

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



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Optimisation statistique de la production de
kératinases sur milieu liquide à base de
farine de plume.**

Présenté par :

IDIR Oualid & BEN HOULA Mohammed

Soutenu le : 21 Juin 2018

Devant le jury composé de :

M^{elle}. DJINNI Ibtissem

M^{me}. Balla née BOUCHERBA Nawel

M^{me}. BOUDERIES née SOUAGUI Samiha

MCB Présidente

MCA Promotrice

MAA Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018



Dédicaces

Je remercie Dieu tout puissant d'avoir pu achever ce modeste travail que je dédie :

A mes chers parents, en témoignage de ma reconnaissance, pour leur compréhension et leurs soutiens, et plus particulièrement à ma mère, pour laquelle, ni ces quelques lignes, ni ces quelques mots ne seront suffisant pour définir la gratitude que je lui dois et l'immense reconnaissance que je porte envers elle, pour ses encouragements, ses conseils, je ne pourrai jamais la remercier assez.

Je le dédie aussi à mes chers frères, pour quels je Souhaite la réussite dans l'avenir.

A mon binôme bouhdid mouh , sans oublier mes amis qui m'ont aidé, que ce soit de près ou de loin (Melle afaf Idir, Idir sofiane , karja azouz , Melle badria , Mme Djinni Ibtissem ,Mme Souagui samiha,Doctorant Samir hama ,Doctorante Zhera , younes arouf , moumen ,malek , mourad ,sans oublier assirem abed lghani) est bien d'autres que j'estime, merci à eux, à leurs soutiens et leur compréhension.

Et à notre promotion 2017/2018 de Biotechnologie microbienne.



Oualid Idir.



Dédicace

Je remercie Dieu tout puissant d'avoir pu achever ce modeste travail que je dédie :

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mes frères et sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

A mon binôme walid, sans oublier mes amis qui m'ont aidé, que ce soit de près ou de loin (fakhro, hmana, abd elhafid, malek , abed lghani) et bien d'autres que j'estime, merci à eux, à leurs soutiens et leur compréhension.

Et à notre promotion 2017/2018 de Biotechnologie microbienne.

Mohammed

Remerciements

Au terme de la réalisation de ce mémoire nous tenons en premier lieu à exprimer nos profonds et sincères remerciements:

Au bon Dieu de nous avoir donné la force et le courage de mener à terme ce travail et d'aller au bout de nos objectifs.

Nous tenons à présenter toute notre gratitude :

A notre enseignante et présidente du jury M^{elle} **Djinni Ibtissem** de nous avoir fait l'honneur et un immense plaisir de présider le jury de notre soutenance.

A notre examinatrice M^{me} **Bouderies née Souagui Samiha** pour avoir accepté d'évaluer notre mémoire.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciement à : Notre promotrice M^{me} **Balla née Boucherba Nawel** qui a accepter la responsabilité de superviser ce travail, pour son aide, ses conseils, sa disponibilité, ces précieux encouragements, sa patience et sa confiance. Sans elle notre travail et nos efforts n'aurai jamais pu se concrétiser et surtout n'aurai jamais eu la place qu'il lui revenait de droit et n'aurait pas vu le jour.

On tient à exprimer notre grande considération et notre vive reconnaissance à notre Copromotrice M^{me} **Arkoub Warda** qui nous a permis de réaliser une partie de ce travail, pour son soutien, son aide, ses conseils et sa sympathie et surtout pour sa présence en ce jour important pour nous deux.

On tient aussi à remercier les techniciens et techniciennes des laboratoires que nous avons sollicités et qui ont répondu présents.

Merci également à tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici notre profonde reconnaissance.

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....01

Synthèse bibliographique

1. Considérations générales sur les kératines03

2. Coproduits kératiniques.....03

 2.1. Cas des plumes de volaille04

 2.1.1. Production mondiale de volaille04

 2.1.2. Production de volaille en Algérie.....05

3. coproduits de volaille06

 3.1. Valorisation des plumes de volaille06

 3.2. Structure et composition de la plume07

4. Kératinases.....09

 4.1. Sources microbiennes des kératinases.....09

 4.2. Genre *Bacillus* comme producteur de kératinases.....09

 4.3. Applications industrielles des kératinases.....10

5. Plans d'expériences.....11

 5.1. Définition et intérêt du plan d'expérience.....11

 5.2. Modèle mathématique postulé11

Matériel et Méthodes

1. Présentation du travail.....13

2. Matériel biologique13

 2.1. Préparation de la farine de plumes.....14

3. Repiquage et purification de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2.....15

4. Test d'activité protéolytique sur milieu solide (test qualitatif).....	15
5. Production de kératinases.....	15
5.1. Culture en milieu liquide.....	15
6. Mesure de l'activité kératinolytique.....	16
6.1 : Préparation de la solution enzymatique et du substrat analytique.....	16
6.2 : Test d'activité proprement dit.....	18
7. Optimisation de la production des kératinases par utilisation de plans d'expérience.....	18
7.1. Détermination des paramètres influençant la production de Kératinases...	18

Résultats et discussion

1. Préparation de la farine de plumes	21
2. Repiquage et purification de la souche <i>Bacillus atrophaeus</i> BN2.....	21
2.1. Observations macroscopique et microscopique.....	22
3. Test d'activité protéolytique sur milieu solide (test qualitatif).....	23
4. Culture sur milieu liquide.....	24
5. Optimisation de la production des kératinases par plan factoriel complet.....	25
5.1. Choix des paramètres influençant la production enzymatique.....	25
5.2.1. Calcul des coefficients du modèle.....	27
5.2.2. Analyse statistique de l'équation de régression.....	28
5.2.2.1. Vérification de la signification des coefficients par le test de Student..	28
5.2.2.2. Test de validation de l'équation de régression.....	29
5.2.2.3. Calcul du coefficient de corrélation.....	30
6. Etude des effets linéaires et d'interactions des différents paramètres.....	31
6.1. Effets linéaires.....	31
6.2. Effets des interactions.....	31

7. Optimisation.....	31
7.1. Recherche de l'optimum.....	32
Conclusion.....	39
Références bibliographiques	
Annexes	

N° du tableau	Titre des tableaux	page
I	Principaux producteurs de viande de volailles dans le monde (équivalent carcasse)	04
II	Nombre de têtes de poulets dans les différents pays du grand Maghreb, de 2001 à 2007, selon les données statistiques de la FAO, 2007	05
III	Procédés de valorisation matière et organique des plumes.	06
IV	Contenu en acides aminés des fibres kératiniques de plumes de volailles	08
V	Matrice d'expériences pour $k=4$ ($N=2^4$)	19
VI	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés	20
VII	Comparaison de l'activité kératinolytique de <i>Bacillus atrophaeus</i> BN2 par rapport aux espèces du genre <i>Bacillus</i> .	25
VIII	Paramètres opératoires et leurs valeurs à différents niveaux	26
IX	Matrice des expériences pour un nombre de facteur $k=4$ et un nombre d'expériences $N=16$.	27
X	Valeurs des coefficients du modèle de régression.	28
XI	Valeurs de t_j calculées.	29

N° de figure	titre	page
1	Schéma illustrant les différentes parties d'une plume.	07
2	Site de la ferme avicole « Amizour »	13
3	Site du « marché d'Amizour»	13
4	Site de « Bouandas »	14
5	Site de la tuerie «Tala oulili »	14
6	Image illustrant des Plumes blanches lavées et séchées.	14
7	Fermentation en erlen, milieu FBML inoculé avec <i>Bacillus atrophaeus</i> BN2 à 37°C pendant 48 h.	16
8	Surnageant récupéré après centrifugation.	16
9	Aspect fibreux de la Kératine azure.	17
10	(a) Poudre de kératine soluble (b) Solution de kératine soluble diluée.	17
11	Image illustrant la Farine de plume obtenue.	22
12	Aspect de la souche <i>Bacillus atrophaeus</i> BN2 sur milieu solide « FBMS ».	23
13	Observation microscopique de la souche <i>Bacillus atrophaeus</i> BN2 après coloration de Gram (Grossissement X1000).	23
14	Zones d'hydrolyse protéolytique sur gélose nutritive au lait ensemencée par la souche <i>Bacillus atrophaeus</i> BN2.	24
15	Cinétique de croissance de <i>Bacillus atrophaeus</i> BN2et activité kératinolytique à 24, 48 ,72 et 96h.	25
16	(a) Courbe iso réponses et (b) surface de réponse pour : $X_2=0$, $X_3=0$.	33
17	(a) Courbe isoréponse et (b) surface d'isoréponses pour : $X_2=1$ et $X_3=1$.	34
18	Courbe isoréponses (a) et surface d'isoréponses (b) pour $X_2=-1$ et $X_3=-1$.	35
19	(a) Courbe isoréponses et (b) surface d'isoréponses pour $X_2=+1$ et $X_3=-1$	36
20	Courbe isoréponses (a) et surface d'isoréponses (b) pour $X_2=-1$ et $X_3=+1$.	37

abréviation	signification
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
FAO	Food and Agriculture Organization
FBMS	Milieu à base de farine de plumes solide
FBML	Milieu à base de farine de plumes liquide
Fig.	Figure
GNL	Gélose Nutritive au Lait
LMA	Laboratoire de microbiologie appliqué
MT	Million de tonnes
TCA	Acide trichloracétique
UI	Unité internationale
MSR	Méthodologie de Surface de Réponse
OFAT	One Factor at Time

Introduction

Dans le monde, les usines de transformation de la volaille produisent des milliers de tonnes de plumes par an en tant que déchets (Williams et *al.*, 1991). Leurs teneur en β -kératine est en grande partie responsable de leur haut degré de résistance aux processus de dégradation (Onifade et *al.*, 1998). Dans plusieurs pays, l'élimination des plumes de volaille et autres déchets se fait par incinération. Cependant, cette méthode présente des inconvénients d'ordre environnementaux et écologiques importants. La dégradation de la kératine fait appel à des méthodes chimiques drastiques et des méthodes enzymatiques plus douces, l'utilisation de kératinases est l'alternative du moment. Ces enzymes sont des protéases qui sont principalement synthétisées par un groupe diversifié de microorganismes qui représentent 60 % des ventes totales des enzymes dans le marché mondial (Rao et *al.*, 1998 ; Rai et *al.*, 2010).

Les nouvelles spécificités découvertes de ces protéases ont révolutionné la biotechnologie blanche par leurs exploitations dans différentes applications comme la valorisation de certains coproduits kératiniques, tels que les plumes qui sont composées principalement de kératine (Oscar et *al.*, 2015), elles ne sont pas donc dégradables par les enzymes protéolytiques communes telles que la trypsine, la pepsine, la papaïne. Par conséquent, les plumes peuvent constituer un problème environnemental (Abidi et *al.*, 2008). L'utilisation de kératinases microbiennes pour la dégradation de la kératine des plumes en entités peptidiques plus petites, offre une approche alternative plus viable, plus respectueuse de l'environnement et moins coûteuse, ainsi que la mise à niveau de la valeur nutritive de la farine de plumes (Gupta et Ramnani, 2006 ; Chhimpa et *al.*, 2016). Les kératinases peuvent être aussi utilisées dans diverses applications tels que : les détergeants, la récupération de l'argent, le traitement du cuir ainsi que dans l'industrie pharmaceutique.

La méthode traditionnelle d'optimisation utilisée est un facteur à la fois, elle nécessite beaucoup de temps et un nombre élevé d'expériences. L'une des méthodes les plus efficaces pour optimiser la production des protéases est la méthodologie surface de réponse. Ces dernières années la MSR a été utilisée dans divers domaines biotechnologiques (Bas et Boyaci, 2007 ; Kanagasabai et *al.*, 2013).

Afin d'augmenter la production enzymatique, il est intéressant d'optimiser les composants des milieux de production et les conditions de fermentation à savoir les paramètres physico-chimiques et nutritionnels pour obtenir les rendements les plus élevés. La

SRM permet un criblage rapide d'un nombre élevé de facteurs, il est possible d'étudier les interactions entre les variables (Cui et *al.*, 2012).

L'objectif principal de cette étude s'inscrit dans cette optique et qui s'organise autour de deux grandes parties : la première fait état sur la kératine et les kératinases et donne un aperçu sur le genre *Bacillus* producteur de kératinases ainsi que des notions fondamentales relatives à la modélisation statistique par les plans d'expériences.

La deuxième partie est expérimentale et concerne l'application du plan factoriel complet afin d'optimiser la production des kératinases par la souche *Bacillus atrophaeus* BN2, elle est isolée à partir d'un poulailler à Bejaia en 2017, ce présent travail est une continuité du précédent.

Synthèse bibliographique

1. Considérations générales sur les kératines

Le mot « Kératine » est apparu dans la littérature aux environs de l'année 1850. La kératine vient du mot « Kera » en grec qui signifie une corne (Rouse et Van Dyke, 2010).

Les kératines sont des protéines fibreuses insolubles avec une très grande stabilité et un taux de dégradation faible (Tom sinoy et *al.*, 2011). Elles forment la plus grande partie des couches cornées de l'épiderme, et de ses appendices comme les cheveux, les poils, les ongles, les plumes, les écailles et les griffes (Jacques, 2003).

Il existe deux principaux groupes de kératines, les alpha-kératines et les bêta-kératines. Bien que les deux remplissent des rôles similaires, elles diffèrent légèrement dans la structure, la composition et les propriétés. Les alpha-kératines sont légèrement basiques ou neutres et ont une structure hélicoïdale droite et les bêta-kératines sont légèrement acides et forment aussi une structure hélicoïdale droite (Selvam et Vishnupriya, 2012).

En fonction de leurs teneurs en soufre, les kératines sont regroupées en kératines dures (ongles, plumes, poils et sabots) et en kératines molles (peau et cals) (Scott et Untereiner, 2004). Le rôle de la kératine est d'assurer une protection de l'animal (ou de l'homme) contre son environnement naturel. C'est pourquoi elle montre une grande résistance aux attaques chimiques et enzymatiques. Cette résistance est due à sa forte teneur en cystéine (Jacques, 2003).

