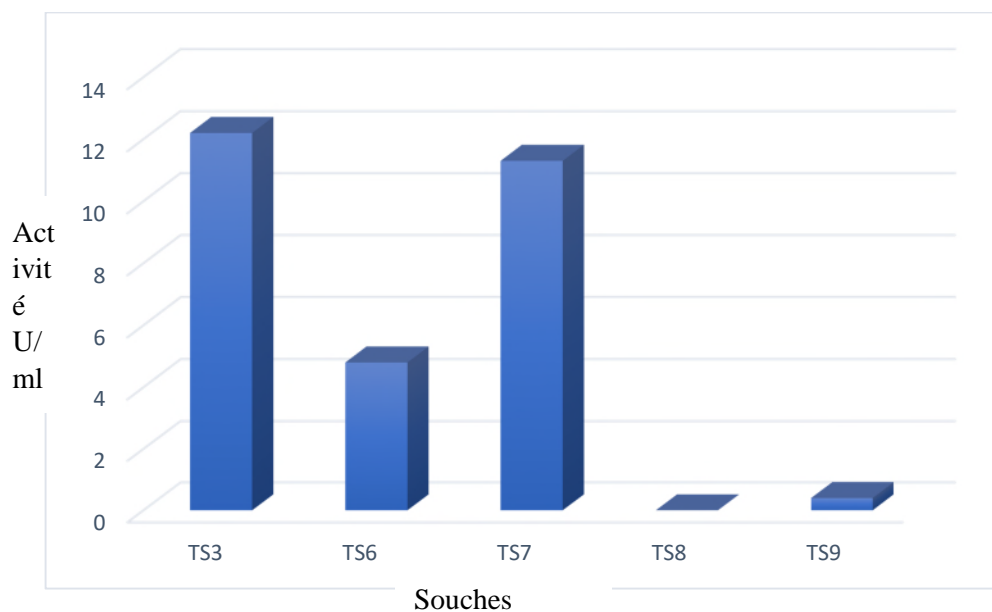


Suite à ces résultats, 5 souches ont été sélectionnées pour la suite de notre étude qui sont : TS3, TS6, TS7, TS8 et TS9.

## II. Evaluation de l'activité kératinolytique

### 1. Mise en évidence de l'activité

L'activité kératinolytique est définie comme étant l'augmentation de la densité optique (DO) en comparaison avec le blanc. Pour ce fait, des cultures liquides ont été préparées par ensemencement avec un inoculum adapté sur milieu FBML. Les résultats de l'activité kératinolytique des filtrats de cultures des 5 souches sélectionnées sont présentées dans la figure 9 ci-dessous.



**Figure 9** : Evaluation de l'activité kératinolytique des filtrats des cultures des isolats étudiés sur le milieu FBML.

Il est clairement remarqué que l'activité kératinolytique la plus importante est rapportée pour le filtrat de la souche TS3 enregistrant une valeur de 12.2 U/ml, suivie par les filtrats TS7 et TS6 affichant des valeurs de 11.3 U/ml et de 4.8 U/ml respectivement. Par ailleurs, des activités très faibles voir même nulle ont été obtenus pour les filtrats TS8 et TS9 enregistrant respectivement des valeurs de 0 U/ml et de 0.4 U/ml. Pour ce fait, la souche TS3 a été sélectionnée pour la suite de notre étude.

## III. Etude des caractères morphologiques de l'isolat TS3 sélectionné

### 1. Caractères macromorphologiques

Les critères culturels de l'isolat TS3 sélectionné ont été étudiés après ensemencement de la souche sur les différents milieux ISP. Les boîtes de Petri sont ensuite incubées pendant 7

jours à 28 °C. La croissance ainsi que la description des traits culturaux des colonies sont observées et notées. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VI ci-après.

**Tableau VI :** Caractéristiques macromorphologiques de la souche TS3 après 7 jours d'incubation à 28°C sur différents milieux ISP.

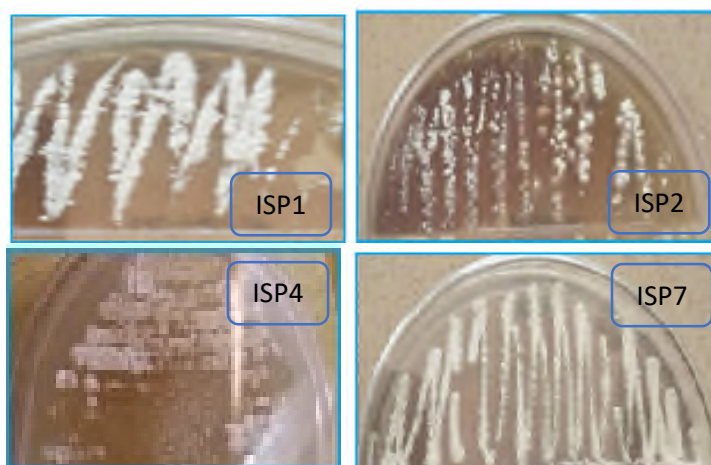
Milieu	Croissance	Couleur du Myc. Aérien	Couleur du Myc.Substrat	Aspect	Pigments diffusibles
ISP1	++	Blanc	Beige	Duveteux	-
ISP2	+	Crème	Beige	Craquelé	-
ISP3	-	-	-	-	-
ISP4	++	Beige	Beige	Cotonneux	-
ISP7	++	Crème	Beige	Duveteux	-

**Note :** +++ : Très bonne croissance, ++ : Bonne croissance, + : Croissance moyenne, - : Absence de croissance

Au bout du 7<sup>ème</sup> jour d'incubation la souche a présenté, une bonne croissance sur tous les milieux ISP à l'exception du milieu ISP3 où aucun développement n'a été observé. La couleur des mycéliums aérien et du substrat diffère selon le milieu de culture utilisé. En effet, le mycélium aérien présente une couleur blanche sur ISP1, crème sur ISP2 et ISP7 ou beige sur ISP4. Le mycélium du substrat, ne présente quant à lui qu'une seule couleur sur les différents milieux.

La production de spores est abondante, les colonies, par ailleurs, présentent un aspect duveteux, craquelé ou cotonneux. Cependant la production de pigments diffusibles n'a pas été observée sur les cinq milieux utilisés.

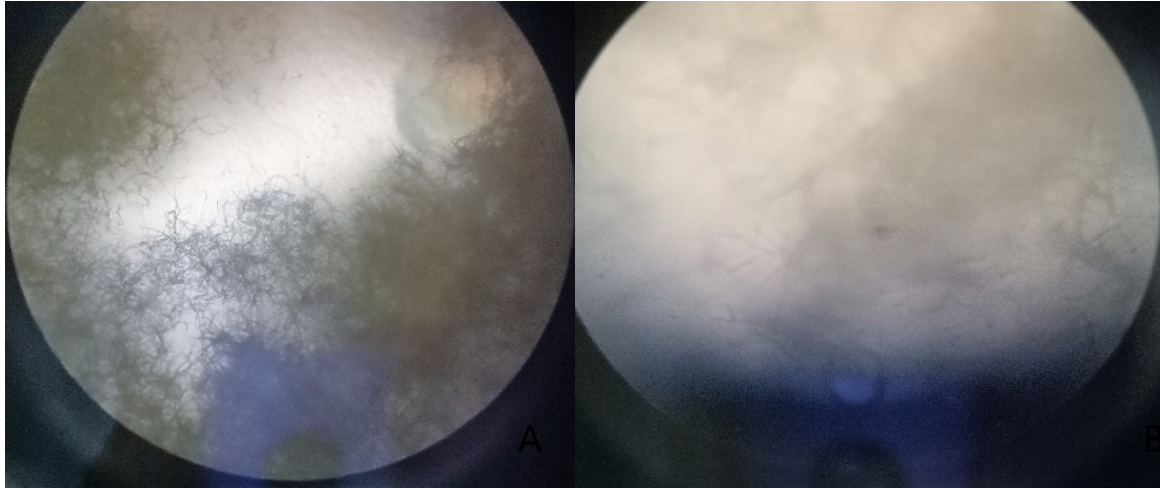
L'aspect morphologique de l'isolat TS3 sélectionné, sur les différents milieux ISP est représenté dans la figure 10 ci-dessous.



