

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

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



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

MASTER

Thème

**Optimisation statistique de la production de
kératinases chez une souche d'actinomycètes
locale**

Présenté par :
RAHMANI Rania & AID Nabila

Soutenu le : 30 septembre 2021
Devant le jury composé de :

Mme BOUDERIES-SOUAGUI Samiha
Mme DJINNI Ibtissem
Mme BOUCHERBA Nawel

MCB	Examinatrice
MCA	Présidente
Professeur	Encadreur

Année universitaire : 2020/2021

Dédicaces

Avec tout respect et amour, je dédie ce modeste travail à mes chers parents, aucune dédicace ne saurait exprimé mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours.

À la mémoire de mes grands parents paternels et grand-mère maternelle, que dieu les accueille dans son vaste paradis.

À mon chère frère Anis pour son encouragement.

À mes sœurs adorables Khaoula et Tina, Pour leurs encouragements permanents, leur soutien moral, tendresse et amour.

À mon binôme Nabila ainsi que sa famille.

À tout mes enseignants depuis le primaire.

À tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

À tous ceux qui me sont chers.

Rania

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mon très cher papa qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans ma vie que Dieu te protège pour moi mon cher ange.

A ma chère maman, qui restera une couronne sur ma tête avec sa protection, sa préservation et sa supplication, j'ai obtenue ce succès et je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

A mes frères et leurs femmes (Saïd et Lamia, Mehmed et Samia, Nourdinne et Salima, Bilal et Saida) et mes sœurs et leurs maris (Ibtissam et Fares, Malia et Djamai, Farida, Yasmina et Mohemed).

A tous mes chers neveux et nièces.

A mes très chères amies (Najet, Salma, Amal, Lyliã, Meryem et Katia).

A toute la famille AID (les cousins et les cousines, les tantes et les oncles) tous mes proches et mes connaissances.

A ma chère collègue Rania, je lui souhaite que des succès.

Nabila

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 Mme **Djinni Ibtissem** de nous avoir fait l'honneur et un immense plaisir de présider le jury de notre soutenance.*

*A notre examinatrice Mme **Bouderies née Souagui Samiha** pour avoir accepté d'évaluer notre travail.*

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciement à :

*Notre promotrice Mme **Boucherba Nawel** qui a accepté 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 cher coencadreur Mr **Hamma Samir** qui nous a permis de réaliser une partie de ce travail, pour son soutien, son aide, ses conseils et sa sympathie.*

*Nos remerciements vont également Melle le docteur **Azzouz Zahra** ainsi Mr **Benhoula Mohammed**.*

*On tient aussi à remercier toute l'équipe de recherche de laboratoire **LM^A**, et toute la faculté **SNV** et à tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici notre profonde reconnaissance.*

Rania et Nabila

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité sur les actinobactéries	3
I.1 Définition écologie et caractères généraux	3
I.2. Taxonomie et cycle de développement des actinobactéries	3
I.2.1. Taxonomie et critères de classification.....	3
I.2.2 Cycle de développement des actinobactéries.....	5
I.3 Applications biotechnologiques des actinobactéries.....	6
II. kératinases	7
II.1 Définition et mode d'action.....	7
II.2 Classification et sources des kératinases.....	8
II.2.1 Classification des kératinases	8
II.2.2 Sources microbiennes de kératinases	10
II.3. Applications industrielles des kératinases :.....	10
III. Quelques paramètres influençant la production de kératinases.....	11
III.1 Facteurs abiotiques influençant la production de kératinases.....	11
III.1.1. pH	11
III.1.2. Temps d'incubation.....	12
III.1.3. Température.....	12
III.2. Facteurs nutritionnels influençant la production de kératinases.....	12
III.2.1. Source de carbone.....	12
IV. Kératines.....	13
IV .1 Définition des kératines.....	13
IV .2 Source de la kératine.....	13

V. Plans d'expériences	14
V.1 Plan Box-Behnken.....	16

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel.....	17
I.1. Matériel biologique.....	17
I.2. Matériel analytique.....	17
II. Méthodes.....	17
II.1. Préparation du milieu de culture et du matériel biologique.....	17
II.1.1. Préparation du milieu de culture liquide Feather Broth Medium (FBM).....	17
II.1.2. Revivification de la souche ES41.....	18
II.2. Détection de l'activité protéolytique et kératinolytique sur milieux solides (Test semi-quantitatif).....	18
II.2.1 Test d'activité protéolytique	18
II.2.2 Test d'activité kératinolytique.....	19
II.3 Préparation des suspensions sporales et dénombrement.....	19
III. Production de kératinases	19
III.1. Dosage de l'activité kératinolytique	19
III.2. Préparation de la solution du substrat kératinique tamponnée	19
III.3. Incubation enzymatique	20
IV. Optimisation de la production de kératinases par plan d'expériences.....	20
V. Test de validité du modèle statistique.....	22

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Revivification de la souche ES41	24
---	----

I.1 Aspect de la Farine de plumes.....	24
I.2 Aspect macroscopique de la souche ES41 sur milieu solide à base de farine de plumes.....	24
II.3. Résultats du test d'activité protéolytique et kératinolytique sur milieux solides.....	25
III. Optimisation de l'activité kératinolytique de la souche ES41 par utilisation du plan Box-Behnken.....	26
III.1 Analyse de la variance pour la production de kératinases (ANOVA).....	28
III.2 Modèle mathématique de régression.....	30
III.3 Effets d'interaction	31
III.3.1 Interaction entre la température et la source de carbone.....	32
III.3.2 Interaction entre le pH et la source de carbone	32
IV. Test de signification de la régression.....	33
IV.1 Coefficient de détermination R^2	33
IV.3 Analyse des résultats.....	33
V. Validation du modèle.....	35
Conclusion et perspectives.....	37

Références bibliographiques

Annexes

Résumé / Abstract

Liste des abréviations

- DMSO.....Diméthylsulfoxyde.
- FBMS..... Milieu solide à base de farine de plumes.
- FBML.....Milieu liquide à base de farine de plumes.
- GNL..... Gélose nutritive au lait écrémé.
- DO.....Densité optique.
- GC %Pourcentage en Guanine – Cytosine.
- Rpm.....Rotations par minute.
- UV.....Ultra violet.
- RSM.....Reponse Surface Methodology.
- g :.....Gravité.
- UI..... Unité international.
- TCA.....Trichloracétique Acid.
- mm.....Millimètre.
- V/V.....Volume par Volume.
- HCl.....Chlorure d'hydrogène.
- BBD..... Box-Behnken Design.
- LOF..... Lack of Fit

Liste des figures

Figure N°	Titre de la figure	Page
1	Cycle de vie des Streptomyces	6
2	Applications biotechnologiques des actinobactéries	7
3	(a) Schéma montrant le mode d'action des kératinases sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures.	8
4	Schéma représentatif de différentes applications biotechnologiques des kératinases.	11
5	Schéma illustrant le plan Box-Behnken à 3 facteurs (Box et Behnken, 1960)	16
6	Plumes blanches à l'état brut	18
7	Plumes séchées	18
8	Farine de plumes obtenue après broyage	24
9	Aspect de la souche d'actinomycète sur milieu solide FBMS	24
10	Test d'activité protéolytique de la souche ES41 sur milieu à base de caséine	25
11	Test d'activité kératinolytique de la souche ES41 sur milieu à base de farine de plumes.	26
12	Surface de réponse définissant l'effet d'interaction entre la température et la concentration en source de carbone.	31
13	Surface de réponse définissant l'effet d'interaction entre le pH et la source de carbone	32

Listes des tableaux

Tableau N°	Titre des tableaux	Page
I	Classification des kératinases.	9
II	Concentration des acides aminés en grammes par Kg de plumes.	14
III	Valeurs numériques des facteurs étudiés dans leur domaine de variation.	21
IV	Matrice d'expériences donné par le plan « Box Behnken » pour l'optimisation de la production des kératinases de la souche ES41 en unités numériques.	22
V	Matrice d'expériences et de réponses donnés par le plan Box-Behnken Design dans le cadre de l'optimisation de l'activité kératinolytique de la souche ES41.	27
VI	Analyse de variance et estimation des coefficients de régression du modèle polynomiale de second degré et analyse de modèle.	29
VII	Valeurs du coefficients du modèle de régression	30
VIII	Valeurs du coefficient de détermination R^2	33
IX	Résultats des valeurs réelles obtenues et prédites par données par le plan Box-Behnken Design	34
X	Conditions optimales pour une meilleure production de kératinases proposée par le modèle BBD	35
XI	Les valeurs prédites et les résultats des valeurs réelles de validation de test.	35

Introduction

En Algérie, les plumes de volaille essentiellement celles du poulet sont produites en grandes quantités par les abattoirs et les tueries. L'accumulation de ces dernières présente des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé publique.