2. Coproduits kératiniques

La kératine est utilisée par de nombreux êtres vivants comme élément de structure et elle garantit une peau imperméable ; elle représente 85 % des protéines cellulaires tels que les cheveux, la laine, les plumes, les ongles et les cornes. (Bragulla et Homberger, 2009).

La laine fait partie de la famille des fibres protéiques. Elle est composée d'environ 97 % de kératine, 2 % de lipides et 1 % de sels minéraux (Elie, 2008). Les Cheveux sont implantés obliquement dans le cuir chevelu ; la tige du cheveu est entièrement kératinisée (65-95 % des protéines du cheveu) (Mitu, 2004). Les plumes et duvets sont des coproduits de l'industrie alimentaire. Ces deux matières naturelles ont des caractéristiques physiques spécifiques. En effet, leurs pouvoir isolant et leurs légèretés, leurs donnent la propriété d'être utilisées dans de nombreuses applications courantes tel que le textile et rembourrage. (Nouad, 2011).

2.1. Cas des plumes de volaille

2.1.1. Production mondiale de volaille

En 2014, la production mondiale de viande de volaille a été estimée à 110,5 millions de tonnes (MT), soit une augmentation de 3,9 % par rapport à 2013. Les perspectives agricoles de la FAO montrent que l'on peut s'attendre à une progression de la production de volailles de 1,8 % par an de 2015 à 2024, tandis que la production de toutes viandes confondues augmenterait seulement de 1,3 % par an. La filière avicole deviendrait alors, d'ici 2020, la première production de viandes dans le monde (134,5 MT en 2023), où les États-Unis conserveraient leur place de premier producteur mondial de volailles, devant la Chine comme indiqué dans le tableau I (FAO, 2015).

Tableau I : Principaux producteurs de viande de volailles dans le monde (équivalent carcasse) (FAO, 2014).

Pays producteurs	Production 2014 en millions de tonnes	Evolution 2014/2013	Prévisions de production 2015 en millions de tonnes
États-Unis	20,3	+ 1,5 %	20,7
Chine	18,5	+ 0,5 %	18,5
L'Union européenne	14,1	+ 2,6 %	13,5
Brésil	13,3	+ 2,9 %	13,6
Russie	3,7	+ 3,9 %	3,8
Inde	2,5	+ 1,9 %	2,6
Monde	110,5	+ 3,9 %	112,1

2.1.2 Production de volaille en Algérie

La filière avicole en Algérie, durant la période 1962-1969, était essentiellement fermière sans organisation particulière et n'occupait qu'une place très modeste dans la structure de la ration alimentaire de l'Algérien. L'Algérie a opté, par la suite, pour la mise en place d'un circuit avicole moderne. En effet, trois périodes différentes sont distinguées: la période 1969-1979 qui constitue l'amorce du programme de développement des productions animales, dont l'aviculture ; la période 1980-1984 qui a vu la mise en place d'un programme spécial qui est « le plan avicole », visant une réorganisation du secteur avicole et la période 1985-1989 qui constitue une continuité du plan précédant avec une augmentation des objectifs de consommation (Djerou, 2006). En l'an 2011, la filière avicole Algérienne a atteint un stade de développement appréciable dans l'économie agricole. Les productions, ont atteint ainsi les 253.000 tonnes selon les statistiques de la FAO (MADR, 2012). L'Algérie figure dans les toutes premières places dans l'élevage des poulets parmi les pays de la région du Grand Maghreb (Tableau II). En effet, l'Algérie représente 20 à 35% du cheptel de volaille de la région selon les espèces, avec un nombre de têtes de poulets qui a atteint 124 millions en 2007. Par ailleurs, l'Algérie a été classée ces dernières années, en deuxième position derrière le Maroc, avec un nombre de têtes de poulets atteignant 140 millions, représentant ainsi 34,71 % du cheptel de la région (Nouad, 2011).

Tableau II : Nombre de têtes de poulets dans les différents pays du grand Maghreb, de 2001 à 2007, selon les données statistiques de la FAO, 2007 (Nouad, 2011).

(x 1000)	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Algérie	110 000	120 000	125000	125000	125 000	125 000	124 000
Libye	25 000	25 000	25 000	25 000	25 000	25 000	25 000
Maroc	137 000	137 000	137 000	137 000	137 000	140 000	140 000
Mauritanie	4 100	4 200	4 200	4 200	4 200	4 200	4 200
Tunisie	61 417	62 000	62 000	64 000	64 000	62 000	64 000
Total	337 517	348 200	353 200	355 200	355 200	356 200	357 200
% Algérie	32.59%	34.46%	35 .39%	35.19%	35.19%	35.09%	34.17%

3. Coproduits de volaille

L'industrie mondiale de la volaille est énorme et elle est considérée parmi les plus polluantes en raison des grandes quantités de déchets générés. En effet, la viande destinée à l'alimentation humaine ne représente que 68 à 72 % et 78 % de chaque poulet et de chaque dinde, respectivement alors que le reste devient des déchets après sa transformation (Haines, 2004). Les principaux coproduits générés dans les usines de transformation de la volaille sont les plumes, le sang, les résidus de désossage, les pattes et les viscères. Il est à noter que les quantités de plumes annuelles provenant de l'abattage de volaille représentent plus de 250 000 tonnes de plumes humides (cité par Boucherba, 2014). Ces matériaux représentent une quantité massive de déchets solides qui devraient être correctement gérés pour éviter les dommages environnementaux et la perte de matières premières importantes pour l'industrie alimentaire et comme ressources biologiques (Jayathilakan, 2012).

3.1. Valorisation des plumes de volaille

Les plumes et duvets ne doivent donc pas, sauf cas particuliers, être considérés comme des déchets au sens habituel du terme, mais plutôt comme une matière première naturelle traditionnelle, au même titre que le cuir, la laine, les peaux de lapins. (Nouad, 2011).

Les procédés identifiés comme voie potentielle de valorisation matière ou de valorisation organique des plumes sont résumés dans le tableau III.

Tableau III : Procédés de valorisation matière et organique des plumes. (Nouad, 2011).

Valorisation matière	Valorisation organique
- Extraction kératinique pour la fabrication de peinture résistante à la lumière (projet européen- Polymérisation des fibres de plumes - Filage de la matière kératinique (applications textiles) - Fabrication de textile non tissé avec nappage de plumes	- Fabrication d'amendement organique (compost) à partir de plumes sèches (déchets de l'industrie d'anoblissement) ou humides (déchets d'abattage d'oiseaux terrestres) ou de farines de plumes hydrolysées

Malgré l'utilité des déchets de volaille, leurs valorisation en Algérie est inexistante (Nouad, 2011). En effet, l'industrie élimine ces déchets en l'incinérer ou en les jettent dans les décharges publiques, ce qui présente des risques écologiques énormes (Marcondes, 2008). La valorisation des plumes comme substrat analytique fait l'objet du présent travail.

3.2. Structure et composition de la plume

La plume est composée d'un axe central nommé rachis, creux à sa base et plein dans sa partie principale. Elle porte des barbes, insérées en deux séries de part et d'autre de l'axe dans un seul plan et enchevêtrées par des barbules perpendiculaires, qui ne peuvent pas être observées à l'œil nu. Ces dernières sont accrochées les unes aux autres grâce à des crochets (Fakhfakh-zouari, 2010) qui les tiennent (Fig. 1).

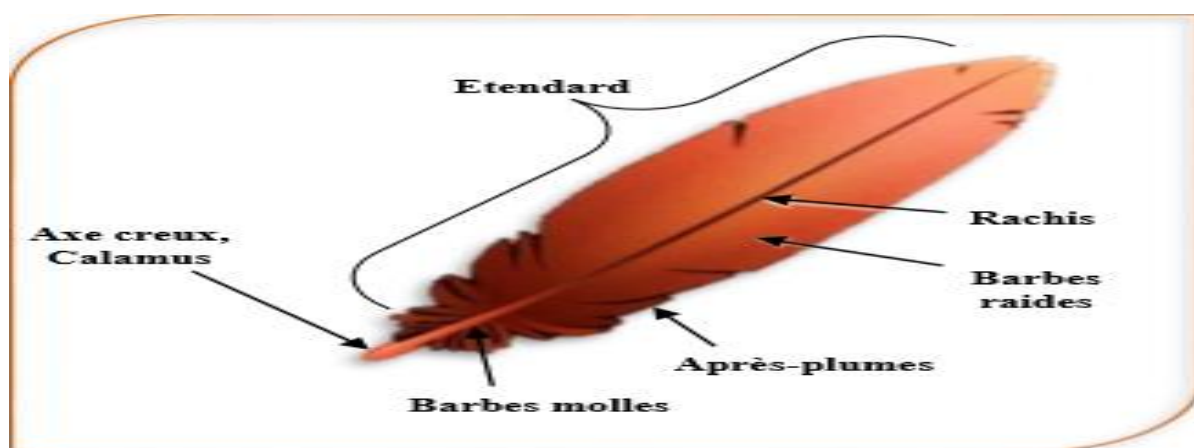


Fig. 1 : Schéma illustrant les différentes parties d'une plume.

La plume est considérée comme une source très riche de protéines surtout la β -kératine (protéine fibreuse insoluble) qui constitue 91% de la plume (Godheja et al., 2014).

La présence de la kératine rend la plume récalcitrante à la plupart des protéases communes comme la trypsine, la pepsine et la papaïne, ce qui ralentit son processus de dégradation dans la nature. De plus, ces plumes possèdent une partie non protéique qui inclut des pigments, des minéraux, des polysaccharides, des nucléotides, de l'acide urique, du glucose et du ribose (Grosse, 1956).

Les kératines de plumes comptent environ 20 types, dont la composition ne diffère que par quelques acides aminés. La répartition des acides aminés est fortement non uniforme, par rapport aux résidus basiques et acides. Les résidus de cystine sont concentrés dans les régions N- et C-terminales. La partie centrale est riche en résidus hydrophobes comme Alanine

(Kannappan, 2012). Les acides aminés composants les kératines sont mentionnés dans le tableau IV.

Tableau IV : Contenu en acides aminés des fibres kératiniques de plumes de volailles (Kannappan, 2012).

Acide aminé	Pourcentage (%)
Arginine	4,30
Acide aspartique	6,00
Glutamine	7,62
Thréonine	4,00
Serine	16,0
Tyrosine	1,00
Leucine	2,62
Isoleucine	3,32
Valine	1,61
Cystine	8,85
Alanine	3,44
Phénylalanine	0,86
Méthionine	1,02
Proline	12,0
Asparagine	4 ,00

La kératine de plume est une protéine particulière. Elle a une teneur élevée en cystéine (8.85%), un acide aminé soufré, qui est à l'origine de la formation de ponts disulfures, créant un réseau tridimensionnel compact engendrant une grande stabilité. La présence de ces liaisons en grand nombre confère une grande insolubilité dans les solvants classiques et une résistance aux attaques chimiques. De ce fait, la kératine est une protéine particulière, résistante et stable (Jacques, 2003).

4. Kératinases

Les kératinases (EC 3.4.21/24/99,11) sont généralement des sérines protéases ou des métalloprotéases qui hydrolysent les kératines (Pandey et *al.*, 2017), Il s'agit d'une enzyme extracellulaire produite dans un milieu contenant des substrats kératiniques tels que les cheveux et les plumes (Selvam et Vishnupriya, 2012). Ces enzymes kératinolytiques attaquent principalement les ponts disulfures du substrat non soluble par clivage de ces derniers ce qui permet l'attaque des protéases extracellulaires et donne en définitive une accumulation de sulfocystéine, l'excès de soufre est oxydé en sulfite et en sulfate ou en thiosulfate qui se concentre dans le milieu réactionnel (Suh et *al.*, 2001 ; Anbu et *al.*, 2007 ; Priya et *al.*, 2008 ; Sahoo et *al.*, 2012).

4.1. Sources microbiennes des kératinases

Les kératinases sont produites par les bactéries, les actinomycètes et les moisissures et les levures. Parmi toutes les sources de kératinases, les bactéries sont les plus productrices notamment les espèces appartenant au genre *Bacillus* particulièrement :

Bacillus licheniformis et *Bacillus subtilis* (Thys et *al.*, 2004 ; Devi et *al.*, 2008 ; Gupta et *al.*, 2013).

Toutefois, les kératinases ont été également produites aussi par d'autres souches bactériennes tel que *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Lysobacter*, *Nesterenkonia*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, et *Meiothermus* (Gupta et Ramnani, 2006 ; Daroit et Brandelli, 2014).

Les Actinomycètes du genre *Thermoactinomyces* (Saha, 2009; Gousterova et *al.*, 2005) et l'espèce *Actinomadura keratinilytica* (cité par Habbeche, 2014).

Les champignons les plus producteurs sont : *Microsporum* sp, *Epidermophyton* sp, *Trichophyton rubrum* et *Aspergillus Niger*, *Aspergillus versicolor* (Lopes et *al.*, 2011).

Trichophyton mentagrophytes, et les levures comme *Candida albicans* (Essien et *al.*, 2009).

4.2. Genre *Bacillus* comme producteur de kératinases

Le genre *Bacillus* est ubiquiste dans la nature, il appartient à la famille des Bacillaceae, ordre des Bacillales, classe des Bacilli, phylum des Firmicutes. (Zhang et *al.*, 2009). La classification taxonomique des bactéries du genre *Bacillus* a été auparavant classée selon leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques ainsi que leur capacité à sporuler (Bron et *al.*, 1999) alors qu'aujourd'hui la classification se base sur l'analyse comparative des séquences de base de L'ARN ribosomique 16S (Maughan et

Auwera, 2011).

Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène de bactéries en forme de bâtonnets droit ou légèrement incurvées, à Gram positif avec des extrémités arrondies à l'exception de *Bacillus cereus* qui possède des extrémités carrées. Ces bactéries sont immobiles ou mobiles par des flagelles péritriches, aérobies ou anaérobies facultatifs. Elles sont capables de former des endospores résistantes à différentes conditions défavorables. La plupart sont des saprophytes du sol, de l'eau, de l'air et des plantes ; sont catalase +, glucose +, VP +, gélatinase +, uréase -, maltose +, saccharose + (Aryal, 2016).

4.3. Applications industrielles des kératinases

Les kératinases ont diverses utilisations industrielles, citons les plus connues :

- **La détergence** : L'emploi d'enzymes dans l'industrie des détergents est l'application la plus répandue de toutes les technologies enzymatiques (Drouin, 2005). Environ 89 % des enzymes de détergent sont des protéases alcalines. Les kératinases peuvent contribuer à l'élimination des surfaces kératiniques qui sont souvent rencontrées dans la blanchisserie, comme dans les cols des chemises (Gupta et Ramnani, 2006). De plus, les kératinases sont utilisées dans le nettoyage des canalisations bouchées par des déchets kératiniques (Farag et Hassan, 2004).
- **Dégradation des prions** : Les prions sont des particules protéiques responsables de maladies neurodégénératives appelées encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) qui incluent la maladie redoutée de la vache folle, la tremblante du mouton, le kuru et la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Ils sont transmis par contact avec les tissus infectés, des liquides corporels ou des instruments médicaux contaminés. Les kératinases semblent être les seules enzymes capables de dégrader les prions qui causent l'EST. Ainsi, elles sont utilisées dans le traitement des farines animales et la désinfection des dispositifs médicaux (Van raamsdonk et al., 2004).
- **Récupération de l'argent** : Les protéases alcalines jouent un rôle crucial dans le bioprocédé des films photographiques usés pour la récupération de l'argent ; ces pellicules contiennent du polyester comme matière de base, enveloppée dans une couche de gélatine et une couche d'argent (1,5 à 2 % par unité de masse). Cet argent est récupéré en brûlant ces pellicules, provoquant une pollution environnementale indésirable. Pour y remédier, des protéases alcalines sont utilisées pour la récupération en continu de l'argent à partir de ces films photographiques en décomposant la couche de gélatine qui est difficile à dégrader par d'autres protéases (Fujiwara, 1989 ; Shankar et al., 2010).

- **Industrie du cuir** : la technique chimique pour l'épilage des peaux d'animaux produit un effluent très pollué en plus d'être couteuse et drastique. L'alternative à ce procédé est l'utilisation des enzymes protéolytiques. Cet avantage est préférentiellement possible si la protéase est active en milieu alcalin. Il serait aussi préférable qu'elle possède des activités élastolytiques et kératinolytiques. Il a été rapporté que des protéases de certaines microorganismes de nature alcalophiles étaient performants pour accélérer l'opération d'épilage (Nilegaonkar et *al.*, 2007).

Autres applications : L'utilisation des kératinases dans la digestion anaérobie des déchets de volaille pour produire du gaz naturel comme combustible (Brutt et Ichida, 1999). En médecine et en pharmacie, elles sont employées comme traitement contre l'acné, pour la préparation des vaccins pour la dermatophytose et comme additifs dans les agents sert la peau, car ils stimulent la dégradation de la kératine (Vignardeta et *al.*, 2001).

5. Plans d'expériences

5.1. Définition et intérêt du plan d'expérience

Un plan d'expérience adapté est celui qui fournit l'information désirée avec peu d'expérimentations. Plus précisément, un plan d'expérience n'est pas une série d'essais au hasard ni sélectionnés par la seule intuition, mais une stratégie optimale permettant de prédire avec le maximum de précision une réponse à partir d'un nombre minimal d'essais et en utilisant un modèle postulé (Ozil, 1997). Les avantages du plan d'expériences sont :

- La diminution du nombre d'essais.
- La connaissance des effets des paramètres.
- La possibilité d'évaluer les effets de l'interaction entre les paramètres.
- La précision des résultats.
- La modélisation mathématique de l'expérience.
- La prédiction et l'optimisation (Goupy, 1999 ; Antony, 2003).

5.2. Modèle mathématique postulé

Une loi d'évolution générale est donnée lors de l'absence de toute information concernant la fonction qui met en relation la réponse aux facteurs, elle est du type :

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_n).$$

Etant trop générale, il en est d'usage de prendre un développement limité de Taylor-Marc Laurin. Le développement précédant prend la forme d'un polynôme de degré plus au moins élevé si les dérivés sont considérés comme des constantes, elle s'écrit :

$$\hat{Y} = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ii} x_i^2 + \dots + e$$

On a :

- ✓ $\hat{Y}$: c'est la réponse ou grandeur d'intérêt
- ✓ x_i : représente un niveau du facteur i
- ✓ x_j : représente un niveau de facteur j (Harris et Hopkinson, 1976).
- ✓ a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} : sont les coefficients du polynôme (Goupy et Creighton, 2001).
- ✓ e : L'erreur.

Matériel et méthodes

1. Présentation du travail

Notre travail de recherche a été réalisé entre le 10 février et le 15 mai 2018 au niveau du Laboratoire Pédagogique « Génie Biologique » et au sein du Laboratoire de Recherche « Microbiologie Appliquée » (LMA) de la faculté des Sciences de la Nature et de la vie. Ce travail a déjà été initié l'année précédente par nos camarades Mechmeche Naima et Sadou Houria, il s'agit donc d'une continuité des travaux sur les kératinases microbiennes, un doctorant intégré dans l'équipe « Enzymes Microbiennes » dirigée par le Dr. Boucherba N. travaille sur la même thématique depuis deux ans.

2. Matériel biologique

Le premier matériel biologique utilisé dans ce travail est une souche isolée en 2017 à partir de plumes de poules collectées au niveau d'un poulailler traditionnel d'Ihaddaden Oufela, Selon les résultats du séquençage de l'ARN ribosomique 16S, il s'agit de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2 (prestation de service au niveau du centre de Biotechnologie de Sfax, Sfax, Tunisie).

Le deuxième matériel biologique est les plumes collectées au niveau de 4 endroits : une ferme avicole des poules pondeuses qui se situe à « Amizour » (Fig. 02), une tuerie qui se situe au marché d'Amizour (Fig. 03), autre poulailler des poules pondeuses qui se situe à « Bouandas » (Fig. 04) et une tuerie qui se situe à « Tala oulili » (Fig. 05).

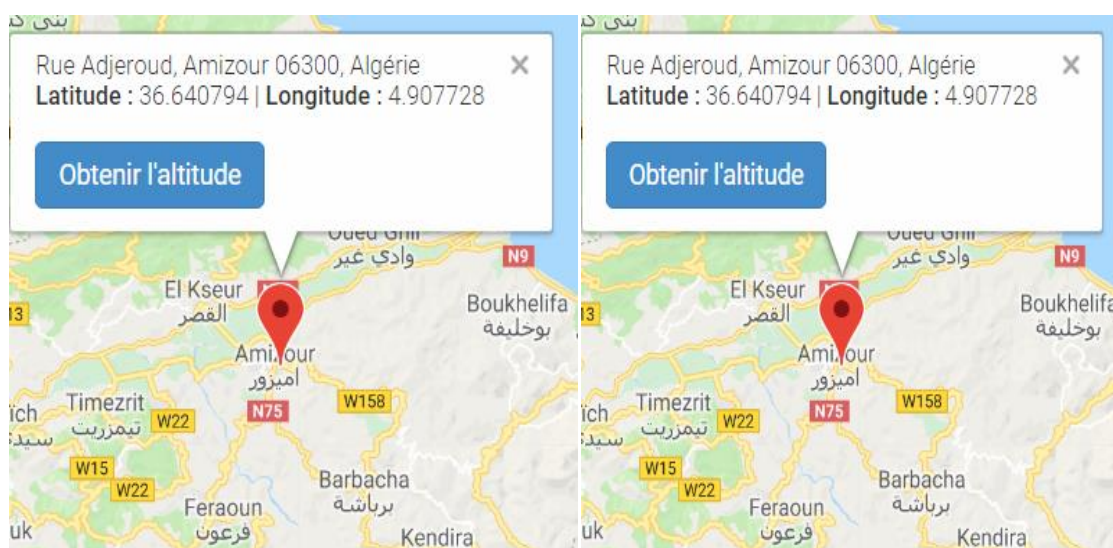


Fig. 02 : Site de la ferme avicole « Amizour »

Fig. 03 : Site du «marché d'Amizour»



Fig. 04 : Site de « Bouandas »



Fig. 05 : Site de la tuerie de «Tala oulili »

2.1. Préparation de la farine de plumes

Les plumes (Fig. 06) sont collectées au niveau d'une tuerie située à Amizour (Bejaia) et la farine de plume est préparée en plusieurs étapes :

- ✓ Les plumes subissent plusieurs lavages à l'eau du robinet et un dernier lavage à l'eau distillée.
- ✓ Séchage à 150 °C pendant 05 min et sont découpées en petits morceaux.
- ✓ Broyage à l'aide d'un broyeur et tamisées pour éliminer les grosses particules et avoir une farine homogène (Habbeche, 2014).



Fig. 06 : Image illustrant des plumes blanches lavées et séchées.

3. Repiquage et purification de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2

Un milieu sélectif solide à base de farine de plume (FBMS) (Annexe II) est employé pour le repiquage et la purification de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2. Ce travail aurait pu être fait sur gélose nutritive mais afin de vérifier que la souche a conservé son activité kératinolytique, nous avons choisi le milieu FBMS. Sa préparation est réalisée selon la méthode de Williams et collaborateurs (1990) et le pH est par la suite ajusté à 7.

4. Test d'activité protéolytique sur milieu solide (Test qualitatif)

Deux à trois colonies sont prélevées à partir du milieu FBMS et mises dans 9 ml d'eau physiologique stérile (Annexe II), ainsi est préparée la solution mère. Des dilutions décimales sont préparées par l'ajout successif de 1 ml de la solution précédente à 9 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-8} (Geng et al., 2004).

Les boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive au lait (GNL) sontensemencées en surface avec chaque dilution (0,1 ml), ils sont par la suite incubées à une température de 37 °C pendant 24h.

5. Production de kératinases

5.1. Culture en milieu liquide

La production de kératinases par *Bacillus atrophaeus* BN2 est réalisée dans un milieu liquide à base de farine de plumes (FBML) (AnnexeII), L'activité enzymatique est réellement estimée et quantifiée par sa mesure en milieu liquide. Tout d'abord est préparée une préculture qui correspond à l'ensemencement de deux colonies de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2 dans de tube à essai stériles contenant 5 ml de FBML, puis incubé dans un bain-Marie agitateur à 37 °C pendant 24h. Des Erlens mayers de 100 ml contenant 20 ml du milieu FBML sont inoculés à raison de 3 % (v/v) avec la préculture et puis incubés à 37 °C pendant 48h. (Fig. 07). Chaque 24 h, la croissance bactérienne est mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV mini 1240 SHIMADZU et l'activité kératinolytique est mesurée selon le test décrit en page 16.



Fig. 7 : Fermentation sur, milieu FBML inoculé avec *Bacillus atrophaeus* BN2 à 37°C pendant 48 h.

6. Mesure de l'activité kératinolytique

6.1 : Préparation de la solution enzymatique et du substrat analytique

La solution enzymatique correspond au surnageant de culture (Fig. 08) récupéré après centrifugation à 6000 ×g pendant 20 min de la cultureensemencée à 37°C pendant 48 h (Fig. 07).



Fig. 8 : Surnageant de culture de *Bacillus*.

A partir des plumes de poules, la kératine brut a été extraite et purifiée pour donner un substrat analytique comparable à la kératine azure qui est un substrat commercial qui revient cher. 5g de ce substrat est commercialisé par la Firme Sigma-Aldrich, son prix est au alentour de 57 ,000 Da (Fig. 9).



Fig. 9 : Aspect fibreux de la Kératine azure.

La kératine de plume soluble est préparée à partir de la farine de plumes (5 g) qui est dissoute dans 250 ml de diméthyle sulfoxyde (DMSO), ensuite le mélange est chauffé dans un rotavapeur ((Buchi Rotavapor R-114) à 80 °C pendant 4 h. La kératine soluble est ensuite précipitée pendant 2 h par l'addition de 500 ml d'acétone déjà refroidis à (-80 °C).

Le précipité est récupéré par centrifugation à 5000 ×g pendant 20 min, ensuite lavé deux fois à l'eau distillée et séché à 50 °C jusqu'à l'obtention d'une poudre (Fig.10a). 1 g de ce précipité est dissout dans 20 ml de NaOH (0,05 M) (Annexe V). Le pH est ajusté à 8 par une solution de HCl (1N), puis la solution est diluée à 200 ml avec du tampon Tris-HCl (0,05 M) à pH 8 (Fig.10b) (Annexe V) (Gradišar *et al.*, 2005 ; Park et Son, 2009).



(a)



(b)

Fig.10 : (a) Poudre de kératine soluble (b) Solution de kératine soluble diluée

6.2 Test d'activité proprement dit

Le mélange réactionnel est composé de 1 ml du surnagent de culture avec 1 ml de la solution de kératine soluble. L'incubation du mélange se fait au bain-Marie à 50 °C pendant 10 min ; les témoins sont préparés parallèlement dans les mêmes conditions sans surnagent de culture. Les réactions sont arrêtées par l'addition de 2 ml de TCA (0,4 M) (Annexe III).

Le mélange est refroidi 5 min dans un bain de glace et en même temps le surnageant de culture est ajouté aux témoins, les tubes sont centrifugés pendant 20 min à une vitesse de 5000 ×g. L'activité enzymatique est détectée par mesure de l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type RAYLEIGH (UV-1800).