**Figure 10 :** Aspect macromorphologique de la souche TS3 sur les milieux ISP après 7 jours d'incubation à 28 °C.

## 2. Caractères micro-morphologiques

L'observation des colonies sous microscope optique aux objectifs x10 (Figure 11A) et x40 (Figure 11B) effectuée directement sur boîte de Pétri après 14 jours d'incubation à 28°C sur milieu Gause a permis de mettre en évidence des colonies entourées de filaments longs, fins et enchevêtrés avec un mycélium de substrat non sporulé et fragmenté. Le mycélium aérien est constitué d'hyphes fins, ramifiés qui se terminent par des chaînes de spores immobiles de forme spiralées qui se fragmentent en spores sphériques.



**Figure 11 :** Observation au microscope optique des mycéliums aériens et du substrat de la souche à l'objectif x10 (A) et à l'objectif x40 (B).

L'importance de l'utilisation de plusieurs milieux de culture dans l'étude de la morphologie est d'une grande importance car l'observation des chaînes de spores ne s'effectue que sur les milieux donnant une bonne croissance (maturation des spores) (Shirling et Gottlieb, 1966).

D'après les caractéristiques macro et micro morphologiques ainsi que toutes les spécificités culturelles observées pour la souche TS3, il nous a été possible de la rattacher au genre *Streptomyces*, tels qu'il est rapporté par Goodfellow et al. (2012).

En effet, les Actinobactéries appartenant à ce genre présentent des caractéristiques typiques à celles citées plus haut. Lechevalier et Lechevalier(1967) ont montré que la fréquence de *Streptomyces* dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents est de 95,34%. Par ailleurs, Selon Shirling et Gottlieb(1976), l'identification des actinobactéries repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables.

#### IV. Modélisation de l'activité kératinolytique de la souche sélectionnée par un plan factoriel complet à deux niveaux avec interactions

L'activité kératinolytique de la souche étudiée a été évaluée par la mesure de l'absorbance sur le milieu FBML, après 7 jours d'incubation dans un shaker sur les 17 différents milieux dont la concentration de la poudre de plumes, l'inoculum, la température et le pH différent.

Les valeurs des variables naturelles  $Z_j$  codées par  $X_j$  des différents paramètres opératoires ainsi que l'activité obtenue pour chaque essai sont regroupés dans le tableau VII représentant la matrice des expériences.

.Le nombre N de combinaisons possibles des quatre facteurs (k) sur deux niveaux est égal à  $2^k = 16$ .

**Tableau VII** : Matrice des expériences pour K= 4, N = 16.

N° D'essai	X <sub>1</sub> (g/l)	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub> (°C)	X <sub>4</sub>	Z <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	Z <sub>3</sub>	Z <sub>4</sub>	y (U/ml)
1	-1	-1	-1	-1	15	2	20	6	11
2	+1	-1	-1	-1	25	2	20	6	13.86
3	-1	+1	-1	-1	15	4	20	6	12.18
4	+1	+1	-1	-1	25	4	20	6	0
5	-1	-1	+1	-1	15	2	20	8	7.65
6	+1	-1	+1	-1	25	2	20	8	8.25
7	-1	+1	+1	-1	15	4	20	8	12.92
8	+1	+1	+1	-1	25	4	20	8	10.46
9	-1	-1	-1	+1	15	2	40	6	10.1
10	+1	-1	-1	+1	25	2	40	6	7.41
11	-1	+1	-1	+1	15	4	40	6	9.62
12	+1	+1	-1	+1	25	4	40	6	8.94
13	-1	-1	+1	+1	15	2	40	8	10.24
14	+1	-1	+1	+1	25	2	40	8	11.68
15	-1	+1	+1	+1	15	4	40	8	9.67
16	+1	+1	+1	+1	25	4	40	8	10.47

**Note** : X<sub>1</sub>: poudre de plumes, X<sub>2</sub>: Inoculum, X<sub>3</sub>: T°C et X<sub>4</sub>: pH . y est la réponse étudiée.

L'activité kératinolytique a été obtenue sur tous les milieux de culture avec une variation allant de 7.41 U/ml à 13.86 U/ml, excepté l'essai n° 4 où l'activité enregistrée a été égale à 0 U/ml.

La moyenne des activités kératinolytiques des 16 milieux est  $\bar{y} = 9.65$  U/ml.

Le nombre ( $n_0$ ) d'expériences au centre du domaine expérimental (Poudre de plumes = 20 g/l, Inoculum = 3, Température = 30°C, pH = 7) est de 3, leurs activités  $y_0$  respectives sont rassemblées dans le tableau VII.

**Tableau VIII** : Valeurs de l'activité kératinolytique au centre du domaine d'étude.

$n_0$	1	2	3
$Y_0$	13.2	12.9	13.5

La moyenne des activités au centre du domaine est  $\bar{y}_0 = 13.2$  U/ml.

### 1. Calcul des coefficients du modèle

Les coefficients  $b_j$  de l'équation de régression sont obtenus par le produit scalaire de la colonne  $y$  par les colonnes  $X_j$  correspondantes qu'on divise par le nombre d'essais  $N$ . Les valeurs de ces coefficients sont regroupées dans le tableau IX.

**Tableau IX** : Valeurs des coefficients du modèle de régression.

Terme constant	Effets linéaires			
	$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_4$
$b_0$				
9.653	-0.769	-0.370	0.514	0.113

Effets d'interactions										
$b_{12}$	$b_{13}$	$b_{14}$	$b_{23}$	$b_{24}$	$b_{34}$	$b_{123}$	$b_{124}$	$b_{134}$	$b_{234}$	$b_{1234}$
-1.045	0.816	0.628	1.083	0.279	0.234	0.583	1.216	-0.115	-1.436	-0.914

### 2. Analyse statistique de l'équation de régression

Après avoir trouvé les coefficients du modèle, on procède à l'analyse statistique des résultats de la validation de ce dernier.

$$\hat{y} = 9.65 - 0.76x_1 - 0.37x_2 + 0.51x_3 + 0.11x_4 - 1.044x_{12} + 0.81x_{13} + 0.62x_{14} + 1.08x_{23} + 0.27x_{24} + 0.23x_{34} + 0.58x_{123} + 1.21x_{124} - 0.11x_{134} - 1.43x_{234} - 0.91x_{1234}$$

## 2.1. Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

L'intérêt de ce test est de déterminer si parmi les coefficients du modèle, il existe des coefficients non significatifs, lesquels seront éliminés de l'équation de régression car leur influence sur l'activité kératinolytique est négligeable (Goupy, 2001). La procédure de calcul consiste à déterminer :

- **La variance de reproductibilité**

Elle est estimée par celle calculée au centre du domaine expérimental et qui est donnée par la relation suivante :

$$S_{rep}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_0} (y_i - \bar{y}_0)^2}{n_0 - 1}$$

$y_i$  : Valeur de l'activité de l'essai  $i$  au centre du domaine.