Ces sous produits qui constituent ; cependant, une source potentielle de biomasse en raison de leur teneur élevée en matière organique, peuvent être valorisés par différentes voies et appliqués dans divers domaines biotechnologiques. L'hydrolyse des kératines de plumes s'effectue par des enzymes appelés kératinases de la classe EC334 des hydrolases. Ces biocatalyseurs sont majoritairement produits par des microorganismes doués de capacité à dégrader les plumes, la laine, les cheveux, les cornes, et les sabots d'animaux avec un haut degré de spécificité et convertis en produits utiles à haute valeur ajoutée. **(Antranikian et al., 2009)**

Parmi ces microorganismes, les actinobactéries représentent un groupe important de producteur de kératinases. Ces bactéries jouent un rôle important dans la décomposition, la minéralisation et l'hydrolyse de la kératine de plumes **(Ignatova et al., 1999)**. Les actinobactéries thermophiles offrent des avantages par rapport aux souches mésophiles dans l'accumulation accélérée de la biomasse et la production d'enzymes thermostables capables de dégrader de nombreux composés organiques, grâce à leur stabilité et leur capacité d'hydrolyse à haute température **(Brandelli, 2005)**.

Par ailleurs, la production microbienne des kératinases est influencée par divers facteurs environnementaux et nutritionnels. La maîtrise de ces derniers pour une meilleure production de ces molécules est d'une très grande importance. Cependant, les procédés classiques fréquemment utilisés pour la détermination et l'optimisation de ces paramètres sont lents, coûteux et s'avèrent souvent insuffisants car les interactions entre les différents facteurs sont négligées. Pour cela, des méthodes statistiques utilisant des plans d'expériences sont préconisées. **(Goupy, 2006)**

Notre étude s'inscrit dans cette optique en fixant comme objectifs la détermination et l'optimisation de quelques paramètres influençant la production de kératinases par une souche d'actinobactérie en utilisant des plans d'expériences.

Notre travail s'organise autour de trois parties :

La première partie fait état des connaissances existantes sur les actinobactéries et de leurs capacités à produire des kératinases ainsi que des notions fondamentales relatives aux plans d'expériences.

La deuxième partie expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre pour la détermination et l'optimisation des paramètres influençant cette production ainsi que la modélisation de l'activité kératinolytique par le biais de la méthode des plans d'expériences.

La troisième partie retrace et discute les résultats obtenus au cours de cette étude.

Synthèse

Bibliographique

I. Généralités sur les actinobactéries

I.1 Définition, écologie et caractères généraux

Les actinobactéries sont des procaryotes, pour la plupart à structure filamenteuse dont la croissance centrifuge donne lieu à des colonies circulaires. Elles sont à Gram positif et présentent un GC% supérieur à 55% (Sanglier et Trujillo, 1997). Elles sont généralement saprophytes et largement distribués dans les sols «Telluriques» et les eaux douces (Goodfellow et O'Donnelle, 1989). La plupart sont mésophiles ayant une température optimale de croissance allant de 25°C à 30°C (Goodfellow et Williams, 1983). Cependant il existe des espèces thermophiles qui peuvent croître à des températures allant de 55°C à 65°C (Rangaswami et al., 2004). La plupart des actinomycètes sont immobiles, chimioorganotrophes et certaines sont chimioautotrophes (Mariat, 1990).

I.2. Taxonomie et cycle de développement des actinobactéries

I.2.1. Taxonomie et critères de classification

Les actinobactéries sont classés actuellement dans le règne des *Procaryotae*, le phylum des *Actinobacteria* et la classe des *Actinobacteria* également.

Cependant, l'ordre des *Actinomycetales* a été subdivisé en plusieurs ordres (*Actinomycetales*, *Streptomycetales*, *Streptosporongiales*, *Micromonosporales*, *Micrococcales*, etc). L'ordre des *Actinomycetales* actuellement est un petit ordre regroupent peu de genres, dont *Actinomyces*. Ce dernier représente le genre anaérobie strict et pathogène pour l'homme. Les *Actinobacteria* sont classées, depuis 2012, dans 15 ordres, 43 familles et 203 genres (Goodfellow et al., 2012 in Bergey 's Manual, 2012).

La systématique des actinobactéries est basée actuellement sur des critères morphologiques, physiologiques, et génétiques.

➤ Critères morphologiques, physiologiques et chimiotaxonomiques

Les critères morphologiques font appel aux caractéristiques macromorphologiques sur différents milieux de culture ISP et aux caractéristiques micromorphologiques par observations microscopiques optiques et électroniques.

Pour les caractéristiques culturales il s'agit de noter :

- La présence ou l'absence de mycélium aérien ;
- La couleur du mycélium aérien et du mycélium de substrat ;
- La production et la couleur des pigments diffusibles ;
- La production ou non de pigments mélanoides.

❖ Les couleurs sont souvent déterminés grâce à l'utilisation de chartes de couleurs.

Pour les caractéristiques micromorphologiques : il s'agit de noter :

- La fragmentation ou non du mycélium du substrat ;
- La formation de spores exogènes sur le mycélium du substrat et le mycélium aérien (forme, taille, et mode d'agencement) ;
- La présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse, ou chevelue) ;
- La présence ou absence de sporanges sur le mycélium aérien et le mycélium de substrat ;
- La présence de spores mobiles ;
- La formation d'endospores. (Nouredine, 2006 ; Boudjella, 2007)

L'étude physiologique des actinomycètes consiste en des tests de dégradation de différents composés (glucides, lipides, protéines, polymères complexes, stéroïdes ...), des tests de résistance aux différents agents chimiques (antibiotiques, chlorure de sodium, divers autres agents chimiques), la tolérance au pH, à la température, à la salinité. Le nombre élevé de tests physiologiques et la difficulté d'exploitation des résultats a amené les systématiciens à appliquer la taxonomie numérique aux actinomycètes (Goodfellow *et al.*, 1990).

Cette méthode de classification développée à la fin des années 1950 tient compte de l'ensemble des caractères du microorganisme. Elle consiste à utiliser un grand nombre de

caractères physiologiques et biochimiques, tous considérés d'égale importance, et permet de définir des pourcentages de similarité entre les organismes grâce à l'utilisation de coefficients de Jaccard. Plusieurs groupes ou «cluster» sont ainsi formés suivant les ressemblances des souches définies par un indice de similarité (**Sneath, 1989**).

L'étude chimiotaxonomique consiste en analyse de la composition chimique de la paroi cellulaire des actinomycètes. Il s'agit en l'occurrence de déterminer la composition en acides aminés DAP, en glucides et en lipides pariétales. C'est un outil pratique dans la détermination des genres actinobactériens (**Stanek et Roberts, 1974 ; Lechevalier et al., 1977**).

➤ Critères moléculaires et génétiques

Depuis que la biologie moléculaire a fait son apparition, vers le début des années 1980, les tests de routine commençaient lentement à être remplacés par des techniques moléculaires.

Parmi les principales techniques moléculaires utilisées en taxonomie, nous citerons l'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr16S), l'hybridation ADN-ADN, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%), ainsi que l'analyse des séquences des protéines ribosomiques.

Le séquençage de l'ADNr 16S constitue un outil très rapide et performant pour l'identification de taxa. Cependant il faut noter qu'un taux d'homologie compris entre 97% et 100% n'indique pas nécessairement que l'espèce soit identique.

L'hybridation ADN-ADN est indispensable pour l'identification définitive d'une espèce quand les séquences de l'ADNr 16S ont des similarités supérieures au pourcentage de seuil de la détermination de nouvelle espèce, cette technique consiste à estimer le taux de l'hybridation de l'ADN d'un taxon avec celui des espèces les plus proches (**Weiyne et al., 1987**).

La détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%) appelé aussi coefficient de Chargaff est un critère efficace dans la taxonomie bactérienne. Chez les actinobactéries le pourcentage de guanine-cytosine (GC%) est supérieure à 55% (**Prescott et al., 2010**).

I.2.2 Cycle de développement des actinobactéries

Le cycle de développement des actinobactéries débute par la germination des spores

donnant naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes. Sur ce mycélium primaire dit de substrat se développera ensuite un mycélium aérien. Le mycélium aérien ou végétatif développé forme des sporophores qui s'étendent verticalement vers la surface au-dessus de la colonie. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uni nucléées, et un autre cycle commencera. La figure 1 retrace les principales étapes du cycle de croissance des actinobactéries (**Barka *et al.*, 2016**).

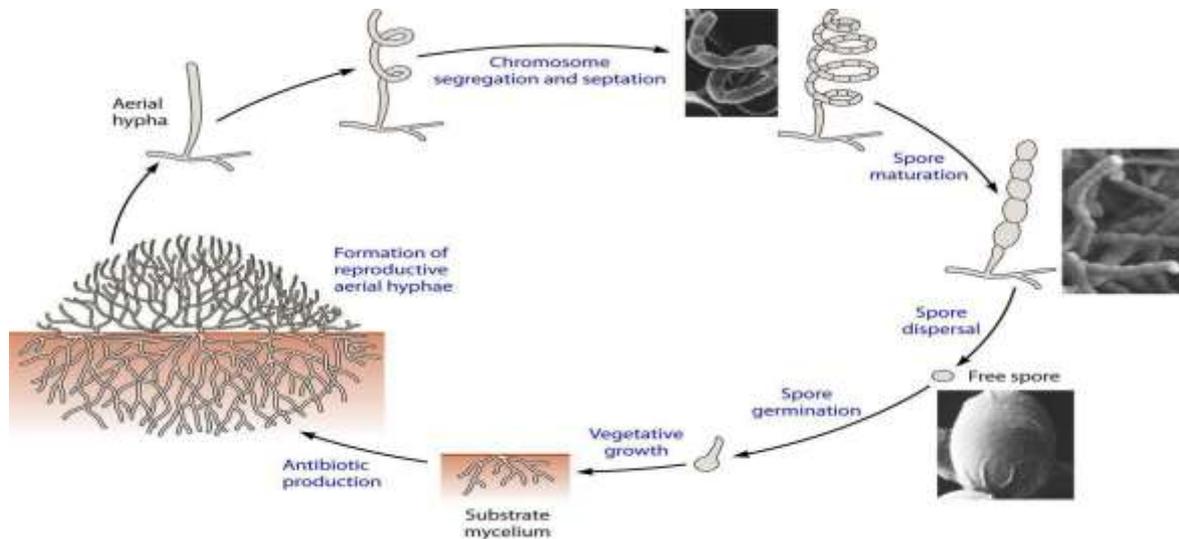


Figure : 1 Cycle de développement du genre *Streptomyces* sur milieu solide (**Barka *et al.*, 2016**).

I.3 Applications biotechnologiques des actinobactéries

Les actinobactéries, connues pour leur importance dans la production de métabolites primaires et secondaires présentent des applications multiples dans divers domaines. Ce groupe majoritairement producteur d'antibiotiques est aussi une source prometteuse de production d'une large gamme d'enzymes importantes applicables à l'échelle industrielle (**Skplovská *et al.*, 2003**).

La figure 2 ci-dessous montre quelques applications importantes des actinobactéries.

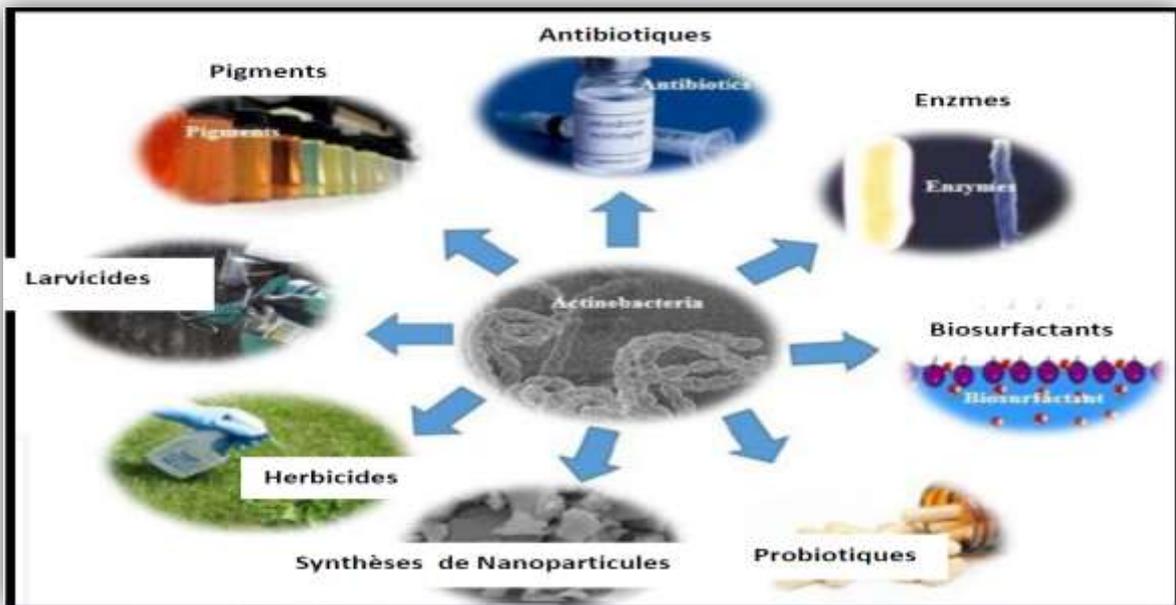


Figure 2 : Applications biotechnologiques des actinobactéries (Anandan, 2016).

Parmi la grande variété d'enzymes biologiquement actives produites par les actinobactéries, on retrouve les kératinases qui sont des protéases dégradant avec un haut degrés de spécificité des substrats de nature kératiniques tels que les plumes de volailles, le cuir et et les sabots d'animaux (Saha et al., 2013).

II. Kératinases

II.1 Définition et mode d'action

Ce sont des protéases produites par différents groupes microbiens notamment les actinobactéries (Onafide et al., 1998). Ces enzymes dégradent facilement la kératine des plumes, de la laine et des cheveux ainsi que d'autres protéines fibreuses (l'élastine et le collagène) et non fibreuses (la caséine, la gélatine et l'albumine) avec un haut degré de spécificité. Les kératinases sont essentiellement secrétées par voie extracellulaire dans un milieu de croissance contenant de la kératine comme seul source de carbone et d'azote. (Monod et al., 2002 ; Gupta et Ramnani 2006 ; Brandelli et al., 2010).

Les kératinases attaquent principalement les ponts disulfures d'un substrat non soluble par clivage ce qui permet l'attaque de protéases extracellulaires et donne en définitive une accumulation de sulfocysteine, l'excès de soufre est oxydé en sulfite et en sulfate ou en thiosulfate qui se concentre dans le milieu réactionnel (Suh et Lee 2001 ; Priya et Anbu et

al., 2007 ; Archana ,2008 ; Sahoo et *al.*, 2012).

La figure 3, (a) montre le mode d'action des kératinases sur les substrats kératiniques et (b) montre une représentation schématique des ponts disulfures entre les résidus cystéines.

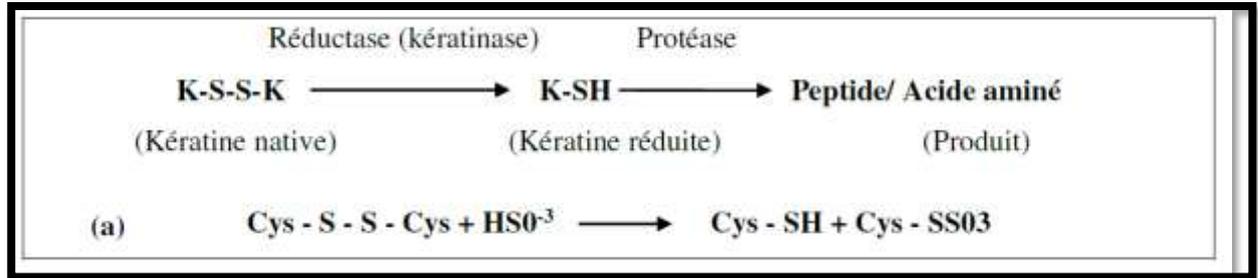


Figure 3 : (a) Schéma montrant le mode d'action des kératinases sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures.