Selon Cai et collaborateurs (2008), une unité de l'activité kératinolytique (U/ml) est définie comme étant l'augmentation de la DO 280 par rapport au blanc, de 0,01 par min dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus. L'activité est calculée selon la formule ci-dessous :

$$\text{Activité kératinolytique (U/ml)} = \frac{4 \times n \times A_{280}}{(0,01 \times 10)}$$

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

7. Optimisation de la production de kératinases par utilisation de plans d'expérience

7.1. Détermination des paramètres influençant la production de Kératinases

Dans le but de déterminer les paramètres qui influencent le plus sur la production de kératinases de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2, ont été étudié les facteurs suivants :

- La Température (34 °C, 37°C° et 40 °C).
- Le taux d'inoculation (2% ,3% et 4% (v /v).
- Le pH (6, 7 et 8).
- La concentration de la farine (15, 20 et 25 g/l).

Les valeurs extrêmes des différents paramètres opératoires sont résumées dans le tableau VI.

Tableau VI : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés.

Paramètres opératoires	Notation	Niveau minimal -1	Centre 0	Niveau maximal +1
Temperature (°C)	Z ₁	34	37	43
Taux d'inoculation % (v/v)	Z ₂	2	3	5
pH	Z ₃	6	7	8
Concentration de la farine (g/L)	Z ₄	15	20	25

Le milieu liquide « FBML » est un milieu contenant comme seule source de carbone et d'azote la kératine des plumes qui est préparée à différentes concentration : 15, 20 et 25 g/l. Les milieux de culture sont préparés sous agitation afin de mieux dissoudre la farine, le milieu est ensuite réparti dans des Erlenmeyer d'une capacité de 100 ml, contenant un volume utile de 20 ml du milieu de culture liquide ajusté à différents pH, puis il est autoclavé.

Une étude statistique expérimentale est réalisée en utilisant le plan d'expérience à l'aide de l'Excel.

Seize combinaisons de milieux de culture (16) à base de la farine de plume à des compositions variables ont été préparées selon la matrice des expériences élaborée et représentée dans le Tableau V.

La matrice d'expériences pour $k=4$ ($N= 2^4$) .donc : $N= 16$ réalisé par l'Excel est représentée dans le **tableau V**.

Tableau V : Matrice d'expériences pour $k=4$ ($N= 2^4$).

N°: D'essai	Z ₁ (g/L)	Z ₂ % (v /v)	Z ₃	Z ₄	X ₀	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	34	2	6	15	1	-1	-1	-1	-1
2	40	2	6	15	1	1	-1	-1	-1
3	34	4	6	15	1	-1	1	-1	-1
4	40	4	6	15	1	1	1	-1	-1
5	34	2	8	15	1	-1	-1	1	-1
6	40	2	8	15	1	1	-1	1	-1
7	34	4	8	15	1	-1	1	1	-1
8	40	4	8	15	1	1	1	1	-1
9	34	2	6	25	1	-1	-1	-1	1
10	40	2	6	25	1	1	-1	-1	1
11	34	4	6	25	1	-1	1	-1	1
12	40	4	6	25	1	1	1	-1	1
13	34	2	8	25	1	-1	-1	1	1
14	40	2	8	25	1	1	-1	1	1
15	34	4	8	25	1	-1	1	1	1
16	40	4	8	25	1	1	1	1	1
17	37	3	7	20	1	0	0	0	0
18	37	3	7	20	1	0	0	0	0
19	37	3	7	20	1	0	0	0	0

La souche *Bacillus atrophaeus* BN2 estensemencée dans les différents milieux et incubée à différentes températures pendant 48 h en fonction de l'expérience en question.

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

$$\hat{y}=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_4+b_{12}X_1X_2+b_{13}X_1X_3+b_{14}X_1X_4+b_{23}X_2X_3+b_{24}X_2X_4+b_{34}X_3X_4+b_{123}X_1X_2X_3+b_{124}X_1X_2X_4+b_{134}X_1X_3X_4+b_{234}X_2X_3X_4+b_{1234}X_1X_2X_3X_4.$$

X_1, X_2, X_3 et X_4 sont des variables sans dimension correspondant respectivement à Z_1, Z_2, Z_3, Z_4 .

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

Pour transformer les variables centrées réduites (X_j) aux variables naturelles nous avons appliqué la formule de passage ou de codage suivante :

$$X_j = \frac{Z_j - Z_j^0}{\Delta Z_j}, \quad j=1,2,\dots,k$$

$$\text{Tel que :} \quad \Delta Z_j = \frac{Z_{j\max} - Z_{j\min}}{2} \quad \text{et} \quad Z_j^0 = \frac{Z_{j\max} + Z_{j\min}}{2}$$

X_j est la variable centrée réduite correspondant à Z_j .

$Z_{j\min}$ et $Z_{j\max}$ sont les niveaux inférieur et supérieur des facteurs qui constituent les frontières du domaine d'étude.

Le point de coordonnées $(Z_1^0, Z_2^0, \dots, Z_k^0)$ est dénommé centre du plan. ΔZ_j est l'unité de l'intervalle de variation suivant l'axe du Z_j . $Z_{j\min}$ et $Z_{j\max}$ sont les niveaux inférieures et supérieur des facteurs qui constituent les frontières d'un domaine d'étude (Goupy et Creighton, 2006).

Résultats et discussion

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

1. Préparation de la farine de plumes

Les plumes blanches de poulet de chair collectées au niveau de la tuerie d'Amizour (Bejaia) et une autre à Bouandas (Sétif) ont été lavées, séchées et broyées pour donner une farine blanche homogène (Fig.11)



Fig.11 : Image illustrant la farine de plume obtenue.

2. Repiquage et purification de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2

La souche *Bacillus atrophaeus* BN2 est repiquée et purifiée trois fois sur milieu sélectif solide à base de farine de plume (FBMS), la souche est pure même au premier repiquage, une coloration de Gram a été réalisé à titre de contrôle de pureté, la souche se présente sous forme de bâtonnets sporulés réguliers. L'espèce de *Bacillus atrophaeus* BN2 se développe sur le milieu FBMS ce qui peut supposer qu'elle a gardé son arsenal enzymatique à savoir son activité kératinolytique. L'aspect de la souche est donné dans la figure 12.

2.1. Observations macroscopiques et microscopique

Sur milieu solide « FBMS », après 48 h d'incubation à 37 °C ; la souche *Bacillus atrophaeus* BN2 présente des colonies blanchâtres, bombées, brillantes, rondes et lisses avec un contour régulier (Fig. 12).



Fig. 12 : Aspect de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2 sur milieu solide

La forme des bactéries et leur affinité pour les colorants constituent la base de leur classification. L'observation microscopique a révélé que la souche *Bacillus atrophaeus* BN2 se présente sous forme de bâtonnets réguliers à Gram positif, il s'agit d'une souche pure ne présentant aucune contamination (Fig. 13).

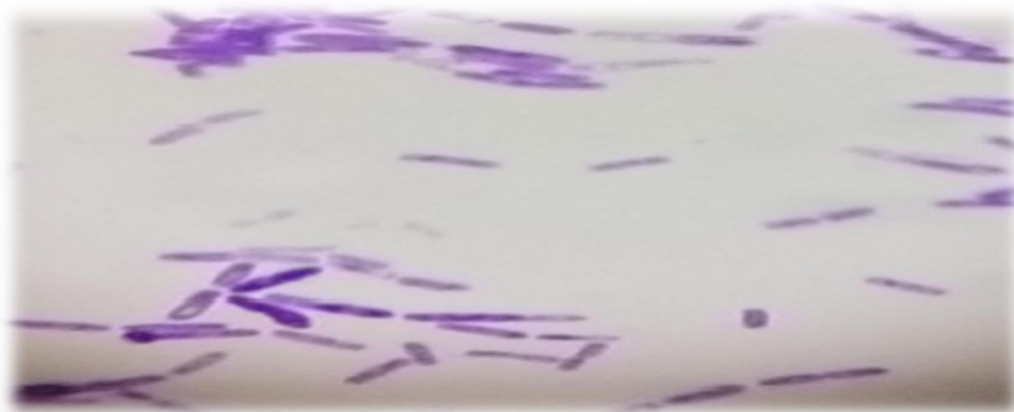


Fig. 13 : Observation microscopique de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2 après coloration de Gram (Grossissement X1000).

3. Test d'activité protéolytique sur milieu solide (test qualitatif)

L'activité protéolytique est mise en évidence sur milieu solide contenant de lait écrémé après 24 h d'incubation à 37°C. L'activité est révélée par l'apparition de zones d'hydrolyses autour des colonies (Fig. 14).

Les résultats obtenus après incubation sur le milieu GNL à pH 7 incubés pendant 24 h à 37°C ont démontré que la souche *Bacillus atrophaeus* BN2 possède une activité protéolytique intéressante. Ce test d'activité protéolytique est basé sur la diffusion des protéases sécrétées par ces bactéries dans le milieu de culture, et la dégradation de la caséine du lait autour de la colonie. Ce fait s'explique par l'observation directe d'un halo translucide

(anneau de protéolyse) autour de la colonie avec un diamètre de 12 mm proportionnel à la quantité des protéases libérées.

Ce diamètre est relativement faible par rapport à ceux obtenus par *Bacillus subtilis* B (D1W), *Bacillus cereus* B4 qui sont respectivement de 17 et 21 mm (Wakil et *al.*, 2011). Il n'existe pas de corrélation entre le diamètre de l'halo et l'activité kératinoxytique mesurée sur milieu liquide. Certaines souches peuvent présenter des diamètres relativement élevés sans pour autant avoir des activités élevées. Ce point a été soulevé par Brandelli et Riffel (2006) qui ont constaté qu'une espèce de *Bacillus* (isolat Kr 10) exhibait une grande zone mais possédait une activité faible de 20 U par rapport à l'isolat *Chryseobacterium* sp. (Kr6). Ceci peut être expliqué par le fait que ces zones d'hydrolyse protéolytique peuvent être associées à l'action de plusieurs protéases telles que l'alcalase produite par *Bacillus licheniformis* (Wakil et *al.*, 2011).



Fig.14 : Zones d'hydrolyse protéolytique sur gélose nutritive au lait ensemencée par la souche *Bacillus atrophaeus* BN2.

4. Culture sur milieu liquide

Après ensemencement et incubation du milieu FBML avec la souche *Bacillus atrophaeus* BN2. Une mesure de densité optique chaque 24h à 600 nm a permis de suivre la croissance de la souche dans le milieu de culture liquide, aussi une mesure de l'activité afin de voir le type de cinétique de production enzymatique, la figure N°15 illustre les résultats obtenus.

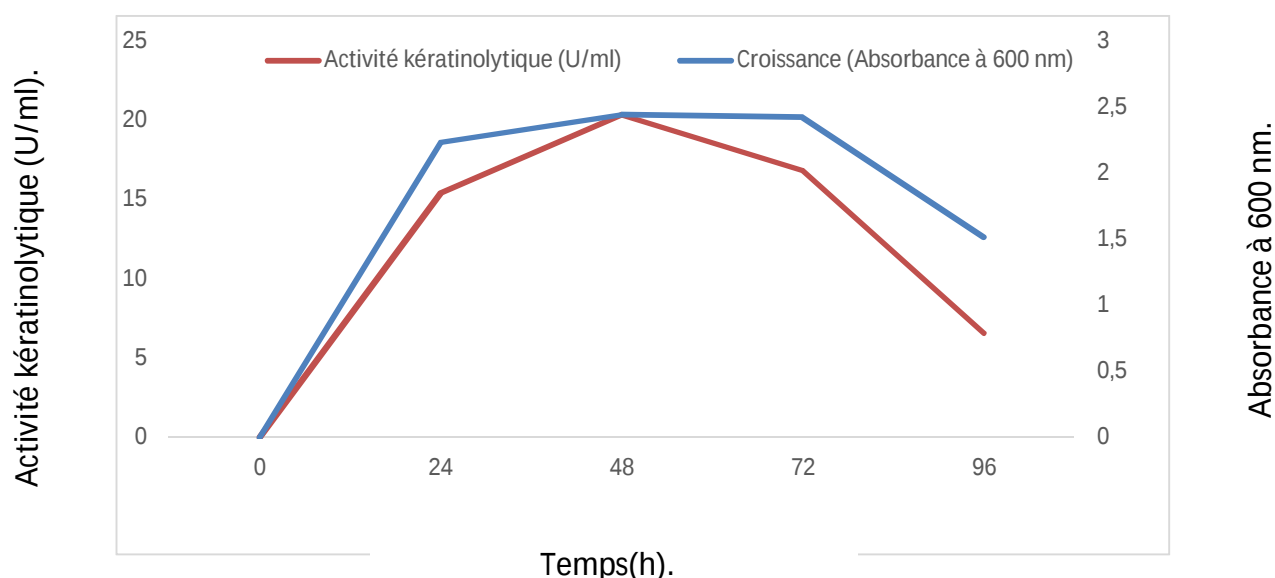


Fig. 15: Cinétique de croissance de *Bacillus atrophaeus* BN2 et activité kératinolytique à 24, 48, 72 et 96 h.

La souche *Bacillus atrophaeus* BN2 est une souche potentiellement productrice de kératinases, son activité kératinolytique est estimée à 20 U/ml au bout de 48 h de fermentation. Néanmoins cette valeur est à la baisse par rapport à l'année de l'isolement de la souche où l'activité a atteint 100 U/ml, Cette actuelle production de kératinases est comparée aux données de la littérature scientifique (Tableau VII).

Tableau VII : Comparaison de l'activité kératinolytique de *Bacillus atrophaeus* BN2 par rapport aux espèces du genre *Bacillus*.

Souches	Activité kératinolytique (U/ml)	Référence
<i>Bacillus atrophaeus</i> BN2	20	Travail actuel
<i>Bacillus subtilis</i> KD-N2	125	Cai et Zheng, 2009
<i>Bacillus</i> sp. P45	24	Daroit et al., 2009
<i>B. licheniformis</i> PWD-I	30,5	Shih et Michael, 1993
<i>Bacillus</i> sp. PW	50	Joshi et al., 2007
<i>Bacillus subtilis</i> P13	2,26	Pillai et al., 2011

La comparaison des résultats de l'activité kératinolytique de *Bacillus atrophaeus* BN2 aux données de la littérature scientifique montre que cette dernière révèle une activité

kératinolytique de 20 U/ml et suffisamment inférieur à celle de *Bacillus* sp. P45, *Bacillus licheniformis* PWD-I, *Bacillus* sp. PW et aussi supérieur à celle de *Bacillus subtilis* P13. Cependant la souche de *Bacillus subtilis* KD-N2 présente la meilleure activité kératinolytique (125 U/ml). La farine de plumes se révèle être une source adéquate et bon marché pour la production de kératinases à partir de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2.