$\bar{y}_0$  : Moyenne des 3 essais au centre du domaine ;  $\bar{y}_0 = 13.2$  U/ml

On aura :  $S_{rep}^2 = 0.09$

- **Le rapport  $t_j$**

Pour identifier les coefficients non significatifs par le test de Student, on détermine les

valeurs  $t_j$  pour chaque coefficient ;  $t_j = \frac{|b_j|}{S_{bj}}$

Avec :  $S_{bj}$  l'écart quadratique moyen défini par  $S_{bj} = \frac{S_{rep}}{\sqrt{N}} = 0.075$

Les résultats des calculs effectués, sont rassemblés dans le tableau X.

**Tableau X** : Valeurs de  $t_j$  calculés

Terme constant	Effets linéaires			
	$t_0$	$t_2$	$t_3$	$t_4$
128.708	10.258	4.941	6.858	1.508

Effets d'interactions										
$t_{12}$	$t_{13}$	$t_{14}$	$t_{23}$	$t_{24}$	$t_{34}$	$t_{123}$	$t_{124}$	$t_{134}$	$t_{234}$	$t_{1234}$
13.941	10.891	8.375	14.441	3.725	3.125	7.775	16.225	1.541	19.158	12.191

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe VI), on lit la valeur  $t_{\alpha}(f)$  pour un degré de liberté  $f = n_0 - 1 = 2$  et pour un niveau de signification  $\alpha = 5\%$  est égale à 4.3. D'après les résultats du tableau X, on remarque que les valeurs de  $t_4$  (1.508),  $t_{24}$  (3.725),  $t_{34}$  (3.125) et  $t_{134}$  (1.541) sont inférieures à la valeur tabulée (4.30), alors les coefficients

correspondants ( $b_4$ ,  $b_{24}$ ,  $b_{34}$  et  $b_{134}$ ) ne sont pas significatifs et ils seront donc éliminés de l'équation de régression.

## 2.2. Test de validation de l'équation de régression

- **Recherche du biais**

Avant d'accepter le modèle postulé, nous devons vérifier l'absence du biais. Pour cela, on calcule la variance résiduelle qui sera comparée à la variance de reproductibilité par le test de Fisher qui permet de conclure (ou non) à l'égalité de ces deux variances.

$$F = \frac{S_{rés}^2}{S_{rep}^2}$$

La variance résiduelle est donnée par la relation :  $S_{rés}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - \ell}$

$\hat{y}_i$  : Valeur prédite de l'activité kératinolytique pour chaque milieu

Pour  $N = 16$ ,  $\ell = 12$  ( $\ell$  est le nombre de coefficients significatifs), ce qui donne :  $F = 7.073$  et  $S_{rés}^2 = 0.636$

En utilisant la table de Fisher (Annexe VII), on a la valeur tabulée du test de Fisher pour  $f_1 = 4$  et  $f_2 = 2$  égale à 19.2 ; comme cette valeur est supérieure à celle calculée (7.073), alors le modèle est sans biais. Ce qui signifie que tous les paramètres influençant la réponse sont pris en considération par le modèle.

- **Test de signification de la régression**

Le modèle étant sans biais, nous pouvons donc effectuer le test de Fisher pour la signification de la régression par la relation suivante :  $F = \frac{S_{reg}^2}{S_{rés}^2} = 20.66$

Où :  $S_{reg}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\ell - 1} = 13.154$  et  $\bar{y} = \frac{(\sum_{i=1}^N y_i)}{N} = 9.653$

La valeur tabulée du test Fisher pour  $f_1 = 11$  et  $f_2 = 4$  est égale à 5.91 et comme  $F_{cal} > F_{tab}$  alors le modèle est valide à 95%.

L'équation du modèle s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 9.65 - 0.76x_1 - 0.37x_2 + 0.51x_3 - 1.04x_{12} + 0.81x_{13} + 0.62x_{14} + 1.08x_{23} + 0.58x_{123} + 1.21x_{124} - 1.43x_{234} - 0.91x_{1234}$$

## 2.3. Calcul du coefficient de corrélation

Appelé aussi coefficient de détermination, il est donné par l'équation suivante :

$$R^2 = \frac{\text{Variation due à la régression}}{\text{Variation totale}} \quad ; \quad R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}$$

Lorsque l'échantillon n'est pas valide par le point au centre, il est nécessaire d'apporter une correction pour l'erreur systématique. L'estimation de la force de la liaison par le coefficient de corrélation multiple est d'autant plus exagérée que le nombre de degrés de liberté de l'échantillon  $f = N - \ell$  est plus petit. La formule de correction est :

$$\bar{R}^2 = R^2 - \frac{(1 - R^2)(\ell - 1)}{N - \ell}$$

Où  $\bar{R}^2$  est la valeur corrigée du coefficient de régression multiple. La valeur du coefficient de détermination  $R^2$  égale à 0.99.

La valeur corrigée du coefficient de régression multiple  $\bar{R}^2$  égale à 0.98.

Les valeurs obtenues nous permettent de conclure que le modèle choisi est adéquat.

## V. Optimisation

Après l'obtention d'un modèle du premier degré par le plan factoriel complet à deux niveaux avec interactions traduisant de manière fiable l'effet de variation des différents paramètres opératoires (quantité de poudre de plumes, taille de l'inoculum, température et pH) sur l'activité kératinolytique, on passe à l'étape de l'optimisation qui consiste à déterminer les valeurs de ces facteurs donnant une meilleure activité kératinolytique. En effet, c'est le tracé des courbes isoréponses ou des surfaces de réponses qui permettent de localiser la région du domaine d'étude où cet optimum apparaît, ainsi que toutes les conditions opératoires menant à ce dernier.

### 1. Recherche de l'optimum

Rappelons l'équation de régression donnant l'activité kératinolytique de ( $\hat{y}$ ) en fonction des différents facteurs opératoires étudiés.

$$\hat{y} = 9.65 - 0.76x_1 - 0.37x_2 + 0.51x_3 - 1.04x_{12} + 0.81x_{13} + 0.62x_{14} + 1.08x_{23} \\ + 0.58x_{123} + 1.21x_{124} - 1.43x_{234} - 0.91x_{1234}$$

A partir de cette équation, nous sommes en mesure de déterminer les valeurs optimales des paramètres opératoires conduisant à une activité kératinolytique maximale. Les surfaces de réponses et les courbes isoréponses sont tracées à l'aide du logiciel MATLAB 10 en traçant l'activité dans le plan  $X_2, X_3$  et en fixant  $X_1, X_4$  à différents niveaux.