II.2 Classification et sources des kératinases

II.2.1 Classification des kératinase

Les kératinases sont groupées en 14 familles : endo-protéase, exo-protéase, et oligo-peptidase (Lange et *al.*, 2016; Mercer et Stewart, 2019). Le tableau I montre les différentes familles de kératinases, source de production et les conditions optimums de production.

Tableau I : Classification des kératinases (Jingwen et al., 2020).

La famille :	Microorganisme source	Conditions optimales (T°et PH)	La référence
Famille S1 BAM 67011 AAO 06113	<i>Paenarthrobacter</i> <i>Micrococcaceae</i> <i>Nocardiopsis</i> sp. TOA-1	– 12,5, 60 °C	(Soni et al., 2004) (Mitsuiki et al., 2004)
Famille S8 AGK 12420 AGK 29593	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8.0, 60 °C 8.0, 60 °C	(Fang et al., 2014) (Fang et al., 2014)
Famille S9 AAN 03632AAS 76665	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton rubrum</i>	7.0–9.0, 7.0–9.0,	(Monod et al., 2005) (Monod et al., 2005)
Famille S10 AAS 76667 AAS 76666	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton rubrum</i>	– –	(Zaugg et al., 2008) (Zaugg et al., 2008)
Famille S16 AMW 3350	<i>Fervidobacterium islandicum</i>	–	(Huang et al., 2015)
Famille M3 AJD 23200	<i>Onygena corvina</i>	– –	(Huang et al., 2015)
Famille M4 ADP 00718 AJD 77429	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	– 9.0, 60 °C	(Sharma et Gupta, 2010) (Gegeckas et al., 2015)
Famille M14 ABG 67896	<i>Trichophyton rubrum</i>	– –	(Zaugg et al., 2009, 2008)
Famille M16 AMW 32060	<i>Fervidobacterium islandicum</i>	– –	(Kang et al., 2020)
Famille M28 AAS 76670 AJD2 3165	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Onygena corvina</i>	7.0, 50 °C –	(Monod et al., 2005) (Huang et al., 2015)
Famille M32 AMW 32563	<i>Fervidobacterium islandicum</i>	7.0, 80 °C	(Lee et al., 2015a)
Famille M36 BAM 84176 CAD 35288	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Microsporum canis</i>	7.0, 50 °C –	(Chaya et al., 2014) (Brouta et al., 2002)
Famille M38 AMW 33776	<i>Fervidobacterium islandicum</i>	–	(Kang et al., 2020)
Famille M55 AMW 33601	<i>Fervidobacterium islandicum</i>	–	(Kang et al., 2020)

II.2.2 Sources microbiennes de kératinases

Divers groupes de micro-organismes ont été décrits pour leur capacité à produire des kératinases (**Abdel-Fattah et al., 2018**), parmi lesquelles on retrouve des espèces de *Bacillus* tel que *Bacillus licheniformis* (**Lin et al., 1992 ; Vidmar et Vodovnik, 2018**), *B.subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. coagulans*, et *B. megatherium* (**Łaba et al., 2018**). La dégradation de la kératine, peut aussi avoir lieu avec des kératinases fongiques telle que *Paecilomyces marquandii* (**Brandelli et al., 2015**). D'autre part des représentants actinobactériens qui sont démarqués comme sources prometteuses pour la production industrielle de kératinases, c'est le cas de *Streptomyces gulbergensis*, *Streptomyces thermoviolaceus* (**Vidmar et Vodovnik, 2018**) et *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 (**Habbeche, 2014**).

L'isolement des micro-organismes impliqués dans la production de la kératinase s'effectue principalement à partir de milieux riches en plumes en décomposition ou à partir des effluents des abattoirs de volailles (**Brandelli et al., 2015**).

II.3. Applications industrielles des kératinases

L'application la plus importante des kératinases est le biotraitement des déchets de plumes de poulet. La dégradation de ces déchets permet de récupérer de petits peptides ou des acides aminés libres utilisés comme des oligo-éléments, des vitamines, et des facteurs de croissance (**Peng et al., 2019**).

Les kératinases trouvent aussi des applications dans la détergence grâce à leur pouvoir protéolytique à des pH alcalins, leur thermostabilité et leur grande tolérance aux tensioactifs (**Rai et al., 2009; Prakash et al., 2010 ; Rajput et al., 2010 ; Cavello et al., 2012**).

Elles sont aussi utilisées dans les soins de la peau par blanchiment et élimination des taches de rousseur (**Yang, 2012**), le traitement des ongles et de l'hyperkératose comme dans les cors et les callosités. Les kératinases ont d'autre part été investi pour augmenter la biodisponibilité de certains médicaments agissant sur la peau humaine (**Tiwary et Gupta, 2010**).

Le schéma ci-dessous montre les différentes applications biotechnologiques des kératinases (figure4).

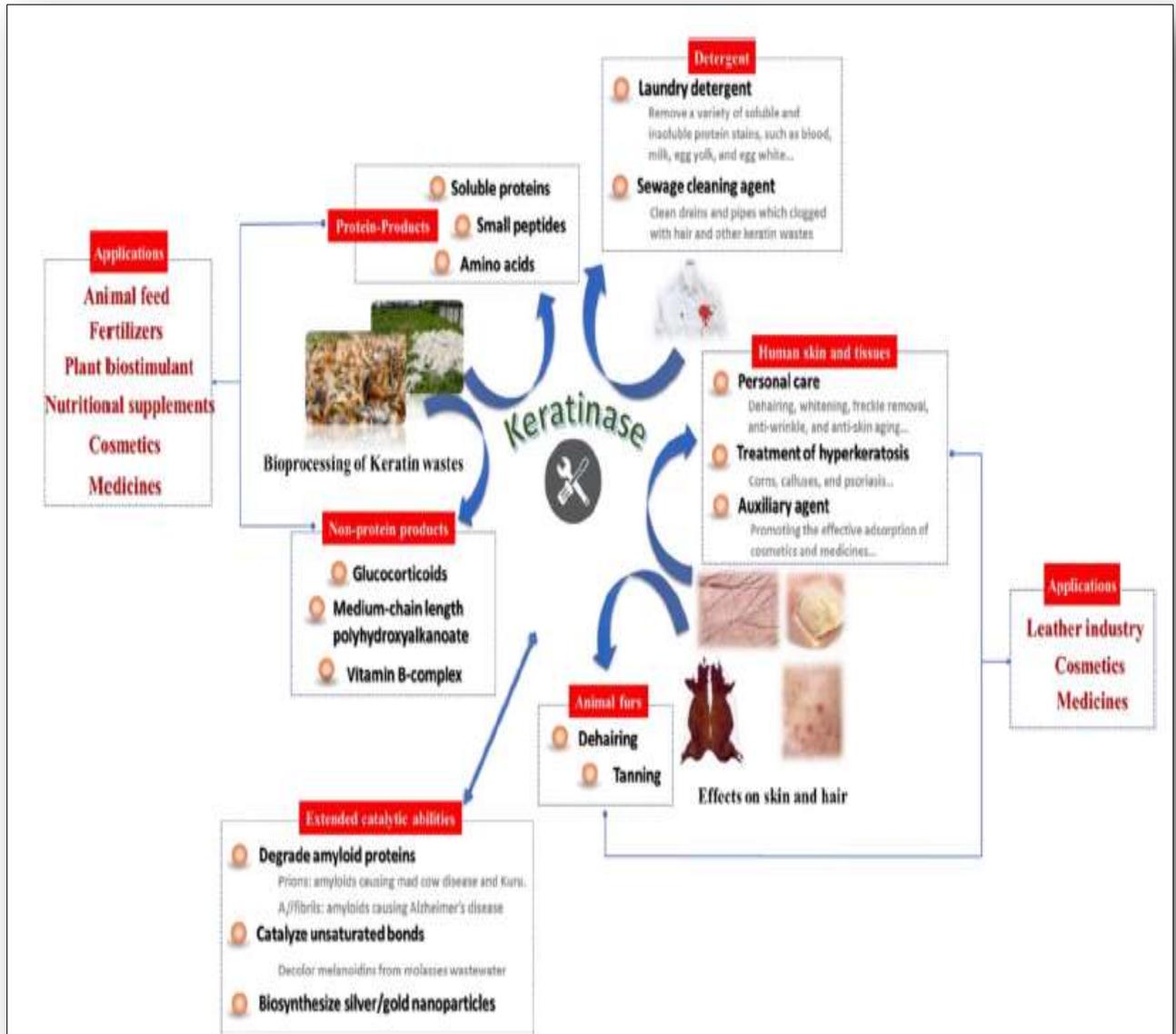


Figure 4 : schéma représentatif de différentes applications biotechnologiques des kératinases.