5. Optimisation de production des kératinases par plan factoriel complet

5.1. Choix des paramètres influençant la production enzymatique

Rappelons que les paramètres opératoires pris en considération pour optimiser la production des kératinases par la souche *Bacillus atrophaeus* BN2 sont respectivement :

Tableau VIII : paramètre opératoire et leurs valeurs à différents niveaux

Paramètres opératoires	Notation	Niveau minimal -1	Centre 0	Niveau maximal +1
Temperature (°C)	Z ₁	34	37	43
Taux d'inoculation % (v /v)	Z ₂	2	3	5
pH	Z ₃	6	7	8
Concentration de la farine (g/L)	Z ₄	15	20	25

Une matrice d'expériences du plan factoriel complet avec interaction à deux niveaux a été élaborée, Le choix des paramètres et leurs niveaux de variations a été effectué en tenant compte des limites expérimentales de la croissance de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2.

L'effet des facteurs étudiés dans le cadre du plan factoriel complet (taux d'inoculation, la farine plume, température et pH) a permis de mesurer la réponse Y qui est l'activité kératinolytique estimée en U/ml . Les résultats obtenus ont permis de sélectionner parmi les quatre paramètres opératoires cités, les facteurs les plus significatifs influençant la production des kératinases. L'ensemble des résultats est regroupé dans le Tableau ci-dessous

Tableau VIII : Matrice des expériences pour un nombre de facteur $k=4$ et un nombre d'expériences $N=16$.

N° d'expérience	Z_1 (°C)	$Z_2\%$ (v/v)	Z_3	Z_4 (g/l)	X_0	X_1	X_2	X_3	X_4	« y »Activité kératinolytique U/ml
1	34	2	6	15	1	-1	-1	-1	-1	16,5866667
2	40	2	6	15	1	1	-1	-1	-1	8,02666667
3	34	4	6	15	1	-1	1	-1	-1	13,8533333
4	40	4	6	15	1	1	1	-1	-1	5,78666667
5	34	2	8	15	1	-1	-1	1	-1	5
6	40	2	8	15	1	1	-1	1	-1	7,58
7	34	4	8	15	1	-1	1	1	-1	25,2266667
8	40	4	8	15	1	1	1	1	-1	12,92
9	34	2	6	25	1	-1	-1	-1	1	5,88
10	40	2	6	25	1	1	-1	-1	1	6,90666667
11	34	4	6	25	1	-1	1	-1	1	12,2266667
12	40	4	6	25	1	1	1	-1	1	11,1733333
13	34	2	8	25	1	-1	-1	1	1	14,24
14	40	2	8	25	1	1	-1	1	1	11,2533333
15	34	4	8	25	1	-1	1	1	1	13,52
16	40	4	8	25	1	1	1	1	1	10,42
17	37	3	7	20	1	0	0	0	0	17,08
18	37	3	7	20	1	0	0	0	0	18,1866667
19	37	3	7	20	1	0	0	0	0	18,1866667

La moyenne de l'activité kératinolytique mesurée des 16 expériences est $\bar{y}_i = 11,315$ U/ml.

La moyenne de l'activité kératinolytique au centre du domaine est : $\bar{y}_0 = 17,833333$ U/ml.

5.2.1. 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 des coefficients sont regroupées dans le tableau X :

Tableau X : Valeurs des coefficients du modèle de régression.

Constante	Effets linéaires			
b_0	b_1	b_2	b_3	b_4
11,315	-2,056	1,880	1,260	-0,612

Effets d'interaction										
b_{12}	b_{13}	b_{14}	b_{23}	b_{24}	b_{34}	b_{123}	b_{124}	b_{134}	b_{234}	b_{1234}
-1,064	0,025	1,292	1,175	-0,748	0,395	-0,865	0,790	-0,782	-2,696	1,111

5.2.2. Analyse statistique de l'équation de régression

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

5.2.2.1. 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 (katarou, 1974., Sado, 1991., Benoit et al., 1994., Goupy, 2001). La procédure de calcul consiste à déterminer :

La variance de reproductibilité: est estimée par celle calculée au centre du domaine

expérimental et qui est donnée par la relation suivante :

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

S_{rep}^2 : Variance de reproductibilité.

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

$\bar{y}_0$: Moyenne des 3 essais au centre du domaine ; $\bar{y}_0 = 17,833333$ U/ml.

n_0 : nombre d'essai au centre.

On aura alors : $S_{\text{rep}}^2 = 0,45137778$

Le rapport t_j : utilisé Pour identifier les coefficients non significatifs par le test de Student,

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

$$S_{bj} = \frac{S_{rep}}{\sqrt{N}}$$

Avec: S_{bj} est l 'écart quadratique moyen qui est égale à 0,16796164.

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

Tableau XI : Valeurs de t_j calculées.

Terme constant	Effet linéaire			
t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
67,3665742	12,2448597	11,1979937	7,50171308	3,646

Effet d'interaction										
t_{12}	t_{13}	t_{14}	t_{23}	t_{24}	t_{34}	t_{123}	t_{124}	t_{134}	t_{234}	t_{1234}
6,335	0,148	7,695	7,0006	4,455	2,356	5,154	4,703	4,658	16,055	6,618

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe V), on lit la valeur $t_{\alpha}(f)$ pour un degré de liberté $f = n_0 - 1 = 2$ et pour un niveau de signification $\alpha = 5\%$ qui est égale à 4,3. D'après les résultats du tableau I de l'annexe V, on remarque que les valeurs de: t_4 (3,646), t_{13} (0,148) et t_{34} (2,356) sont inférieurs à la valeur tabulée (4,3), on conclue que les coefficients correspondants ne sont pas significatifs et ils seront donc éliminés de l'équation de régression.

5.2.2.2. Test de validation de l'équation de régression

Recherche de biais : avant d'accepter le modèle postulé, nous devons vérifier l'absence du biais pour cela, la variance résiduelle est calculée puis 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 : $S_{\text{rés}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - \ell}$

$\hat{y}_i$: Valeur prédite de l'activité pour chaque milieu pour $N=16$ et $\ell=12$ (et ℓ le nombre de coefficients significatifs), ce qui donne : $F= 6,29144$, $S_{\text{rés}}^2= 2,83981$

En utilisant la table de Fisher (Tableau I de l'annexe VI), la valeur tabulée du test de Fisher pour $f_1= 3$ et $f_2= 2$ est égale à 19,2; comme cette valeur est supérieure à celle calculée (6,29144), 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 régression

Le modèle étant sans biais, nous pouvons donc effectuer le test de Fisher pour la signification

de la régression par la relation suivante : $F = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / \ell - 1}{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 / N - \ell} = 11,5475$

Ou $\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} = 11,315 \text{ U/ml.}$

La valeur tabulée du test de Fisher pour $f_1=3$ et $f_2=12$ est égale à 3,49 et comme $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ alors le modèle est valide à 95 %.

L'équation du modèle s'écrit alors comme suit :

$$\hat{y} = 11,315 - 2,056X_1 + 1,880X_2 + 1,260X_3 - 1,064X_1X_2 + 1,292X_1X_4 + 1,175X_2X_3 - 0,748X_2X_4 - 0,865X_1X_2X_3 + 0,790X_1X_2X_4 - 0,782X_1X_3X_4 - 2,696X_2X_3X_4 + 1,111X_1X_2X_3X_4.$$

5.2.2.3. Calcul du coefficient de corrélation II

est appelé aussi coefficient de détermination, il est défini $R^2 = \frac{\text{variation due à la régression}}{\text{variation totale}}$

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2} = 0,97881 \text{ (Goupy, 1999., Antony 2003).}$$

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 $f=N-1$ est plus petit. La formule de correction est :

$$\overline{R}^2 = R^2 - (1 - R^2) \frac{\ell - 1}{N - \ell} = 0,89405 ; \text{ où } R^2 \text{ est la valeur corrigée du coefficient de}$$

régression multiple. La valeur du coefficient de détermination R^2 est égale à 0,98.

La valeur corrigée du coefficient de régression multiple R^2 égale à 0,89.

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

6. Etude des effets linéaires et d'interactions des différents paramètres

6.1. Effets linéaires

A partir du plan factoriel complet avec interactions obtenu, nous remarquons que le taux d'inoculum et le pH ont une influence positive sur l'activité kératinolytique de (+1,880) et de (+0,260) respectivement, les signes positifs de ces derniers indiquent que leur augmentation favorise l'activité kératinolytique.

Le facteur qui a plus d'influence sur cette activité est la température d'incubation (X_1) (-2,056) suivi par le taux d'inoculum (X_2) (1,880) et enfin Le pH (X_3) (1,260) .

6.2. Effets des interactions

D'après le modèle obtenu, nous remarquons que l'effet d'interaction le plus important est celui entre le couple (X_1 - X_4) correspondant respectivement à la température (X_1) d'incubation et la concentration de la farine avec un coefficient de(+1,29), puis vient celle du couple (X_2 - X_3) correspondant au taux d'inoculum et le pH(+1,17) et après celle du couple (X_1 - X_2) avec(-1,064) correspondant à la température et le taux d'inoculum. Enfin celle du

(X_2 - X_4) (-0,748) correspondant au taux d'inoculum et à la concentration de la farine dans le milieu de culture.

7. Optimisation

Après l'obtention d'un modèle du premier degré par le biais du plan factoriel complet à deux niveaux avec interactions traduisant de manière fiable l'effet de variation des différents paramètres opératoires (la température d'incubation (X_1), le taux d'inoculum(X_2) le pH (X_3) et la concentration de la farine (X_4) sur l'activité kératinolytique de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2, on passe à l'étape de l'optimisation qui consiste à déterminer les valeurs de ces facteurs qui donnent une meilleure activité. 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.

7.1. Recherche de l'optimum

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

$$\hat{y}=11,315-2,056X_1+1,880X_2+1,260X_3-1,064X_1X_2+1,292X_1X_4+1,175X_2X_3-0,748X_2X_4-0,865X_1X_2X_3+0,790X_1X_2X_4-0,782X_1X_3X_4-2,696X_2X_3X_4+1,111X_1X_2X_3X_4.$$

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 MATLEB 10 en traçant l'activité dans le plan X_1 , X_4 (les coefficients d'interactions correspondant sont les plus importants) ; en fixant les variables X_2 , X_3 à différents niveaux.

Pour : $X_2=0$, $X_3=0$.

$$\hat{y}=11,315-2,056X_1+1,292X_1X_4.$$

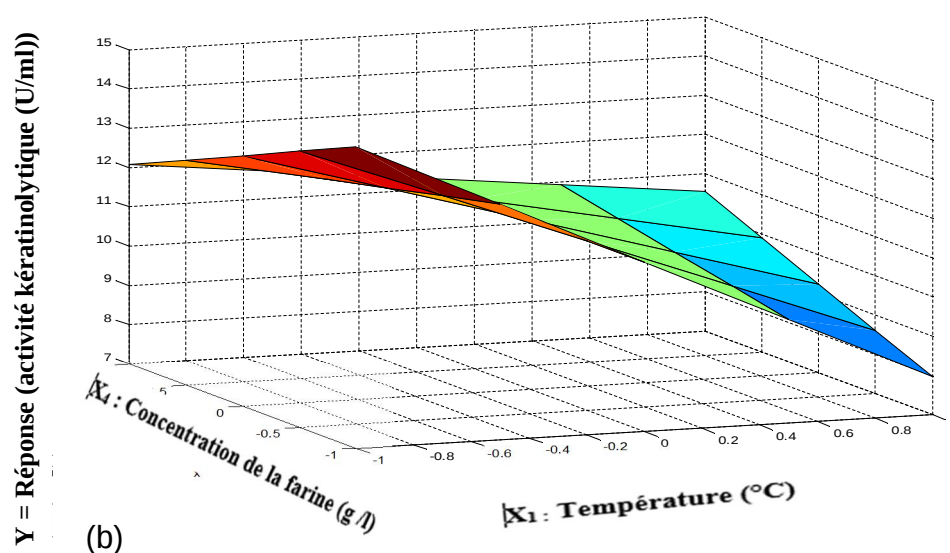
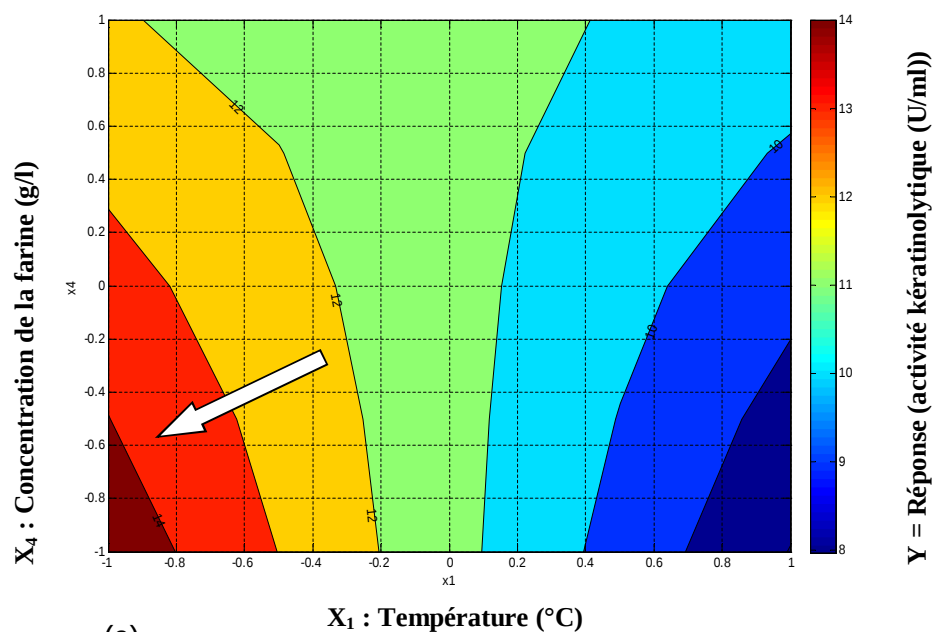


Fig. 16 : (a) Courbe iso réponses et (b) surface de réponse pour : $X_2=0$, $X_3=0$.