- Pour :  $x_1 = 0, x_4 = 0$

$$\hat{y} = 9.65 - 0.37x_2 + 0.514x_3 + 1.083x_{23}$$

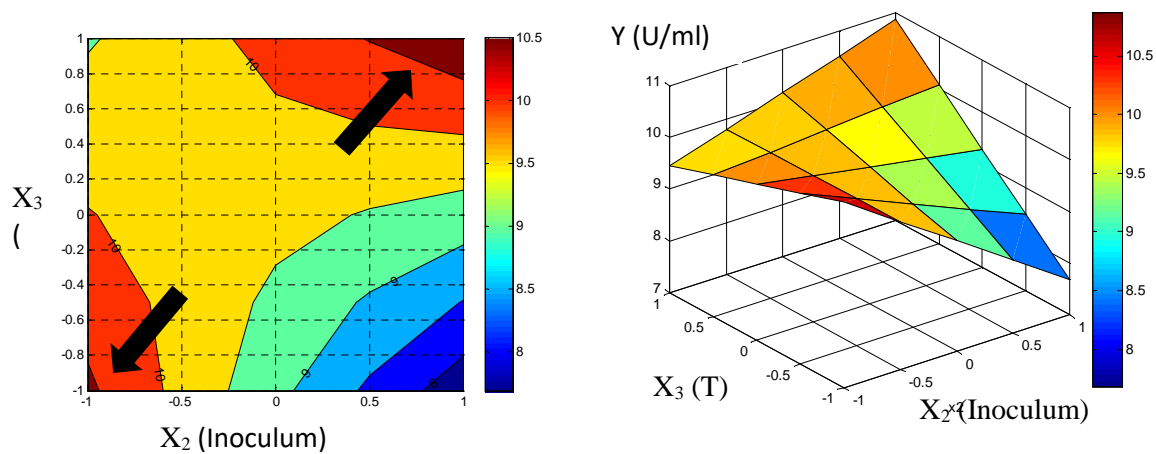


Figure 12 : Courbe isoréponses (a) et surface de réponse (b) pour  $X_1 = 0$  et  $X_4 = 0$ .

On note d’après la courbe d’isoréponses (a) qu’un optimum en activité kératinolytique de 10.5 U/ml se trouve dans deux régions du domaine expérimental (selon le sens des deux flèches sur cette courbe). D’une part, cette activité optimale peut être atteinte pour une température qui varie entre 38 °C et 30 °C et un nombre d’inoculum entre 3 et 3.5. D’une autre part, pour une température de 20 °C ( $X_3 = -1$ ) et l’inoculum de 2 ( $X_2 = -1$ ) qui représentent les conditions les plus favorables et plus économiques.

- Pour  $x_1 = -1, x_4 = -1$

$$\hat{y} = 11.047 + 1.891x_2 - 0.302x_3 + 0.729x_{23}$$

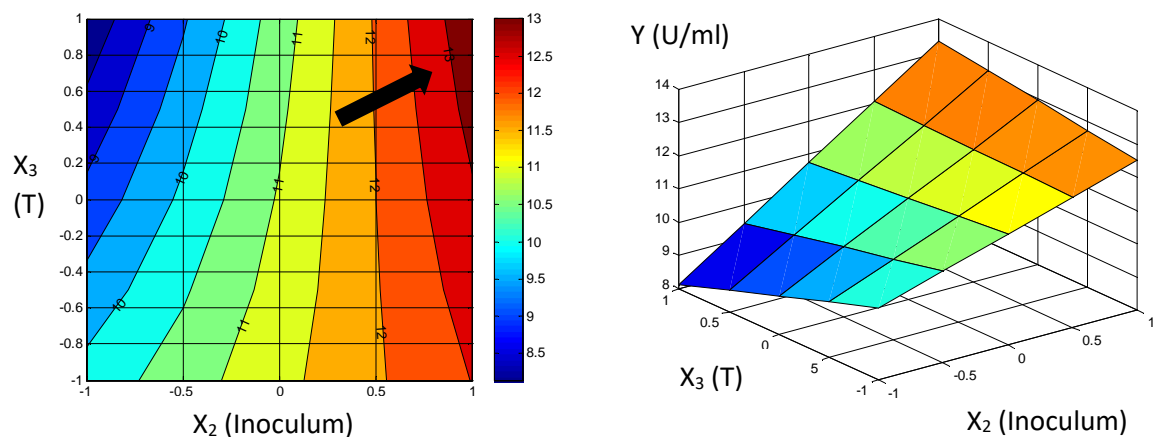


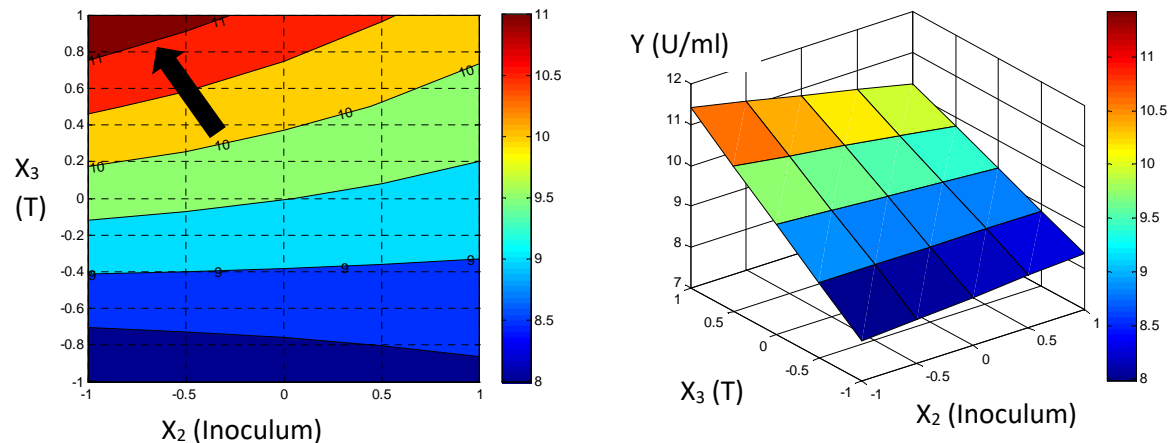
Figure 13 : Courbe isoréponses (a) et surface de réponse (b) pour  $X_1 = -1$  et  $X_4 = -1$ .

Il ressort de la courbe isoréponse (a) et en suivant le sens de la flèche que le maximum d’activité kératinolytique (13 U/ml) se trouve dans la région où la température et l’inoculum sont importants. Effectivement la surface de réponse (b) montre qu’une activité optimale de

13U/ml est enregistrée pour une température qui varie entre 32 °C et 40 °C et pour le nombre d'inoculum qui varie entre 3.8 et 4 cylindres d'inoculum.

- Pour  $x_1 = +1$ ,  $x_4 = +1$

$$\hat{y} = 9.509 - 0.199x_2 + 1.33x_3 - 0.391x_{23}$$



**Figure 14 :** Courbe isoréponses (a) et surface de réponse (b) pour  $X_1 = +1$ ,  $X_4 = +1$ .

L'analyse de la courbe isoréponses (a) montre que l'activité kératolytique augmente dans le sens de l'augmentation de la température et de la diminution de l'inoculum comme il est indiqué par la flèche sur cette courbe. La surface de réponse correspondante a (b) montre qu'une croissance de 11 U/ml peut être atteinte en utilisant entre 2 et 3.25 d'inoculum et une température entre 38 °C et 40 °C

D'après toutes les courbes tracées précédemment, on peut conclure que la meilleure activité est de 13.5 U/ml, et qui peut être obtenue pour les conditions suivantes des différents paramètres opératoires :

$X_1 = -1$  correspondant à une concentration de la farine de plume de 15 g/l

$X_2$  entre (0.8 et +1) correspondants aux nombres de cylindres entre 3.8 et 4 Inoculum.