(Chang *et al.*, 2020)

III. Quelques paramètres influençant la production de kératinases

La production de kératinases par les microorganismes est influencée par un certain nombre de facteurs tels que la température, le pH, la nature et les concentrations des sources de carbone et d'azote, l'aération présente dans le milieu. Diverses méthodes dont la composition du milieu de culture, l'optimisation des conditions de croissance et de production sont utilisées pour améliorer le rendement enzymatique. (Ramnani et Gupta, 2004 ; Anbu *et al.*, 2005).

Ces facteurs et leurs variations ont des effets variés sur la production de kératinases chez

les différentes espèces. Peu d'informations sont disponibles sur les facteurs biologiques contrôlant la synthèse et la libération des kératinases extracellulaires (**Kumar et al., 2008**).

III.1 Facteurs abiotiques influençant la production de kératinases

III.1.1. pH

Le pH est un facteur important qui influence la croissance des microorganismes (**Prescott, 1995**). Il a une forte influence sur la production des protéases. En effet, Calik et al en 2002 ont démontré que le pH affecte les mécanismes de régulation métabolique de la production de protéases chez *B. licheniformis*. Kembhawi et collaborateurs en 1993 et Hameed et collaborateurs en 1999 ont en outre démontré que la production de protéases par *Bacillus subtilis* est maximale lorsque le pH est contrôlé durant la culture microbienne. Des travaux ont révélées que des variations importantes de pH au cours de la fermentation peuvent mener à la désactivation des protéases excrétées dans le milieu (**Kumar et al., 1999**). Il est donc nécessaire de maintenir en tout temps le pH à un niveau optimal lors de la fermentation afin d'obtenir de bons rendements de production de protéases.

III.1.2. Temps d'incubation

Dans la plupart des cas, le temps nécessaire à la production optimale de kératinases par les bactéries ou les champignons peut aller de 48 heures à 9 jours (**Aikat et al., 2000 ; Puri et al., 2002**). Une étude réalisée sur la souche MTCC9102 de *B. subtilis* dans un milieu à base de farine de corne a montré que la production optimale de kératinase s'est produite dans une courte durée s'étalant entre 36 h et 72 h d'incubation (**Kumar et al., 2008**).

III.1.3. Température

La température est l'un des plus importants paramètres physiques influençant les activités métaboliques des microorganismes.

Une étude réalisée par Habbeche en 2013 montre que la souche d'actinomycète thermophile *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 présente un maximum d'activité kératinolytique à 45°. C'est le cas de plusieurs autres souches thermophiles telles que *Nocardiosis prasina* qui présente un maximum d'activité kératinolytique à 50°C (**Williams et al., 1990**) ; et *Kocuria rosea* qui présente un maximum d'activité kératinolytique à 40°C

(Bernal et al., 2006)

III.2. Facteurs nutritionnels influençant la production de kératinases

III.2.1. Source de carbone

Les substrats carbonés servent à la fois comme source de croissance et d'énergie aux microorganismes. Étant donné que les plumes de poulet sont constituées d'environ 90% de protéines, ils constituent donc une source de carbone prometteuse pour la croissance d'une multitude d'espèces microbiennes et par conséquent une production d'enzymes protéolytiques intéressantes (Onifade et al., 1998).

Brandelli et collaborateurs en 2005 ont indiqué que l'augmentation des quantités de plumes et de farine de plumes a entraîné une croissance bactérienne plus importante chez *Chryseobacterium sp*, et rapportent que cette dernière montre une activité kératinolytique élevée sur la farine du poulet comparé à celle obtenue sur la farine de soja.

IV. Kératines

IV.1 Définition des 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). En effet les kératines représentent une famille des protéines fibreuses insolubles connues sous le nom des scléroprotéines produites dans certaines cellules animales en particulier les épithéliums (Jacques, 2003 ; Brandelli et al., 2010). Les kératines sont regroupées en kératines dures (plumes, poils sabot et ongles) et en kératines molles (peau et cals) en fonction de leur teneur en soufre. Elles sont connues pour leur grande stabilité, insolubilité et leur résistance à la lyse protéolytique d'où leurs fonctions mécanique et protectrice (Robert. D et al., 2004 ; Brandelli, 2008).

IV. 2 Kératine des plumes

La kératine est utilisée par de nombreux êtres vivants comme élément de structure, 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)

Les plumes d'oiseaux terrestres sont composées d'une partie protéique (kératine) qui

présente presque 90% des plumes et d'une partie non protéique qui inclut des pigments, des minéraux, des polysaccharides, des nucléotides, de l'acide urique, du glucose et du ribose. (**Gross, 1956**). Ces déchets kératiniques représentent une source très riche en protéine et en particulier en acides aminés essentiels. Le tableau suivant donne les concentrations des acides aminés en grammes par kilogramme de plumes.

Tableau II : Concentration des acides aminés en gramme par Kg de plumes (**Onifade et al., 1998**)

Acide aminé	Concentration dans les plumes (g/kg)
Glycine	162
Valine	20
Leucine	83
Isoleucine	43
Arginine	17
Lysine	18
Cystéine	76
Thréonine	85
Phénylalanine	43
Asparagine	67
Histidine	3
Sérine	72
Glutamine	97
Proline	188
Alanine	84

V. Plans d'expériences

Un plan d'expériences (DOE= Désigne of experiment) est une suite d'essais organisée à l'avance de manière à déterminer en un minimum d'essais et avec un maximum de précision l'influence de multiples paramètres possibles sur une ou plusieurs réponses pour optimiser la performance du système étudié (**Goupy, 1996**).

La méthode des plans d'expériences (MPE) cherche à déterminer une relation entre 2 types de grandeurs :

- **La réponse** : Qui correspond à la grandeur physique étudiée.

- **Les facteurs** : Qui correspondent aux grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur et sensés influencer sur les variations de la réponse.

L'objet de la méthodologie des plans d'expériences est d'aider l'expérimentateur à résoudre les problèmes suivants (classés par ordre chronologique) :

La sélection des facteurs qui influencent la réponse :

- La modélisation des variations de la réponse du système en fonction des fluctuations des facteurs et la validation expérimentale du modèle décrit par une équation mathématique.
- La détermination de la (ou des) combinaison(s) de facteurs conduisant à une optimisation de la réponse.

La méthode permet aussi la mise en évidence des éventuelles interactions entre les facteurs, la modélisation est la présentation d'une situation ou d'un phénomène naturel sous forme d'un problème ou un modèle mathématique soit un programme linéaire d'optimisation, équation... etc. Elle permet une fois que les facteurs influents sont identifiés, de trouver la forme de cette influence et l'équation ou la fonction qui décrit les variations du phénomène étudié en fonction des facteurs influents.

Toute réponse expérimentale peut être écrite sous la forme suivante :

$$y = f(Z_1, Z_2, \dots, Z_k) + \varepsilon ,$$

Où f est une fonction inconnue (modèle théorique) des facteurs influents contrôlés (Z_1, Z_2, \dots, Z_k).

Cette fonction inaccessible par l'expérience ne peut être qu'estimée par une fonction de lissage de forme polynomiale. L'idée de base présidant à ce choix étant qu'au voisinage d'un point, toute fonction peut être développée en série de Taylor et donc remplacée par un polynôme.