L'analyse de la courbe isoréponses (a) montre que l'activité kératinolytique de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2 augmente dans le sens de la diminution de la concentration de la farine dans le milieu (X_4) et de la température d'incubation (X_1) comme il est indiqué par la flèche sur cette courbe.

La surface de réponse correspondante (b) montre qu'une activité maximale de 14 U/ml peut être atteinte pour une température (X_1) comprise entre 34°C et 39,40 °C et une concentration de farine (X_4) entre 15g/l et 17,5g/l.

Pour : $X_2=1, X_3=1$:

$$\hat{y} = 15,63 - 3,985X_1 - 3,444X_4 + 2,411X_1X_4.$$

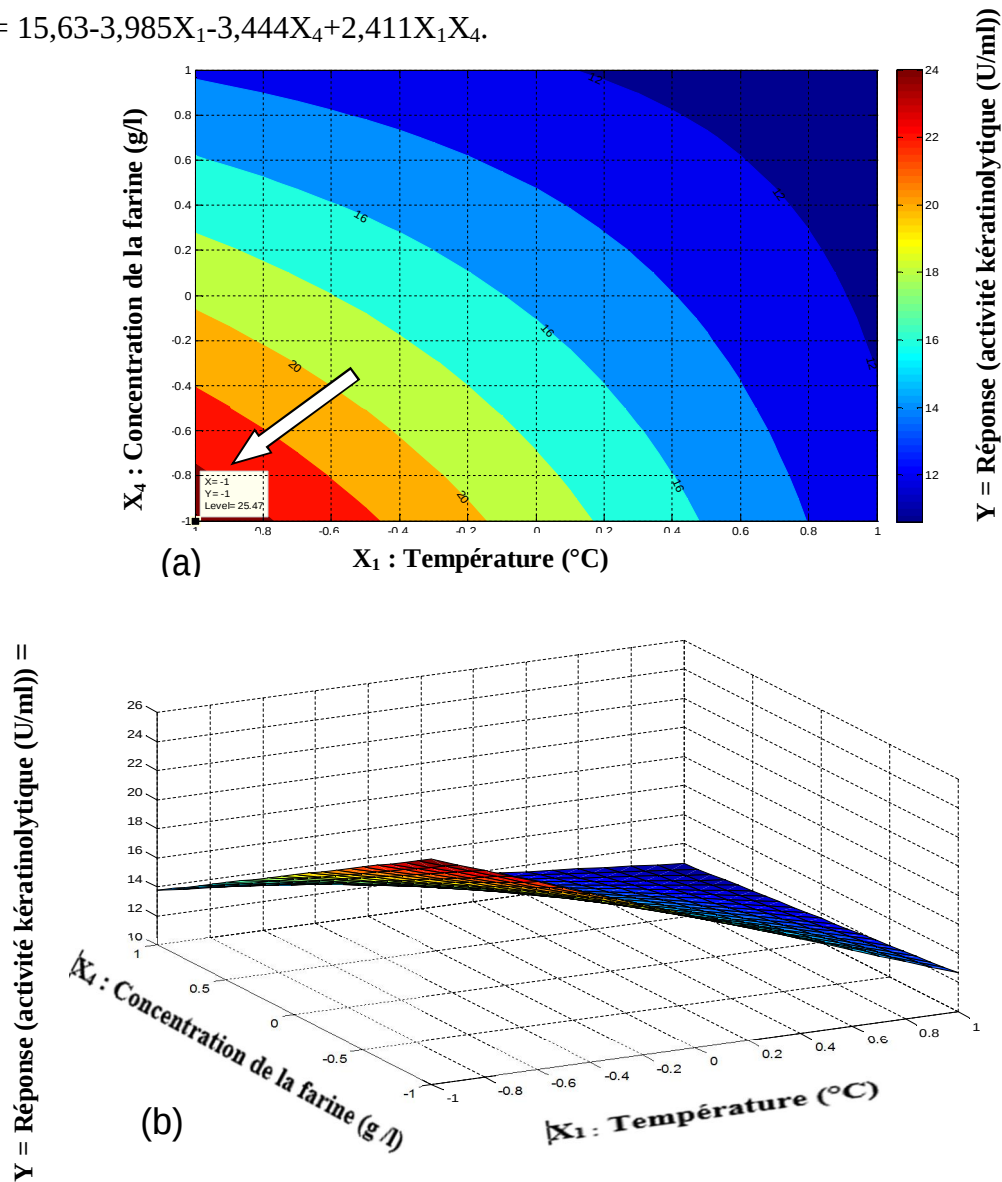


Fig.17: (a) Courbe isoréponse et (b) surface d'isoréponses pour $X_2=1$ et $X_3=1$.

Selon le sens de la flèche indiqué sur la courbe isoréponse (a), l'augmentation de l'activité enzymatique va dans le sens de la diminution de la concentration de la farine (X_4) dans le milieu et de la température d'incubation (X_1).

La surface de réponse correspondante (b) montre qu'une activité de 25 U/ml peut être atteinte pour une température entre 34°C et 34,66°C et concentration de la farine entre 15g/l et 16,1g/l.

Pour : $X_2=-1, X_3=-1$.

$$\hat{y} = 9,35 - 1,857X_1 - 1,948X_4 + 2,395X_1X_4$$

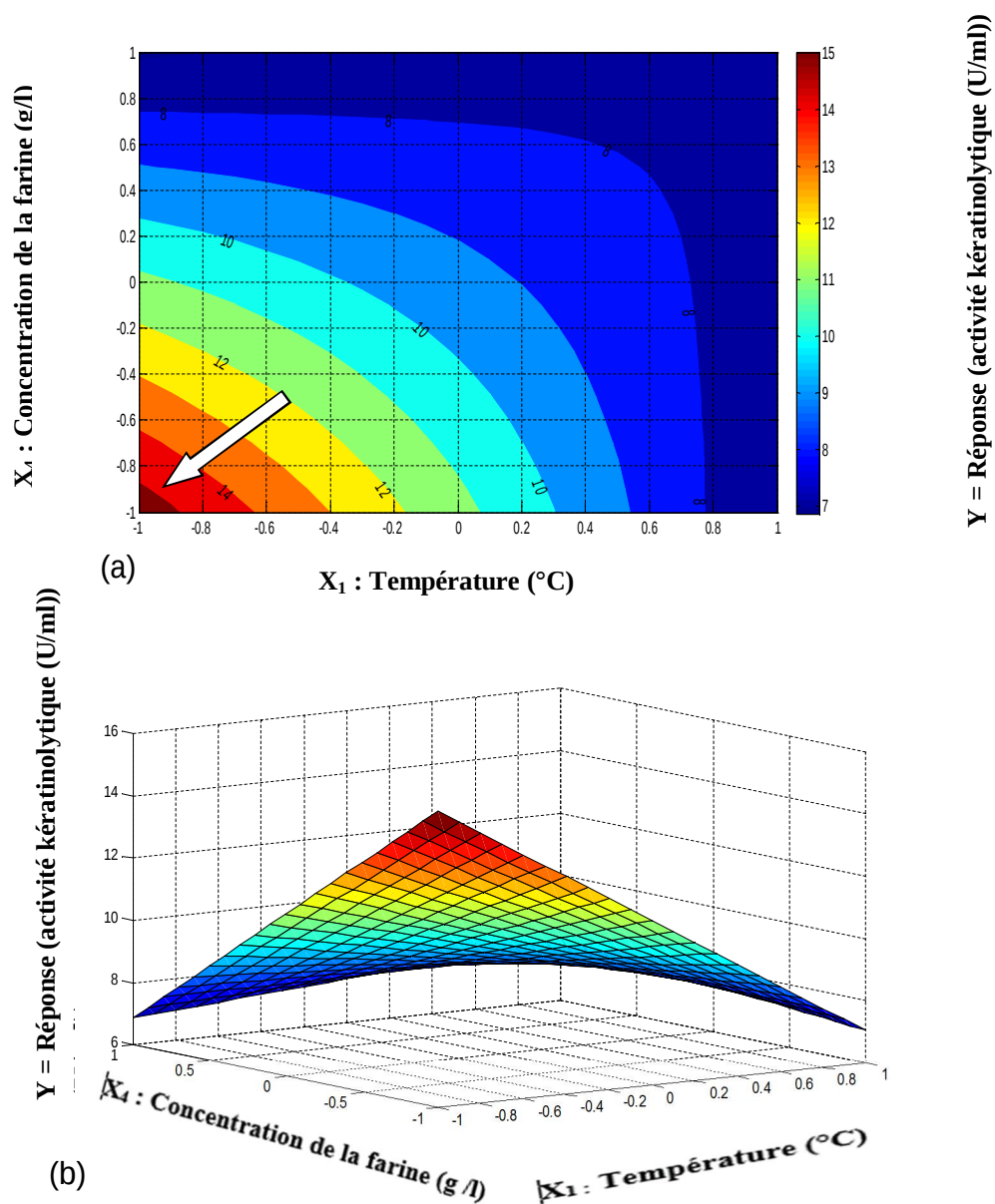


Fig. 18: Courbe isoréponses (a) et surface d'isoréponses (b) pour $X_2=-1$ et $X_3=-1$.

L'analyse de la courbe isoréponse (a) montre que l'activité de la souche augmente dans le sens de la diminution de la concentration de la farine dans le milieu (X_4) et de la température d'incubation (X_1).

La surface de réponse correspondante (b) montre qu'une activité est égale à 15 U/ml peut être atteinte pour une température entre 34°C et 34,3°C et concentration de la farine entre 15g/l et 15,5g/l.

Pour : $X_2=+1$, $X_3=-1$.

$$\hat{y} = 10,76 - 2,985X_1 + 1,948X_4 + 1,753X_1X_4.$$

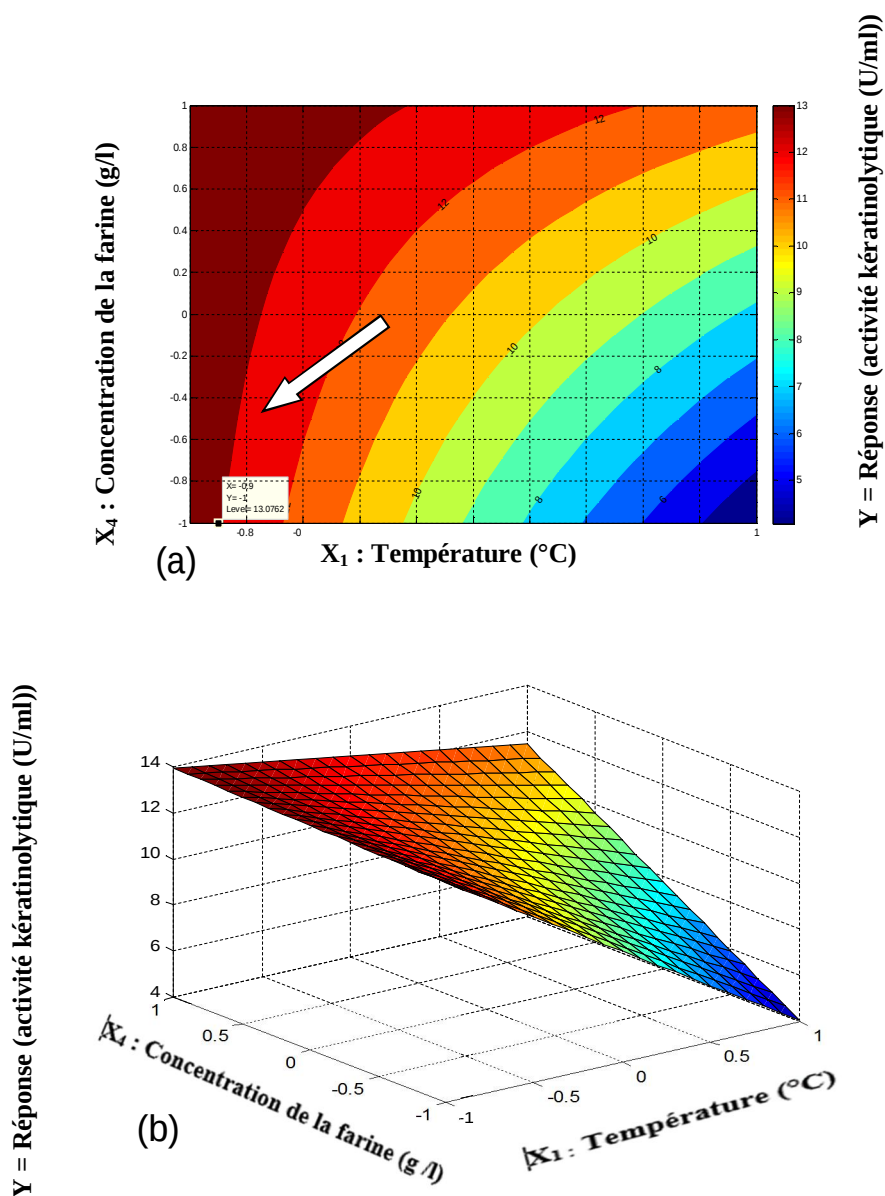


Fig. 19 : (a) Courbe isoréponses et (b) surface d'isoréponses pour $X_2=+1$ et $X_3=-1$

L'analyse de la courbe isoréponse (a) montre que l'activité de la souche augmente pour les concentrations faibles de la farine dans le milieu (X_4) incubés aux températures basses (X_1).