$X_3$  entre (0.2 et +1) correspondants aux températures entre 32 °C et 40 °C

$X_4 = -1$  correspondant à un pH= 6

Pour transformer les variables centrées réduites ( $x_j$ ) aux variables naturelles on a appliqué la formule de passage ou de codage suivante :

$$x_j = \frac{z_j - z_j^0}{\Delta z_j}, j = 1, 2, \dots, k.$$

Tels que :

$$z_j^0 = \frac{z_{jmax} + z_{jmin}}{2}, \text{ et } \Delta z_j = \frac{z_{jmax} - z_{jmin}}{2}.$$

## Discussion

L'optimisation des conditions de culture des souches par la méthode classique d'un facteur à la fois s'avère longue, laborieuse et coûteuse en plus du fait qu'elle ne prend pas en considération les interactions combinées entre les différentes variables. Une étude statistique basée sur l'élaboration d'un modèle mathématique par le biais d'un plan composite centré avec interaction a été réalisée dans le but d'optimiser et d'améliorer l'activité kératinolytique de la souche TS3 étudiée.

Cette approche nous a permis de concevoir un milieu de culture avec des paramètres opératoires différents du milieu de base et ainsi optimiser la production des kératinases, on note que la température ( $X_3$ ) a un effet positif sur l'activité kératinolytique ( $b_0 = + 0.51$ ). Le signe positif de cette dernière montre que son accroissement entre sa valeur minimale 20 °C et sa valeur maximale 40 °C améliore la production des enzymes de type kératinases. Quant à l'inoculum ( $X_2$ ), la température ( $X_3$ ), la concentration en farine de plume et le pH, leurs effets sont négatifs sur la production. Ce qui veut dire que leur augmentation entre leurs niveaux minimales (-1) et maximale (+1) défavorisent d'activité kératinolytique. D'après les surfaces de réponse et les courbes isoréponses tracées, une activité de 13.5 U/ml est atteinte pour une température qui varie entre 32 °C et 40 °C et un inoculum entre 3.8 et 4, et ce en fixant le pH à 6 (-1) et la poudre de plumes à 15 g/l (niveau -1).

Des résultats similaires sont obtenus par Geu-Tae Park et al, (2009) où ils ont enregistré une activité kératinolytique optimale des cultures de *B.megaterium*F7-1 à 25 °C et 35°C ainsi qu'un pH maximal à 6.5-11.0. Cependant, *Amycolatopsis sp* et *Streptomyces albus* ont présenté une meilleure production de kératinase à une température de 40 °C et un pH de 7 (Geun-Tae Park et Hong-Joo Son; 2009).

Les kératinases sont généralement actives et stables sur une large gamme de pH a été observée dans le cas de *Streptomyces pactum* DSM 40530 (Bockle et al, 1995). La plus élevée de 13 chez *B.halodurans*AH-101. Par ailleurs, la plupart des kératinases microbiennes sont des protéases alcalines ou neutre présentant un pH optimal de 7.5 à 9, cependant, quelques kératinases possèdent un pH optimal alcalophiles extrême qui est supérieur à 12 (Selvam et vishnupirya, 2012). Pour le paramètre température, sa valeur optimale varie entre 30 °C et 80 °C, en revanche, on peut trouver l'enzyme de *Chrysosporiumkeratinophilum* et celui de *Fervidobacteriumislandicum*AW ont montré des niveaux exceptionnellement élevés qui atteignent 90 et 100 °C respectivement.

Suite à la modélisation et à l'optimisation de l'activité kératinolytique pour la souche TS3, il a été possible d'atteindre une activité de 13 U/ml et cela en réduisant la quantité de poudre de plumes au niveau (-1) qui correspond à 15 g/l. Ce résultat est en accord avec l'étude menée par Debananda S Ningthoujam et al, (2016) qui ont démontré que l'augmentation de la quantité de poudre de plumes dans le milieu de culture a une influence négative sur la production d'enzyme.

Par ailleurs, des études récentes ont montré qu'on peut détecter une activité kératolytique sur divers substrats tels que les cheveux humains et la laine d'agneau mais qui reste inférieur à celle rapportée en utilisant les plumes de volailles (Wojciech Laba et al, 2015). Toutefois, des recherches ont montré que l'addition de la farine de maïs comme source de carbone et la farine de soja comme source d'azote à la farine de plume sa augmenté la production de kératinases de nombreuses souches telles que *Amycolatopsis sp* et *Bacillus subtilis* (Debananda S Ningthoujam et al, 2016).

# Conclusion

Cette étude a été entreprise dans le but de mettre en évidence le potentiel kératinolytique de dix souches d'actinobactéries d'origines telluriques et marines, d'une part ; la modélisation et l'optimisation de la production de ces enzymes en utilisant la méthode des plans d'expériences, d'autre part.

Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à l'aspect valorisation d'un sous-produit encombrant, source riche en kératine : les plumes de volailles. Ces dernières, après les avoir réduites en poudre ont été utilisées comme constituant principal d'un milieu de base pour la croissance des actinobactéries.

Suite au criblage préliminaire réalisé sur les dix souches d'actinobactéries, huit isolats ont été sélectionnés après avoir démontré leurs capacités à croître en présence d'une source de kératine, preuve de leurs capacités à produire des enzymes kératinolytiques. Un second criblage a été réalisé et a permis de retenir la souche la plus performante TS3 ayant enregistré une activité kératinolytique de 12.2 U/ml pour la suite de cette étude. L'étude morphologique de cette dernière a permis de la rattacher au genre *Streptomyces* où le nom de *Streptomyces* sp. lui a été attribué.

La modélisation de la production d'enzymes à activité kératinolytiques du filtrat de culture de l'isolat TS3 a été réalisée sur milieu liquide en sélectionnant quatre facteurs (poudre de plumes, taille de l'inoculum, température et pH) en vue de déterminer les paramètres les plus influents sur la réponse, et leurs interactions ainsi que leur optimisation pour une production optimale. Pour ce faire, un plan complet avec interaction a été appliqué.

L'analyse statistique a permis de modéliser la production d'enzymes kératinolytiques par la souche TS3 par le biais d'un plan factoriel complet qui a montré que les facteurs influençant cette production sont la température et la taille de l'inoculum.

Les courbes d'isoréponses et les surfaces de réponses ont délimitées les valeurs optimales des paramètres opératoires qui sont les suivantes : farine de plume : 15 g/l, taille de l'inoculum : 4 cylindres d'agar, température : de 32 à 40 °C et le pH : 6.

Le model linéaire du premier degré obtenu a permis de déterminer les valeurs optimales des différents facteurs opératoires et prédit une activité kératinolytique de 13 U/ml qui est supérieure à celle obtenue avant optimisation 12.2 U/ml.

Ainsi, la souche étudiée TS3 peut être considérée comme une souche à potentiel kératinolytique intéressant et l'étude mérite d'être continué et complété afin d'améliorer la production de kératinases et ainsi atteindre un rendement plus important, notamment en

s'intéressant à la valorisation des plumes de volailles, d'une part, et en prenant en considération d'autres paramètres cultureux tels que l'addition d'autres composés dans le milieu de culture, d'autres part.

# Références bibliographiques



## Les references

### A

- Abbas IH. (2006). A Biological and Biochemical Studies of Actinomycetes Isolated from Kuwait Saline Soil-Kuwait. J. Appl. Scien. Resea, 2, 809-815.
- Alauzet C. (2009). Taxonomie des bactéries anaérobies : de la reclassification a la découverte de nouveaux pathogènes. Thèse doc. Université Nancy, 348p.
- Andersen L. (1998). Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes. United States Patent, 5: 834-299.