L'équation de régression obtenue sur la base de l'expérience s'écrit sous la forme suivante :

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{j=1}^n b_j x_j + \sum_{u,v=1}^n b_{uv} x_u x_v + \sum_{j=1}^n b_{jj} x_j^2 \dots \dots \dots$$

- \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**).
- b_0, b_j, b_{ij}, b_{jj} : sont les coefficients du polynôme (**Goupy et Creighton, 2001**).

V.1 Plan Box-Behnken

Les points expérimentaux de ce plan sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (Figure 5). Ce plan comporte douze essais auxquels on peut ajouter un ou plusieurs points centraux. La figure ci-dessous matrice montre douze essais accompagnés d'un seul point central. Dans la pratique on réalise souvent 3 ou 4 points au centre.

Les plans de Box-Behnken (**Box et Behnken, 1960**) répondent à un critère d'optimisation particulier : l'erreur de prévision des réponses est la même pour tous les points d'une sphère centrée à l'origine du domaine expérimental. C'est le critère d'isovariance par rotation. Le plus connu des plans de Box-Behnken est celui qui permet d'étudier trois facteurs (Figure 5).

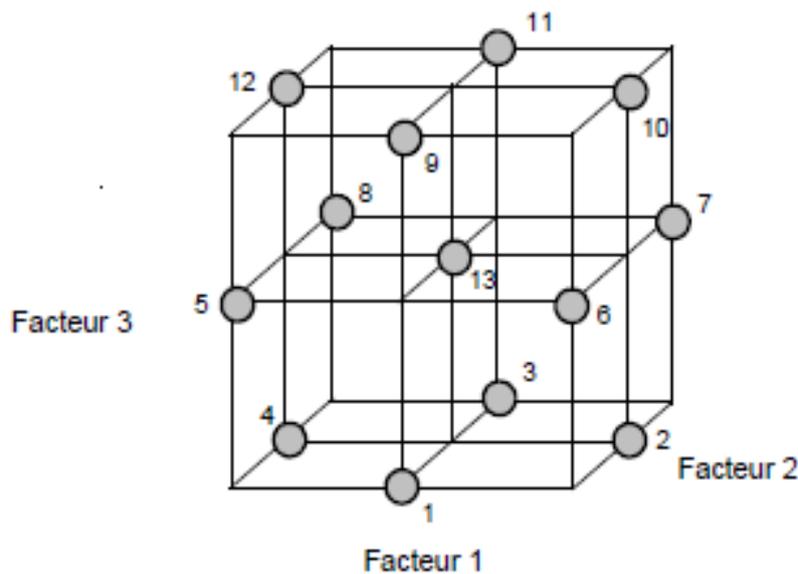


Figure 5 : Schéma illustrant le plan Box-Behnken à 3 facteurs (**Box et Behnken, 1960**)

Matériel et Méthodes

Notre travail d'étude consiste à réaliser une production de kératinases thermostables en milieu submergé à base de farine de plumes par une souche d'Actinomycète isolée en décembre 2017 par le doctorant HAMMA Samir. Le stage pratique a été effectué au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université A/Mira Béjaia pendant la période Avril - Septembre 2021.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

La souche utilisée dans ce travail est une actinobactérie référenciée **ES41** appartenant à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée «LMA» de l'université A/Mira de Béjaia. Le prélèvement de l'échantillon a été effectué à partir d'un sol de poulailler constitué de terre et de déchets de plumes. Le site d'échantillonnage est situé dans la wilaya de Béjaia.

I.2. Matériel analytique

Le matériel analytique utilisé dans ce travail est décrit en annexe I

II. Méthodes

II.1. Préparation du milieu de culture et du matériel biologique

II.1.1. Préparation du milieu de culture liquide "Feather Broth Medium"(FBM)

Le milieu de culture utilisé préconisé pour l'isolement de la souche étudiée productrice de kératinases est le milieu FBM liquide (Annexe II) contenant de la farine de plumes comme seule source de carbone et d'azote.

La farine de plumes est préparée en collectant localement des plumes de volailles (Figure 6). Ces dernières sont lavées à l'eau du robinet puis à l'eau distillée puis séchées à l'air libre.

Il s'en suit les étapes suivantes :

- Séchage des plumes dans un four Pasteur à 150°C pendant 2h (figure 7),
- Broyage des plumes séchées au moyen d'un broyeur,
- Tamisage de la poudre obtenue à l'aide d'un tamis doté de pores de 1mm de diamètre afin d'éliminer les grosses particules et d'obtenir une farine homogène, (**Habbeche., 2014**).



Figure 6 : Plumes blanches à l'état brut

Figure 7 : plumes séchées à 150°C pendant 2h

II.1.2. Revivification de la souche ES41

La viabilité de la souche ES41 est vérifiée par des observations à l'état frais et des repiquages sur milieu liquide à base de farine de plumes (FBML), ensuite des milieux solides à base de farine de plumes (FBMS) sont inoculés en surface à partir des précultures et incubées à 45°C pendant 48h. Les cultures pures obtenues sont conservées à 4°C en vue d'études ultérieures.

II.2. Détection de l'activité protéolytique et kératinolytique sur milieu solide

II.2.1 Test d'activité protéolytique

L'activité protéolytique est mise en évidence sur milieu solide riche à base de caséine (Annexe II). Pour cela, le milieu gélose nutritive additionnée de 10% de caséine est utilisée (**Van Den Berg et al., 1995**). La souche actinomycète thermophile ES41 est repiquée stérilement par touches sur le milieu sus-cité à pH 8 afin d'obtenir des colonies bien séparées. La culture est incubé à 45°C pendant 24h (**Debananda et al., 2009**). Ce test d'activité protéolytique est basé sur la diffusion des protéases secrétées par cette souche d'actinomycète donc l'observation d'un halo translucide (zone d'hydrolyse) autour de la colonie dans le milieu de culture traduit la production de ces enzymes. L'activité est significative si le diamètre de l'halo est supérieur ou égal à 3 mm (**Machehalek et al., 2015**).

Le diamètre de la zone de lyse = diamètre de l'halo – le diamètre de la colonie.

II.2.2 Test d'activité kératinolytique

Afin de détecter l'activité kératinolytique, la souche étudiée est repiquée par touche au centre des boîtes de pétri sur milieu solide à base de farine de plumes (FBMS) à pH 8 et incubés à 45°C pendant 4 jours par le suivi de la cinétique. La recherche d'activité kératinolytique est basée sur l'apparition des halos translucides au tour des colonies, le diamètre des halos est proportionnel à la quantité de kératinases extracellulaires secrétés par cette souche (Habbeche., 2014).

II.3 Préparation des suspensions sporales et dénombrement

Des suspensions sporales sont préparées en versant 10 ml d'eau distillée stérile dans des boîtes de Petri contenant des cultures fraîches de la souche étudiée. À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose. Les suspensions sporales sont versées dans des flacons stériles (Machehalek et Yakhlef., 2015).

Des dilutions décimales successives jusqu'à 10^{-3} sont effectuées. Le dénombrement des spores est réalisé par comptage direct sur cellule Malassez et sous microscope optique à l'objectif (X 100) (Machehalek et Yakhlef., 2015)

III. Production de kératinases

La production de kératinases par la souche ES41 est réalisée en milieu liquide à base de farine de plumes (FBML) (AnnexeII). Pour cela des flacons d'une contenance de 200 ml contenant 40 ml du milieu FBML sont inoculés à raison de 3% (v/v) par la suspension sporales. Les milieux sont incubés dans un shaker à 45°C et sous agitation 150 tr/min pendant 3 jours. L'activité kératinolytique est calculée selon la méthode de Wawrzkievicz (1987) par mesure des absorbances à 280 nm (Park et Son, 2009).

III.1. Dosage de l'activité kératinolytique

La production de kératinases extracellulaires par la souche d'actinomycète ES41 est estimée dans le surnageant de culture obtenu par centrifugation des milieux de culture à 5000g pendant 20 min à 4°C.