La surface de réponse correspondante (b) montre qu'une activité de 13 U/ml peut être atteinte pour une température entre 34°C et 34,3°C et une concentration de la farine entre 15g/l et 25g/l.

Pour : $X_2=-1$, $X_3=+1$.

$$\hat{y} = 9,52 - 0,127X_1 + 3,444X_4 - 1,391X_1X_4$$

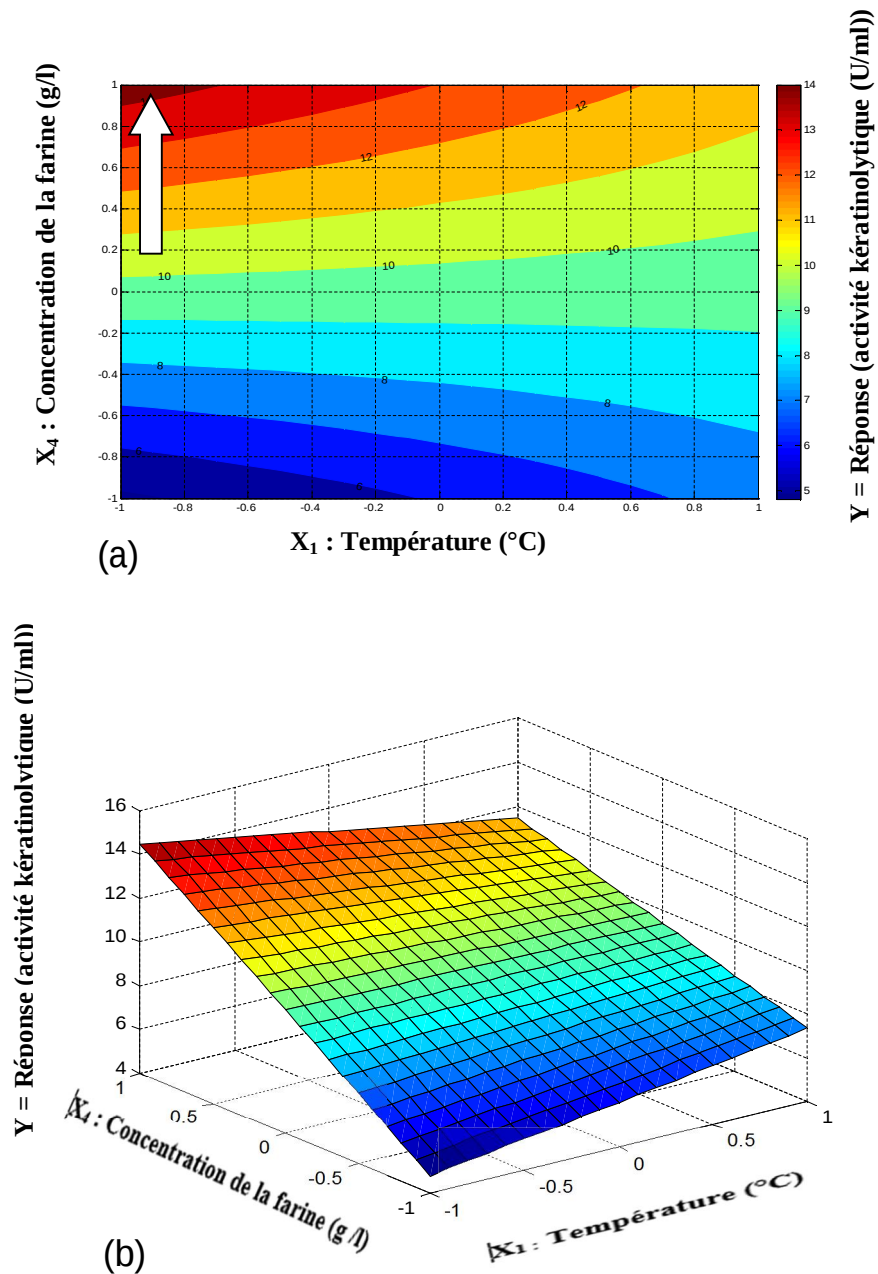


Fig. 20: Courbe isoréponses (a) et surface d'isoréponses (b) pour $X_2 = -1$ et $X_3 = +1$.

L'augmentation de l'activité va dans le sens de d'augmentation de la concentration de la farine dans le milieu (X_4) et de la température d'incubation(X_1).

La surface de réponse correspondante (b) montre qu'une activité de 14 U/ml peut être atteinte à partir d'une température entre 34°C et 34,9°C et une concentration de la farine entre 24 g/l et 25g/l.

En conclusion, on peut dire que l'activité kératinolytique optimale est de 25,47 U/ml ($X_2=1$ et $X_3=1$).

1) Cette activité est atteinte dans les conditions suivantes:

- ✓ Une Température d'incubation X_1 comprise entre 34°C et 34,66°C.
- ✓ Un taux d'inoculation de 4% ($X_2=1$).
- ✓ Un pH de 8 ($X_3=1$).
- ✓ Concentration de la farine (X_4) qui varie entre 15 et 16,1 g/l.

Bach et collaborateur (2012) ont cité dans leur étude que La température de culture affecte significativement la production de *Microbacterium* sp. Kr 10 et les conditions optimales de production de kératinases sont de 25°C, pH initial de 7 et une concentration en farine de plume de 12,5 g/l.

Conclusion et perspectives

L'industrie de la volaille connaît un développement considérable ces dernières années, générant des millions des tonnes de plume comme déchets, Ces derniers sont en majeure partie composés de kératine, une protéine très résistante est stable, et difficile à dégrader. Par conséquent, ces plumes sont jetés aux décharges publiques ou incinérés ce qui provoque des problèmes environnementaux. Pour remédier à ce problème certaines industries ont mis au point des procédés d'élimination des déchets en les valorisant par voie microbienne, ceci permet de générer des farine de plume riches en acides aminés qui peuvent être utilisées comme aliment pour les animaux et / ou comme engrais d'une part et de la kératinases à intérêt pharmaceutique et cosmétique d'autre part.

Dans cette présente étude, on s'intéresse à l'optimisation de la production de kératinases chez la souche *Bacillus atrophaeus* BN2 en utilisant le plan factoriel complet.

Le milieu utilisé pour la production de kératinases est le milieu liquide à base de farine de plume (FBML) à pH 7, contenant la kératine comme seule source de carbone et d'azote.

Afin d'optimiser la production des kératinases, quatre facteurs ont été choisis comme variables : température (X_1), taux d'inoculation (X_2), pH (X_3) et la concentration de la farine (X_4), cette optimisation est réalisée en appliquant la méthode de surface de réponse.

La modélisation par le biais du plan factoriel complet avec interaction a été appliquée, elle a montré que les facteurs Influençant positivement sur l'activité kératinolytique de la souche sont le taux d'inoculation : (X_2) et le pH: (X_3), Cependant les facteurs qui influencent négativement sont : la température : (X_1) et la concentration de la farine : (X_4).

Toutefois l'interaction la plus importante a été marquée pour le couple température et concentration de la farine (X_1 - X_4).

Les concentrations optimales de ces facteurs ont pu être délimitées par le tracé des courbes isoréponses et les surfaces des réponses donnant les valeurs suivantes : température (X_1) varie entre [34°C-34,66°C] et concentration de la farine qui varie entre [15g/l -16,1g/l].

Le modèle linéaire de premier degré obtenu nous a permis de définir les conditions des différents paramètres opératoires et de prédire une activité kératinolytique de 25,47U/ml qui est presque égale à celle obtenue expérimentalement qui est de 25,22 U/ml.

Les résultats de l'optimisation affirment que le modèle est significatif avec des valeurs réelles qui sont très proches de celles prédites, avec un coefficient de corrélation R^2 égale à 0,98.

Il est intéressant de poursuivre les investigations suivantes :

- ✓ Déterminer les interactions existantes entre tous les facteurs du milieu (FBML) afin de comprendre leur effet sur la production.
- ✓ Déterminer et optimiser d'autres facteurs nutritionnels et culturels tels que : les sources de carbones, source d'azote, sources d'ions métalliques, agitation et aération en utilisant les plans d'expériences.
- ✓ Tester d'autres substrats bon marché tels que la laine et les cornes.
- ✓ Purification et caractérisation de la kératinase ou des kératinases produites par la souche *Bacillus atrophaeus* BN2.

Références bibliographiques

A

- ❖ Abidi, F., Limam, F., Nejib, M M., Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: assay as biode detergent. *Process Biochemistry*. (2008); vol. 43, n°11, p. 1202–1208.
- ❖ Amellal, T. (2007) Impacts des rejets de la tannerie megissrie mega de Batna sur oued el gourzi. Thèse de Magister en chimie. Université 20 Août 55 Skikda, Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénierat. 122p.
- ❖ Anbu, P., Gapinath S.C., Hilda A., et al. Optimizations of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresour Technology*. (2007); vol. 98 n°6, p. 1298-1303.
- ❖ Antony J. (2003). *Design of Experiments for Engineers and scientists*. Edition: Butterworth-Heinemann. Grande bruta: 149 p.
- ❖ Aryal, S. (2016.). Biochemical Test and Identification of *Bacillus subtilis*. Accessed from: [http://www.microbiologyinfo.com/biochemical-test-andidentification-of-Bacillus subtilis/](http://www.microbiologyinfo.com/biochemical-test-andidentification-of-Bacillus-subtilis/) (consulté le : 24/05/2018).

B

- ❖ Bach, E., et al. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. *Process Biochemistry*. (2012) ; vol. 47, p. 2455–2462
- ❖ Bas, D., Boyaci, I, H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. (2007); vol. 78, p. 836-845.
- ❖ Benoist, D., Yves, T, S. (1994). *Plans d'expériences: construction et analyse*. Edition: Lavoisier. Paris.
- ❖ Boucherba, N. Valorisation des résidus agro-industriels. (2014), p. disponible sur : http://www.unc.edu.dz/images/polycopie_integrale.pdf. (consulté le 23/05/2018).
- ❖ Bragulla, H., Dominique, H. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*. (2009); vol. 214 n°4, p. 516–559.

- ❖ Brutt, E., Ichida, J, M. Keratinase produced by *Bacillus licheniformis*. (1999). US Patent 5,877,000.

C

- ❖ Cai, C., Zheng, X. Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. (2009); vol. 36 n°7, p. 875–883.
- ❖ Chhimpa, S., Yadav, C.S., John, P.J. Isolation and identification of keratin degrading (keratinolytic) bacteria from poultry feather dumping sites. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences. (2016); vol. 8, p. 109-119.
- ❖ Cui, F., Zhao, L. Optimization of Xylanase Production from *Penicillium* sp.WX-Z1 by a Two-Step Statistical Strategy: Plackett-Burman and Box-Behnken Experimental Design. International Journal of Molecular Sciences. (2012); vol. 13, p.10630-10646.

D

- ❖ Devi, M K., Banu, A R., Gnanaprabhal, G R., et al. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. Indian Journal of Science & Technology. (2008); vol. 1 n°7, p.1-6.
- ❖ Djerou Z. (2006). Influence des conditions d'élevage sur les performances chez le poulet de chair. Thèse de Magister en médecine vétérinaire. Université de Constantine 1, El-khroub, Département des sciences vétérinaires. 112p.
- ❖ Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F., Brandelli, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. International Biodeterioration et Biodegradation. (2009); vol. 63 n°3, p.358-363.
- ❖ Drouin M. (2005). Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire présentée pour l'obtention du grade de Maître des sciences (M.Sc.), Institut national de la recherche scientifique, Québec, 142 p.

E

- ❖ Elie F. La laine de mouton : notions rudimentaires. (2008), disponible sur : <http://fred.elie.free.fr> -page 1/12. (Consulté le 31.05.2018).

- ❖ Essien J.P., Umoh A.A., Akpan E.J., et al. Growth, keratinolytic proteinase activity and thermotolerance of dermatophytes associated with alopecia in Uyo, Nigeria. *Acta Microbiologica Immunologica Hungarica*. (2009) ; vol. 56 n°1, p. 61-69.

F

- ❖ Fakhfakh-zouari, N. (2010). Kératinases de *Bacillus licheniformis* RPK et *Bacillus pumilus* A1 : production, purification, caractérisation et applications biotechnologiques. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Tunisie.
- ❖ FAO. (2015). FAO-STAT. [http : //faostat.fao.org/default.aspx](http://faostat.fao.org/default.aspx), Consulté le 31.05.2018.
- ❖ Farag, M, A., Hassan, A M. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*. (2004); vol. 34 n°2, p. 85–93.
- ❖ Fujiwara, N., tsumiya, t., katada, t. et al. Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme. *Process Biochemistry*. (1989); vol. 24 n°4, p. 155-156.

G

- ❖ Geng, J., Chiron, C., Combrisson, J. Rapid and specific enumeration of viable Bifidobacteria in dairy products based on flow cytometry technology: A proof of concept study. *International Dairy Journal*. (2014); vol.37 n°1, p. 1–4.
- ❖ Godheja, J., Shekhar, K S. Biodegradation of Keratin from Chicken Feathers by Fungal Species as a Means of Sustainable Development. *Journal Bioremediation & Biodegradation*. (2014); vol. 5 n°5, p. 232.
- ❖ Goupy J. (1999). Plans d'expériences pour surfaces de réponses. Edition: Dunod. Paris: 409 p.
- ❖ Goupy, J., Creighton, L. (2001). Introduction aux plans d'expériences. Edition : Dunod. Paris, 12-13p.
- ❖ Goupy J. (2005). Pratiquer les plans d'expériences. Edition : DUNOD. Paris : 501-295 p.