### B

- Bastide A., De Méo M., Andriantsao M., Laget M., Duménil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non- polyénique. MIRCEN Journal, 453-466.
- Berdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. Journal of Antibiotics. 1-26.
- Berrada S. (2007). Les Principaux Produits Capillaires, Novembre 2007. <http://disciplines.ac-montpellier.fr>. (Consulté le 23.05.2017).
- Bocle B., Galunsky B., Muller R. (1995). Appl Environ Microbiol. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530, 61, 3705-3710.
- Brandelli A., Daroit DJ., Riffel A. (2009). Appl Biotechnol. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications, 85, 1735-1750.
- Brutt, E., Ichida, J. (1999). Keratinase produced by *Bacillus +licheni-formis*. US Patent. 5, 877, 000.

### C

- Challis GL., Hopwood DA. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. The National Academy of Sciences of the USA, PNAS, 100, 14555–14561.
- Conn VM. (2005). Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University, 297p.

### D

- Danilenko VN., Mironov VA., Elizarov SM. (2005). Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 319–329.
- Deré A. (2007). Essais de reconstitution d'objets medievux en cuir. Disponible sur :<http://asteliermedieval-du-cuir.over-blog.com>. (consulté le 29/03/2017).
- Dgigal D. (2003). Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérivores: Effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse doc. Université Cheikh Anta Diop De Dakar, 157p.

### E

- Ensign JC., Normand p., Burden JP., Yallop CA. (1993). Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol*, 144, 657-660.

### F

- Fadil M., Farah A., Ihssane B., Haloui T., Rachiq S. (2014). Application de plan de Plackett Et Burman dans le criblage des paramètres agissants sur le processus d'hydrodistillation de Thym du Maroc (*Thymus vulgaris L.*). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 6, 530-540.
- Farag, AM., Hassan, MA. (2004). Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 85–93.

### G

- Geun-TaePark, Hong-JooSon. (2009). Keratinolytic activity of *Bacillus Megaterium F7-1*, a feather-degrading mesophilic bacterium. *Microbiological Research* 164, 478-485.
- Gilles P., Wezel van., et al. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by Actinomycetes, *FEMS Microbiology Reviews*, fux005, 41, 392–416.
- Goodfellow M., Kampfer P., Busse HJ., Trujillo ME., Ludwig W., Suzuki k., Withman WB. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria In : "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Parte A, vol 5, 34-2028.

- Goodfellow M., Williams ST. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annuals Review of Microbiology*, 189-216.
- Goupy J. (2001). *Introduction aux plans d'expériences*. 2<sup>ème</sup> Edition : DUNOD. Paris : 109p.
- Goupy J. (2005). *Pratiquer les plans d'expériences*. Edition : DUNOD. Paris : 501-295.
- Goupy J. (2006). *Les plans d'expériences*. *Revue Modulad*, 74-116.
- Goupy J., Creighton L. (2006). *Introduction aux plans d'expériences*. 3<sup>ème</sup> édition : DUNOD. Paris : 324p.
- Gradišar, H., Friedrich, J., Križaj, I., et Jerala, R. (2005). Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Applied and environmental microbiology*, 71, 3420–3426.
- Grund E., Kroppenstedt RM. (1990). Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiosis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 40, 5-11.
- Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59, 15-32.
- Gupta, R., Ramnani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied microbiology and biotechnology*, 70, 21-33.

## H

- Hwang BK., Lim SW., Kim BS., Lee JY., Moon SS. (2001). Isolation In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 3739-3745.

## I

- Ivantiskay LP., Singal SM., Bibikova MV., Vostrov SN. (1978). Direct isolation of *Micromonospora* on selective media with gentamicin. *Antibiotiki*, 23, 690-692.
- Kalakoutskii LV., Agre NS. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol, Rev*, 40, 469–524.

## K

- **Kecharom S., Mahachai R., Chanthai S. (2016).** The optimization study of  $\alpha$  amylase activity based on central composite design-response surface methodology by dinitrosalicylic acid method. *International Food Research Journal*, 23, 10-17.
- **Kitouni M. (2007).** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées, p 15-17.
- **Kuehl RO. (2000).** Design of experiments : statistical principles of research design and analysis. Edition : Duxbury Press. Pacific Grove : 666p.
- **Kuster E., Williams ST. (1964).** Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature*, 202, 928-929.

## L

- **Lamari L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
- **Larpent JJ. (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groupes bactériens, ed : Tec et Doc, 280p.
- **Larpent JP., Sanglier JJ. (1989).** Biotechnologies des antibiotiques. Masson. Paris : 481p.
- **Lechevalier AH. (1981).** Introduction to the order Actinomycetales, Springer-Verlag Edition Berlin : vol. 2, p. 1915-1922.
- **Lechevalier HA., Lechevalier MP. (1967).** Biology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 21, 71-100.
- **Lefebvre T. (2008).** Associations biologiques entre les termites du genre *Nasutitermes* et leur microflore actinomycétale: spécificité et évolution. Thèse doc : Ecole doctorale Science de la Vie et de la Santé. Paris : 168p
- **Levin L., Forchiassin F., Viale A. (2005).** Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii* : application of the Plackett Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochemistry*. 40, 1381-1387.
- **Lewis G., Mathieu D., Phan-Tan-Luu R. (1999).** Pharmaceutical Experimental Design. Edition : Marcel Dekker. New York, USA : 498p.
- **Loucif k. (2010).** Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives, 22p.

## M

- Macedo, AJ., da Silva, W O., Gava, R., Driemeier, D., Henriques, J A., Termignoni, C. (2005) . Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 594-596.
- Madigan MT et Martinko JM. (2007). *Biologie des microorganismes*. Pearson Education France, 11e. Edition : 331-423, 686-718.
- Mellouli L., Karray-Rebai I., Sioud S., Ben Ameer-Mehdi R., Naili., Bejar BS. (2004). Efficient Transformation Procedure of a Newly Isolated *Streptomyces* sp.TN58 Strain Producing Antibacterial Activities. *Current Microbiology*, 49, 400–406.

## N

- Ningthoujam DS., Devi LJ., Devi PJ., Kshetri P., Tamreihao K., et al. (2016). Optimization of Keratinase Production by *Amycolatopsis* sp. Strain MBRL 40 from a Limestone Habitat. *J Bioprocess Biotech*, vol. 6, n°5.

## O

- Omura S. (1992). *The search for bioactive compounds from microorganisms*. Springer, Verlag, New York.
- Ouhdouch Y. (2003). Aperçu bibliographique sur la taxonomie des actinomycètes. Premier atelier national du réseau NAFRINET-MAROC, p. 18-70.
- Ou X., Zhang B., Zhang L., Dong K., Liu C., Zhao G., Ding X. (2008). SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Acta. Biochim. Biophys Sin*, 40, 877-882.
- Otto HJ. (1998). *Écologie forestière*. Institut pour le développement forestier. Paris : 397p.

## P

- Perry JJ., Staley JT., Lory S. (2004). *Microbiologie*. Dunod. Paris : 497-498.
- Pizzul L. (2006). *Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes*. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède), 39p.
- Prescott LM., Harley JP., Klein DA. (2003). *Microbiologie*. De Boeck & Larcier. Bruxelles, 805 – 825.
- Prescott LM., Harley JP., Klein DA. (2007). *Microbiologie*. De Boeck & Larcier, Bruxelles, 805–825.

- Pridham T G., Hesseltine CV., Benedict RG. (1958). A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups placement of strain in morphological sections. *Applied Microbiology*, 52-70.