III.2. Préparation de la solution du substrat kératinique tamponnée

La solution de substrat kératinique est préparée par dissolution de 5 g de farine de plumes

dans 250 ml de solvant diméthylsulfoxyde (DMSO), ensuite le mélange est chauffé dans un rotavapeur à 90°C pendant 2h. La kératine soluble est ensuite précipitée dans 500 ml d'acétone préalablement refroidi à (-70°C) pendant 2h. Le précipité est récupéré par centrifugation à 12000 rpm pendant 10 minutes, ensuite lavé deux fois à l'eau distillée, et séché à 40°C jusqu'à l'obtention d'une poudre. 1g du précipité séché est dissout dans 20ml de 0,05mol/l de NaOH. Le pH est ajusté à 8 par une solution de 0,05mol/l de Tris et 0,05mol/l de HCL, la solution est diluée à 200ml avec 0,05M de tampon Tris-HCL pH 8 (**Park et Son, 2008**).

III.3. Dosage de l'activité enzymatique

1ml de surnageant centrifugé récupéré (solution enzymatique) est mélangé à 1ml de solution de kératine tamponnée (substrat préparé) pour former le mélange réactionnel. Le mélange est ensuite incubé au bain Marie à 50°C pendant 10 min. Des témoins sans enzyme de 1ml de solution de kératine tamponnée sont préparés et incubés parallèlement dans les mêmes conditions. Les réactions sont arrêtées par incubation dans un bain de glace suivi par addition de 2ml d'acide trichloracétique (TCA) à 0.04M, et addition de 1ml de surnageant centrifugé au témoins. Le mélange est centrifugé à 5000×g pendant 20 min (**Habbeche., 2014**).

L'activité enzymatique est détectée par mesure de l'absorbance à 280nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV mini 1240 SHIMADZU. Une unité (UI/ml) de l'activité kératinolytique est définie comme étant l'augmentation de la densité optique (DO_{280}) avec le blanc, de 0,01 par minute dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus (**Cai et al., 2008**). L'activité kératinolytique est calculée selon la formule ci-après:

$$UI = \frac{n \times 4 \times A_{280}}{0.01 \times 10}$$

✓ n : le taux de dilution

✓ 4 : le volume réactionnel final (ml)

✓ 10 : le temps d'incubation réactionnelle

IV. Optimisation de la production de kératinases par plan d'expériences

Dans le but de déterminer les valeurs optimales permettant une meilleure production de kératinases par la souche ES41, un plan Box-Behnken à quatre (4) facteurs avec interactions est appliqué. Cette étude permet d'évaluer l'influence de chaque paramètre sur l'activité kératinolytique étudiée d'une part et les effets des interactions entre les facteurs d'autre part.

Les paramètres opératoires étudiés sont :

- La concentration en substrat en l'occurrence la farine de plumes (X_4) ;
- Le temps d'incubation (X_2) ;
- La température (X_1) ;
- Le pH (X_3).

Les valeurs de ces facteurs varient, dans le domaine du facteur (Annexe IV), entre une valeur minimale notée « -1 » et une valeur maximale notée « +1 ». Ces valeurs sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau III : Valeurs numériques des facteurs étudiés dans leur domaine de variation.

Paramètres opératoires	Notation	Niveau minimal (-1)	Centre (0)	Niveau maximal (+1)
Temps d'incubation (jours)	Z₁	3	5	8
Température (°C)	Z₂	35	45	55
pH	Z₃	7	9	11
Concentration de la farine de plumes (%)	Z₄	2	5	8

Vingt-sept (27) expériences différentes sont préparées selon le plan factoriel donné par le logiciel statistique Design Expert. Les milieux de culture sont préparés suivant la matrice obtenue dans des flacons d'une capacité de 200 ml, contenant chacun un volume de 40 ml de milieu de culture FBML. Les milieux de cultures sont ajustés aux pH étudiés, autoclavés puis inoculés et incubés aux températures étudiées suivant le tableau ci-dessous :

Tableau IV : Matrice d'expériences donné par le plan « Box Behnken » pour l'optimisation de la production des kératinases de la souche ES41 en unités numériques.

Rang	Z ₁ jours	Z ₂ °C	Z ₃	Z ₄ %
1	5	35	7	5
2	5	55	9	8
3	5	55	9	2
4	5	35	9	2
5	7	45	7	5
6	5	45	11	2
7	3	35	9	5
8	5	45	11	8
9	5	35	9	8
10	5	45	9	5
11	5	35	11	5
12	3	45	9	2
13	3	55	9	5
14	5	45	7	8
15	3	45	9	8
16	3	45	7	5
17	7	45	9	2
18	5	45	9	5
19	7	35	9	5
20	7	45	11	5
21	5	45	9	5
22	5	55	7	5
23	7	45	9	8
24	5	55	11	5
25	5	45	7	2
26	7	55	9	5
27	3	45	11	5

V. Test de validité du modèle statistique

Une validation pratique du modèle obtenu après optimisation est nécessaire. Ainsi les valeurs optimales des facteurs étudiés sont utilisées pour la préparation de milieux de culture dans les conditions optimales permettant d'obtenir le meilleur rendement de la souche étudiée.

Trois solutions correspondant à 3 essais donnés par le modèle Box-Behnken sont préparées dans les conditions optimales des facteurs étudiés. Les surnageants des cultures sont récupérés après centrifugation à 5000g pendant 20min. L'activité kératinolytique est mesurée après la mise en contact de l'enzyme avec son substrat à 50°C pendant 10 minutes.

Résultats et discussions

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats et la discussion relatifs aux mises en évidence de l'activité protéolytique et kératinolytique de la souche étudiée. D'autre part il sera procédé à l'exploitation des résultats de l'optimisation statistique de la production de kératinases de la souche ES41 appartenant à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée.

I. Revivification de la souche ES41

I.1 Aspect de la Farine de plumes

Les plumes collectées, lavées, séchées et broyées ont donné lieu à une poudre fibreuse de couleur brune et d'une forme homogène qui est la farine de plumes (**Figure 8**).

I.2 Aspect macroscopique de la souche ES41 sur milieu solide à base de farine de plumes

La souche actinomycète étudiée, repiquée sur milieu solide à base de farine de plumes (FBMS) à 45°C pendant 48h a donné lieu à des colonies blanches d'aspect poudreux (Figure 9). Ces dernières sont facilement détachables de la surface du milieu.

La croissance de la souche sur le milieu de culture FBMS indique sa capacité à produire des enzymes extracellulaires douées d'activités kératinolytiques (**Habbeche. , 2014**)



Figure 8 : Farine de plumes obtenue après broyage.



Figure 9 : Aspect de la souche d'actinomycète sur milieu solide FBMS à 45°C pendant 48h.

II.3. Mise en évidence de l'activité protéolytique et kératinolytique sur milieux solides

➤ **Activité protéolytique (Test semi-quantitatif)**

L'examen des résultats obtenus montre qu'après 24h d'incubation à 45°C, la souche Actinomycète ES41 se cultive facilement sur milieu solide à base de caséine et présente un halo transparent de 43mm de diamètre entourant la colonie (Figure 10). Le diamètre de l'halo est proportionnel à la quantité de protéases libérées par les cellules bactériennes dans le milieu pendant le temps d'incubation. Ce résultat montre que la souche ES41 est active sur son substrat par sécrétion d'enzymes protéolytiques.