- ❖ Gross, R P. Water soluble compounds (non-keratins) associated with the plumage of the pigeon (*Columbia livia*). Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science. (1956); vol. 34 n°1, p. 65-70.
- ❖ Gradišar, H., Friedrich, J., Križaj, I., et Jerala, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. Applied and environmental Microbiology. (2005); vol. n°71 7, p.3420-3426.
- ❖ Gupta, R., Ramnani, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Applied Microbiology and Biotechnology. (2006); vol. 70 n°21, p.21-33.
- ❖ Gupta, R., Sharma, R., Beg, Q K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. Critical Reviews in Biotechnology. (2013); vol. 33 n°2, p. 216 - 228.

H

- ❖ Habbeche A. (2014). Purification et caractérisation d'une kératinase thermostable KERAK-29 chez une nouvelle souche d'Actinomycète. Thèse de doctorat de biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar, Faculté des sciences, Annaba, 120 p.
- ❖ Haines R J(2004). Ferme à la fourchette une stratégie intégrale pour la salubrité des viandes en Ontario. Toronto, Imprimeur de la Reine pour l'Ontario. 654p.

J

- ❖ Jacques C. (2003). Etude de la valorisation des déchets d'origine kératinique par voie thermo-mécano-chimique en vue de l'obtention de filaments continus : cas spécifique de la laine. Thèse de doctorat en Sciences des Agroressources. Toulouse, L'institut national polytechnique de Toulouse. 279p.
- ❖ Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., et *al.* Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. Journal of Food Science and Technology. (2012); vol. 49 n°3, p. 278–293.
- ❖ Joshi, S. G., Tejashwini, M., Revati, N., et *al.* Isolation, identification and characterization of a feather degrading bacterium. International Journal of Poultry Science. (2007); vol. 6 n°9, p.689–693.

K

- ❖ Kanagasabai , V., Tangavelu, V. Response surface Methodological Optimization of the medium components for production of xylanase under SSF by *Aspergillus fumigatus*. Journal of Advanced Sciences and Research. (2013); vol. 4 n° 2, p.13-20.
- ❖ Kannappan, S., baahrathi, D. technology and management. Exploration on amino acid content and morphological structure in chicken feather fiber. Journal of Textile and Apparel. (2012); vol. 2 n° 7. 3, p.1-6.
- ❖ Lopes, F, C., Silva, L, A., Tichota, D, M.,et *al.* Production of Proteolytic Enzymes by a Keratin-Degrading *Aspergillus niger*. Enzymes Resarch. (2011); vol. 2011, p.9

M

- ❖ Marcondes, N, R., Taira, C, L., vandresen, D, C., et *al.* New Feather-Degrading Filamentous Fungi. Microbial Ecology. (2008); Vol. 56 n° 1, p.13-17.
- ❖ Mitu A. (2004). Damage assessment of human hair by electrophoretical analysis of hair proteins. Thèse de doctorat, Université de Cidade de São Paulo, Brésil. 103p.

N

- ❖ Nilegaonkar S.S., zambare V.P., kanekar P.P., et *al.* Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCMB-326. Bioresource Technology. (2007) ; Vol. 98, p. 1238-1245.
- ❖ Nouad, M. (2011). Étude technicoéconomique de projets de valorisation/gestion de déchets liés à la filière avicole en Algérie. Gtz-REME. 58 p.

O

- ❖ Onifade, A, A., A1-Sane, N, A. Ai-musallam, A, A. et *al.* A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. Bioresource Technology. (1998); vol. 66, p.1-11.
- ❖ Oscar, M, A., Chamoro, S, A., Agustín, B. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding. Food Research International. (2015); vol. 73, p. 204–212.
- ❖ Ozil P. (1997). Plans d'expériences: Méthode de TAGUCHI. E.N.S d'électrochimie.

P

- ❖ Park, G.T., Son, H.-J. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather degrading mesophilic bacterium. *Microbiological Research*. (2009); vol.164 n°4, p.478–485.
- ❖ Pandey A., Sangeeta N., Carlos R S. (2017). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Edition: Elsevier. 447-469p.
- ❖ Pillai, P., Mandge, S., Archana, G. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. *Process Biochemistry*. (2011); vol. 46 n°5, p.1110–1117.
- ❖ Priya, P., Archana, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel streptomyces isolate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (2008); vol. 78 n° 4, p. 643-50.

ℛ

- ❖ Rai, S. K., Mukherjee, A. K. 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*. (2010); vol. 48 n°2, p.173–180.
- ❖ Rao, M, B., Tanksale, A, M., Ghatge, M, S., et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. (1998); vol. 62 n° 3, p.597–635.
- ❖ Riffel, A., Lucas, F., Brandelli, A., et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Archives of Microbiology*. (2003); vol. 179 n°4, p.258–265.
- ❖ Riffel, A., Brandelli, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology*. (2006); vol. 37, 395–399.
- ❖ Rouse, J, G., Van Dyke, M, E. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*. (2010); vol. 3 n°2, p. 999-1014.

ℳ

- ❖ Saha, S. (2009). *Exploration of Keratinolytic Actinobacteria for the Bioconversion of Poultry Feather Waste into Poultry Feed Supplement*. Thèse de doctorat en microbiologie. Inde, Bharathiadasan University. 142p.
- ❖ Sahoo, D, K., Das, A., Thatoi, H., et al. Keratinase Production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged

fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (2012); vol. 167 n°5, p. 1040-1051.

- ❖ Selvam, K., vishnupriya, B. Biochemical and Molecular Characterization of Microbial Keratinase and Its Remarkable Applications. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. (2012); vol. 3 n°2, p. 267-275.
- ❖ Shih, J, C. recent development in poultry waste digestion and feather utilization – a review. *Poultry Science*. (1993); vol. 72 n°9, p.1617–1620.
- ❖ Suh, Hyung Joo., Lee, Hyo Ku. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *Journal of Protein Chemistry*, (2001); vol. 20 n°2, p.165-169.

$\mathcal{T}$

- ❖ Thys, RCS; Lucas, FS; Riffel, A., et *al.* Characterization of a protease of a feather-degrading Microbacterium species. *Letters Applied in Microbiology*, (2004); vol. 39 n°2, p. 181–186.
- ❖ Tom sinoy, E, S; Chavan, P, B; Patre, P, R. Isolation and Identification of Feather Degradable Microorganism. *Technical and non-Technical Journal*. (2011); vol. 2 n°3, p.128-136.

$\mathcal{V}$

- ❖ Van raamsdonk, L, W, D., Vancutsem, j., Zegres, J., et *al.* The microscopic detection of animal proteins in feeds. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*. (2004); vol.8 n° 4, p.241- 247.
- ❖ Vignardeta, C., guillaume, Y, C., Michel, L., et *al.* Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *International Journal of Pharmaceutics*. (2001); vol. 224 n°1, p. 115-122.

$\mathcal{W}$

- ❖ Wakil, S.M., Dada, M, T., Onilude, A, A. Isolation and Characterization of Keratinase-Producing Bacteria from Poultry Waste *Journal of pure and applied microbiology*. (2011); Vol. 5 n°2, p.5-8.
- ❖ Williams, C, M., Lee, C, G; garlich, J, D., et *al.* Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate as a feed protein. *Poultry Science*. (1991); vol. 70. n°1, p.85–94.

- ❖ Williams, C, M., Richter, C., Mackenzie, J., et *al.* Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Applied and environmental Microbiology*. (1990); vol. 56 n°6, p.1509–1515.

Annexes

Annexe I : Matériel utilisé

- Balance (Adventurer) (RADWAG).
- Bain Marie agitateur (Memmert).
- Bain Marie (Julabo).
- Centrifugeuse (BEIJING ERA BEI LI CENTRIFUGE CO, LTD).
- Etuve (Memmert).
- pH-mètre (BANTE).
- Spectrophotomètre (RAYLEIGH UV 1800).
- Spectrophotomètre (SHIMADZU UV mini 1240).
- Rotavapeur (Buchi Rotavapor R-114).
- Plaque chauffante agitatrice (VELP SCientifica, Trade Raypa).
- Vortex (VELP scientifica référence : ZX3).

Annexe II :

Composition des milieux des cultures en (g/l), autoclavés à 121°C/ 16min.

Milieu de culture à Base de Farine de plumes (FBM) (Williams et *al.*, 1990).

- Farine de plume5g
- K₂HPO₄0.25g
- MgSO₄(7H₂O) 0.125g
- CaCO₃ 0.75g
- FeSO₄(7H₂O)0.25g
- NaCl..... 0,125g
- Agar.....5g
- Eau distillée.....250ml
- pH.....7,2

Milieu de Gélose Nutritive au Lait (GNL) : pour 1litre du milieu :

- Peptone.....5g
- Extrait de levure.....3g
- Eau distillée.....750ml
- Lait écrémé stérile250ml
- Agar..... 15g
- pH 7,2

L'autoclavage est effectué à 121°C pendant 16min.

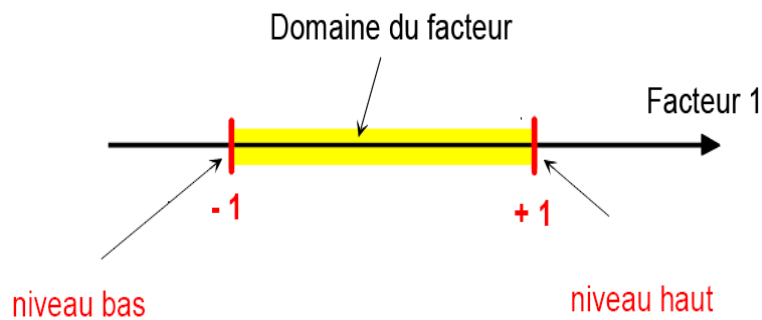
Eau Physiologique :

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) Dilué à 9 pour 1000 ml.

- NaCl09 g
- Eau distillée.....1 L

Annexe III :

1. Domaine d'un facteur



2. Domaine d'étude

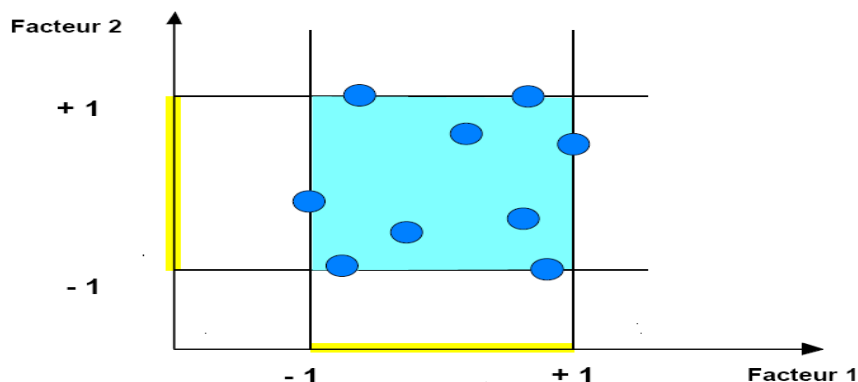


Figure a. 2 : Domaine d'étude

Annexe IV :

Les solutions utilisées.

Solution tampon tris HCl (0,05 M) :

Trishydroxyméthylaminométhane (tris) présente une masse molaire de 121,14 g/mol a servi pour la préparation de 250 ml du tampon tris HCl à 0,05 M, par le mélange de 1,5 g de tris dans 250 ml d'eau distillé et ajusté avec l'acide chlorhydrique HCl jusqu'à l'obtention d'un pH 8.

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

Pour la préparation de 200 ml d'hydroxyde de sodium qui présente une masse molaire de 40 g/mol, 0,4 g du NaOH sont dissouts dans 200 ml d'eau distillé suivi d'une agitation vigoureuse. Le pH est 12.

Solution hydroxyde de sodium Noah à (1N) :

- On pèse 4g de NaOH (40g /mol)
- On le met dans un erlen Mayer contient 50 ml de l'eau distillée, on mélange un bon moment puis on remplit jusqu'à 100 ml.

Solution acide chlorhydrique à (1N) :

On prend 8.28 ml du HCl (37%) et on dilue avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 ml de la solution acide à 1N.

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

L'acide trichloracétique (TCA) avec une mass molaire de 163,39 g/mol dont 16,338 Sont dissouts dans 250 ml d'eau distillé et mélangés vigoureusement.

Annexe V:

Tableau I : 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

Annexe VI :

Tableau II : Table de Fisher (Goupy, 1991 et Ozil, 1997)

Valeurs des 95 nièmes centiles (niveaux 0.05) F0.95 pour la distribution F

V_1 → $V_1 \downarrow$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	∞
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
∞	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

L'activité protéolytique de la souche *Bacillus atrophaeus* BN2 est testée sur milieu gélosé à base de lait écrémé et l'activité kératolytique est mesurée sur milieu liquide à base de farine de plumes (FBML). L'optimisation de la production enzymatique est réalisée moyennant un plan d'expérience de premier degré en choisissant quatre facteurs à savoir la température d'incubation, le taux d'inoculum, le pH et la farine de plume. Les résultats obtenus ont confirmé le fait que la souche est productrice de kératinaseS (20 U/ml), elle exhibe également une activité protéolytique sur milieu gélosé. La production de kératinases est maximale (25,47 U/ml) à une température d'incubation comprise entre 34°C et 34,66°C, à un taux d'inoculum de 4%, à un pH de 8, et à une concentration de farine de plumes qui se situe entre 15 et 16,1 g/l.

Les mots clés : *Bacillus atrophaeus* BN2, farine plume, kératinase, optimisation, plan d'expériences.

Abstract

The proteolytic activity of the *Bacillus atrophaeus* BN2 strain is tested on agar medium based on the skimmed milk and the keratolytic activity is measured on liquid medium based on feather meal (FBML). The optimization of the enzymatic production is carried out by means of a first-level experimental design by choosing four factors: incubation temperature, inoculum rate, pH and concentration of the feather meal. The obtained results confirmed that the strain is keratinase-producing (20U / ml), it also exhibits a proteolytic activity on agar medium, the production of keratinases is maximal at an incubation temperature 34 °C to 34 ,66 °C, at an inoculum rate of 4%, at pH value of 8, and at a feather meal concentration of 15 to 16.1 g / l.

Key-words: *Bacillus atrophaeus* BN2, feather meal, keratinase, optimization, experimental design.