## R

- Rai SK., Mukherjee AK. (2010). Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical Engineering Journal*, 48 (2), 173–180.
- Rao MB., Tanksale AM., Ghatge MS., Deshpande VV. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62, 597–635.

## S

- Saha Subhasish. (2009). Exploration of Keratinolytic Actinobacteria for the Bioconversion of Poultry Feather Waste into Poultry Feed Supplement. These de doctorat en microbiologie. Inde : Bharathiadasan university. 142p.
- Saffroy S. (2006). Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Lorraine. France : 150 p.
- Selvam K., Vishnupriya B. (2012). International Journal of pharmaceutical & Biological Archives. Biochemical and Molecular Characterization of Microbial Keratinase and Its Remarkable Application, 3, 2, 267-275.
- Shirling EB., Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Sys. Bacteriol*, 16, 313-340.
- Shirling EB., Gottlieb D. (1976). Retrospective evaluation of International *Streptomyces* Project taxonomy criteria, In : *Actinomycetes the boundary microorganisms*, (Eds), Arai T, Tokyo : 9-42p.
- Shivakumar HN., Patel R., Desai BG. (1993). Formulation Optimization of Propranolol Hydrochloride Microcapsules Employing Central Composite Design. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70, 408-413.
- Singh SL., Baruah I., Bora TC. (2006). Actinomycetes of lake Loktat Habitat: Isolation and screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnology*, 5, 217-221.
- Stackebrandt E., Woese CR. (1981). The evolution of procaryotes. *Synopsia of the society for general microbiology*, 32, 1-31.

- Strub C. (2008). Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INP-ENSAT. France : 174p.

## T

- Tarkka M., Hampp R. (2008). Secondary Metabolites of Soil Streptomycetes in Biotic Interactions *in* Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology, P. Karlovsky (ed.), 14, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Theilleux J. (1993). Les actinomycètes *in* Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, vol.612, p. 425.

## V

- Van Raamsdok LWD., Vancustem J., Zegres J., Frick G., Jorgenson., pinckaers V., Bosch J., Paradies-severin I. Biotechnol. (2004). Agron. Soc. Environ. The microscopic detection of animal proteins in feeds, 8, 4, 241-247.
- Vignardeta C., Guillaume Y., Michel L., Friedrich J., Millet J. (2001). Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. International Journal of Pharmaceutics, 224, p. 115-122.
- Vijayakumar R., Muthukumar C., Thajuddin N., Panneerselvam A., and Saravanamuthu R. (2007). Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. Actinomycetologica, 21, 59-65.
- 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 SA. (1963). Ma vie avec les microbes. Albin. Michel (ed.), 280 p.
- Walsh C. (2003). Natural and produced immunity versus acquired resistance. In: antibiotics ; actions, origins, resistance. Ed. ASM press, Washington, p. 91-106.
- Wang Y., Zhang ZS., Ruan JS., Wang YM., Ali SM. (1999). Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23, p. 178-187.
- Williams ST., Wellington EMH., Page AL., Miller RH., Keency OR0. (1982). Actinomycetes. In: Eds: Methods of Soil Analysis, part 2, Chemical and

Microbiological Properties, second ed. American . Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, pp.

- Wojciech L., Anna C., Anna R., Michal P. (2015). Keratinolytic abilities of *Micrococcus luteus* from poultry waste. Department of Biotechnology and Food Microbiology, Wroclaw University of Environmental and Life Sciences, Wroclaw, Poland. Brazilian Journal of Microbiology, 46, 3, 691-700. 969–987.

#### X

- Xu LH., Li QR., Jiang CL. (1996). Diversity of soil actinomycetes in Yunnan. China Applied in Environmental and Microbiology, 244-248.

#### Y

- Yala D., Merad AS., Mohamed D., Ouar Korich MN. (2001). Classification et moded'action des antibiotiques. *Médecine de Maghreb*, N° 91.

#### Z

- Zaitlin B., Watson Sb., Ridal J., Satchwill T., Parkinson D. (2003). Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. Res. J. Can, 95, p. 113-118.
- Zmahoun C. (2005). Evaluation de la sensibilité aux antibiotique des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du centre national hospitalier universitaire- Hubert koutoukou Maga (C.N.H.U.H.K.M ) .Thèse de doctorat d'état ,Université du Mali, 91.
- Zermane F. (2007). Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse. p33-38.





# Annexes

## Annexe I

### Matériels utilisés

- ❖ Autoclave
- ❖ Balance analytique
- ❖ Barreaux magnétiques
- ❖ Bec bunsen
- ❖ Béchers
- ❖ Boîtes de pétri
- ❖ Bain marie
- ❖ Centrifugeuse
- ❖ Erlenmeyers
- ❖ Etuve
- ❖ Flacons
- ❖ Rotavapor
- ❖ Micropipette de 1000  $\mu$ l
- ❖ Microscope optique
- ❖ Pipettes pasteurs
- ❖ Plaque chauffante agitatrices
- ❖ Spatule
- ❖ Spectrophotomètre UV
- ❖ Tubes a essais et tubes à hémolyse
- ❖ pH-mètre

## Annexe II

- Composition des géloses nutritives en (g/l)

- ✚ Composition du milieu SCA (Amidon Caséine Agar)

❖ Amidon.....	10 g/l
❖ Caseine.....	0.3 g/l
❖ KNO <sub>3</sub> .....	2 g/l
❖ NaCl.....	2 g/l
❖ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2 g/l
❖ MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.05 g/l
❖ CaCO <sub>3</sub> .....	0.02 g/l
❖ FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.01 g/l
❖ Agar.....	18 g
❖ pH.....	7.2

- ✚ Composition du milieu Gausse

❖ Amidon.....	20 g/l
❖ KNO <sub>3</sub> .....	1 g/l
❖ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5 g/l
❖ MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.5 g/l
❖ FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.01 g/l
❖ Agar.....	20 g
❖ Eau distillée.....	1 L
❖ pH.....	7.2

- Milieu de culture à base de farine de plumes (FBM) (Williams et al., 1990)

- ✚ Milieu de culture FBM solide

❖ Farine de plume.....	20 g
❖ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
❖ MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.5 g
❖ CaCO <sub>3</sub> .....	3 g
❖ FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.1 g
❖ NaCl.....	0.5 g
❖ Agar.....	20 g
❖ Eau distillée.....	1 L
❖ pH.....	8

- ✚ Milieu en culture FBM liquide

❖	Farine de plume .....	20 g
❖	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
❖	MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O) .....	0.5 g
❖	CaCO <sub>3</sub> .....	3 g
❖	FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O) .....	0.1 g
❖	NaCl .....	0.5 g
❖	Eau distillée .....	1 L
❖	pH .....	8

- Gélose nutritive à base de lait

❖	Peptone .....	5 g
❖	Extrait de levure .....	3 g
❖	Agar .....	15 g
❖	Eau distillée .....	750 ml
❖	Lait écrémé .....	250 ml
❖	pH .....	7.2

- Milieux ISP1,ISP2,ISP3,ISP4,ISP7

- ✚ Le milieu ISP1

❖	Tryptone .....	5 g
❖	Extrait de levure .....	3 g
❖	Agar .....	15 g
❖	pH .....	7.5
❖	1 litre d'eau (500 mL d'eau distillée et 500 mL d'eau de mer)	

- ✚ Le milieu ISP2

❖	Glucose.....	4 g
❖	Extrait de levure.....	4 g
❖	Extrait de malt.....	10 g
❖	Agar.....	20 g
❖	pH.....	7,98±0,2
❖	1 litre d'eau (500 mL d'eau distillée et 500 mL d'eau de mer)	

- ✚ Le milieu ISP3

❖	Farine d'avoine.....	20 g
❖	Solution saline standard.....	1 mL
❖	Agar .....	20 g
❖	Eau distillée q.s.p. ....	1L.
❖	pH .....	7,2.

## ➤ Solution saline standard

❖	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0, 1 g
❖	MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O.....	0, 1 g
❖	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0, 1 g
❖	Eau distillée.....	1000 mL

## ✚ Le milieu ISP4

❖	Amidon.....	10 g
❖	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
❖	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	1 g
❖	NaCl.....	1 g
❖	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	2 g
❖	CaCO <sub>3</sub> .....	2 g
❖	Solution saline standard (voir ISP3 ).....	1 mL
❖	Agar.....	20 g
❖	pH.....	7,5
❖	1 litre d'eau (500 mL d'eau distillée et 500 mL d'eau de mer)	

## ✚ Le milieu ISP7 :

❖	Glycérol.....	15 g
❖	L-tyrosine.....	0, 5g
❖	L-asparagine.....	1 g
❖	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0, 5 g
❖	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0, 5 g
❖	NaCl.....	0, 5 g
❖	Agar.....	18 g
❖	FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0,01 g
❖	pH.....	7,5,
❖	Solution saline standard (voir ISP3).....	1 mL
❖	1 litre d'eau (500 mL d'eau distillée et 500 mL d'eau de mer)	

## Annexe III

### Solution et tampons préparés.

#### ✚ Solution hydroxyde de sodium NaOH à (0,05 M)

Pour la préparation de 300 ml d'hydroxyde de sodium qui présente une masse molaire de 40 g/mol, 0,6 g du NaOH sont dissouts dans 300 ml d'eau distillé suivi d'une agitation vigoureuse. Le pH est ajusté à 12.

#### ✚ Solution tampon tris HCl (0,05 M)

Trishydroxyméthylaminométhane (tris) présente une masse molaire de 121,14 g/mol a servi pour la préparation de 300 ml du tampon tris HCl à 0,05 M, par le mélange de 1,817 g du tris dans 300 ml d'eau distillé et ajusté avec l'acide chlorhydrique HCl jusqu'à l'obtention d'un pH 8.

#### ✚ Solution d'acide trichloracétique TCA (0,4 M)

L'acide trichloracétique (TCA) avec une mass molaire de 163,39 g/mol dont 26,142 sont dissouts dans 300 ml d'eau distillé et mélangés vigoureusement.

## Annexe IV

Table de Student (Goupy, 1999 et Ozil 1997)

Unilatéral Bilatéral	0.01 0.20	0.05 0.10	0.025 0.05	0.01 0.02	0.005 0.01
1	3,08	6,31	12,7	31,8	63,7
2	1,89	2,92	4,30	6,97	9,92
3	1,64	2,35	3,18	4,54	5,84
4	1,53	2,13	2,78	3,75	4,60
5	1,48	2,02	2,57	3,37	4,03
6	1,44	1,94	2,45	3,14	3,71
7	1,42	1,90	2,37	3,00	3,50
8	1,40	1,86	2,31	2,90	3,36
9	1,38	1,83	2,26	2,82	3,25
10	1,37	1,81	2,23	2,76	3,17
11	1,36	1,80	2,20	2,72	3,10
12	1,36	1,78	2,18	2,68	3,06
13	1,35	1,77	2,16	2,65	3,01
14	1,35	1,76	2,15	2,62	2,98
15	1,34	1,75	2,13	2,60	2,95
16	1,34	1,75	2,12	2,58	2,92
17	1,33	1,74	2,11	2,57	2,90
18	1,33	1,73	2,10	2,55	2,88
19	1,33	1,73	2,09	2,54	2,86
20	1,33	1,73	2,09	2,53	2,85
21	1,32	1,72	2,08	2,52	2,83
22	1,32	1,72	2,07	2,51	2,82
23	1,32	1,71	2,07	2,50	2,81
24	1,32	1,71	2,06	2,49	2,80
25	1,32	1,71	2,06	2,49	2,79
26	1,32	1,71	2,06	2,48	2,78
27	1,31	1,70	2,05	2,47	2,77
28	1,31	1,70	2,05	2,47	2,76
29	1,31	1,70	2,05	2,46	2,76
30	1,31	1,70	2,04	2,46	2,75
40	1,30	1,68	2,02	2,42	2,70
∞	1,28	1,65	1,96	2,33	2,58



Table de Fisher (Goupy, 1991 et Ozil, 1997)  
Valeurs des 95 nièmes centiles (niveaux 0.05)  
F0.95 pour la distribution F

$V_1$ → $V_1$ ↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	$\infty$
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	254
2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.4	19.5
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.7	8.66	8.64	8.62	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.0	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.37
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.8	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.7	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.9	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.2	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.25
$\infty$	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.0

$V_1$  degrés de liberté au numérateur

$V_2$  degrés de liberté au dénominateur

## Résumé

Le présent travail a pour principal objectif le criblage de souches d'actinobactéries productrices de kératinases, la modélisation et l'optimisation de leur production à travers la valorisation des plumes de volailles utilisées comme substrat.

L'étude s'est focalisée, d'une part, sur la mise en évidence de l'activité kératinolytique sur milieu solide à base de farine de plumes de dix souches d'actinobactéries, et son évaluation de cette dernière sur milieu liquide, d'autre part, ce qui a permis la sélection de l'isolat TS3 pour sa production (12.2 U/ml) intéressante. Par ailleurs, l'étude morphologique de la souche a permis de la rattacher au genre *Streptomyces*.

La modélisation de la production de kératinases par le biais d'un plan factoriel complet a été effectuée en sélectionnant quatre facteurs opératoires : la poudre de plumes, la taille de l'inoculum, le pH et la température, afin de déterminer les paramètres les plus influents ainsi que leurs interactions. Les résultats obtenus ont permis de déterminer les valeurs optimales de ces facteurs : en détails : poudre de plumes de 15 g/l, une taille de 4 de l'inoculum, une température comprise entre 32 °C et 40 °C et un pH : 6, atteignant une activité kératinolytique de 13 U/ml

**Mots clés :** Kératinases, Optimisation, Plan composé centré, Plumes de volailles, *Streptomyces* sp.

## Abstract

The main objective of the present study is the screening of keratinolytic enzymes production by actinobacterial strain, the design and the optimization of their production through the valorization of chicken feathers used as substrate.

The study focused, on the investigation of the keratinolytic activity on solid medium based on chicken feather of ten strains of actinobacteria, and the evaluation of this one on liquid medium, on the other hand, which allowed the selection of the TS3 isolate for its interesting production (12.2 U / ml). Furthermore, the morphological study of the strain allowed its attachment to *Streptomyces* genus.

Modeling keratinase production through a complete factorial design was performed by selecting four operative factors: chicken feather powder, inoculum size, pH, and temperature to investigate the most influential parameters and their interactions affecting the keratinolytic activity. The obtained results determined the optimal values of these factors: chicken feather powder of 15 g / l, inoculum size: 4 agar cylinders, temperature of between 32 ° C and 40 ° C and a pH of 6 reaching a keratinolytic activity of 13 U/ml.

**Key words:** Keratinases, Optimization, Centered compound plane, Poultry feathers, *Streptomyces* sp.