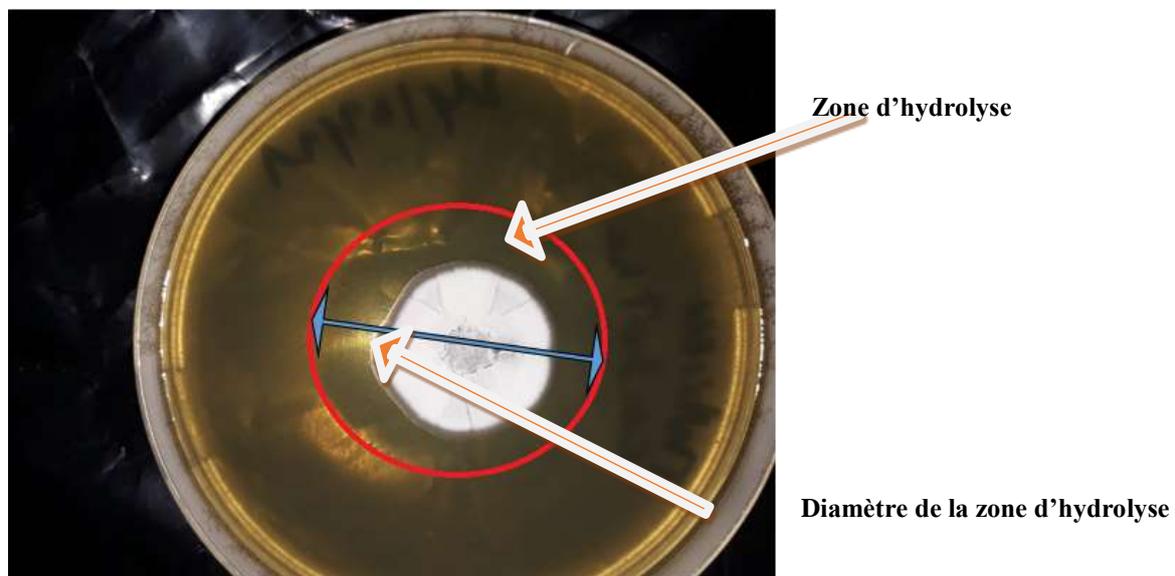


Figure 10 : Test d'activité protéolytique de la souche ES4-1 sur milieu à base de caséine

➤ **Activité kératinolytique**

En vue de tester la production d'enzymes kératinolytiques, la souche ES41 est repiquée sur milieu FBM solide à 45°C pendant 48 heures (test semi-quantitatif). Les résultats obtenus montrent que cette souche peut dégrader facilement la farine de plumes et croître sur ce milieu dans les conditions sus-citées (Figure 11).

L'apparition d'une zone claire de 33 mm de diamètre autour de colonie montre que la souche testée est capable de produire une quantité de kératinases proportionnelle au diamètre de la

zone d'hydrolyse. La souche étudiée est donc active sur son substrat par sécrétion de kératinases. En effet, la souche ES41 est isolée d'un sol riche en matière organique notamment de plumes de poule. Ces milieux sont connus pour abriter une diversité de microorganismes et particulièrement les Actinomycètes.

Des travaux de recherche dans ce sens ont montré que la souche thermophile *Bacillus stearothermophilus* (Desai et Dhala, 1969 ; Kubo et al, 1988) et les souches d'*Actinomadura keratinilytica* sp (Puhl et al, 2009) sont isolées du compost et secrètent des protéases thermostables.

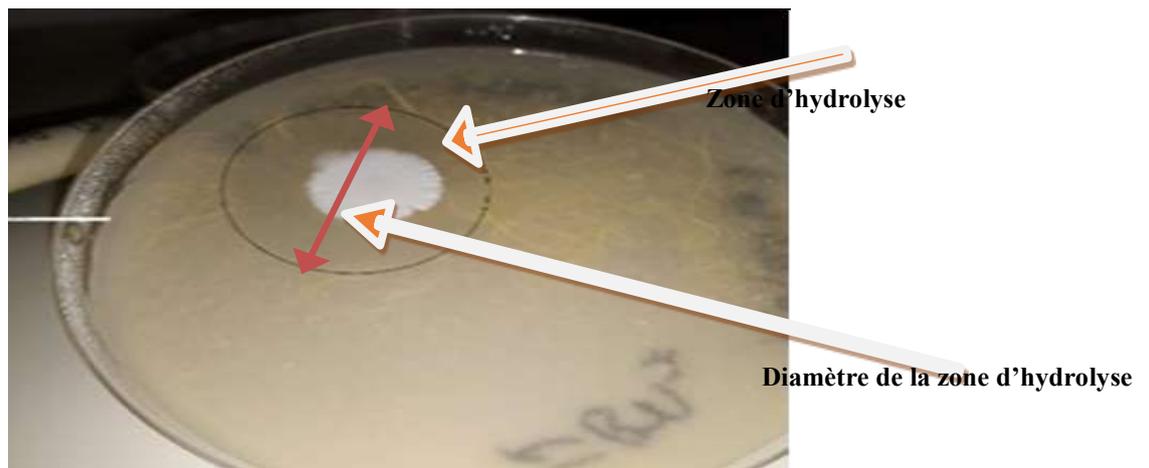


Figure 11 : Test d'activité kératinolytique de la souche ES4-1 sur milieu à base de farine de plumes.

III. Optimisation de l'activité kératinolytique de la souche ES41 par utilisation du plan Box-Behnken

L'activité kératinolytique de la souche d'actinomycète étudiée est mesurée pour chaque essai dans les milieux de culture préparés selon la matrice donnée par le plan Box-Behnken. Les paramètres opératoires étudiés sont respectivement : le temps, la température, le pH et la concentration en farine de plumes.

L'effet des facteurs étudiés dans le cadre du plan utilisé a permis de mesurer la réponse Y en l'occurrence 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 chez la souche étudiée. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le Tableau ci-dessous :

Tableau V : Matrice d'expériences et de réponses donnés par le plan Box-Behnken Design dans le cadre de l'optimisation de l'activité kératinolytique de la souche ES41.

	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4	Réponse 1
Rang	A : Temps	B : Température	C : pH	D : Source de carbone	Kératinase
	Jour	°C		%	U/ml
1	5	35	7	5	108
2	5	55	9	8	21
3	5	55	9	2	35
4	5	35	9	2	9
5	7	45	7	5	66
6	5	45	11	2	38
7	3	35	9	5	8
8	5	45	11	8	29
9	5	35	9	8	96
10	5	45	9	5	31
11	5	35	11	5	80
12	3	45	9	2	0
13	3	55	9	5	0
14	5	45	7	8	175
15	3	45	9	8	16
16	3	45	7	5	36
17	7	45	9	2	62
18	5	45	9	5	33
19	7	35	9	5	92
20	7	45	11	5	102
21	5	45	9	5	32
22	5	55	7	5	52
23	7	45	9	8	87
24	5	55	11	5	51,2
25	5	45	7	2	36
26	7	55	9	5	15,5
27	3	45	11	5	6

L'activité kératinolytique est obtenue dans tous les essais effectués sauf pour les essais 12 et 13. Les rendements sont variables allant de 6 U/ml à 175 U/ml. La moyenne des activités kératinolytiques des 27 essais effectués est $\bar{y}_i = 48,76$ U/ml.

Le nombre (no) d' expériences au centre du domaine expérimental (Poudre de plumes = 5%, pH = 9, Température = 45°C, Temps d'incubation = 5 jours) est de 3, leurs activités y_0 respectives 31, 33, 32U/ml qui sont très proches.

La moyenne de l' activité kératinolytique au centre du domaine est : $\bar{y}_0 = 32\text{U/ml}$

III.1 Analyse de la variance pour la production de kératinases (ANOVA)

L'analyse de ces résultats est réalisée par le logiciel Excel STAT, basé sur l'analyse de la variance ANOVA. Pour toute analyse la différence est considérée comme étant significative lorsque la valeur $p < 0,05$ pour un intervalle de confiance de 95%.

Le tableau ci-dessous donne les résultats de l'analyse de la variance, les estimations des coefficients de régression du modèle polynomiale de second degré et analyse de modèle.

Tableau VI : Analyse de variance et estimation des coefficients de régression du modèle polynomiale de second degré et analyse de modèle.

Source	Sommes des carrés	dl	Carré moyen	F De fisher	p-value Probabilité	Signification
Modèle	38995,30	14	2785,38	6,75	0,0010	Significatif
X₁-Temps	10710,19	1	10710,19	25,94	0,0003	Significatif
X₂- Temperature	3971,24	1	3971,24	9,62	0,0092	Significatif
X₃-pH	2318,52	1	2318,52	5,61	0,0354	Significatif
X₄-source de carbone	4961,33	1	4961,33	12,01	0,0047	Significatif
X₁X₂	1173,06	1	1173,06	2,84	0,1177	Non significatif
X₁X₃	1089,00	1	1089,00	2,64	0,1303	Non significatif
X₁X₄	20,25	1	20,25	0,0490	0,8285	Non significatif
X₂X₃	184,96	1	184,96	0,4479	0,5160	Non significatif
X₂X₄	2550,25	1	2550,25	6,18	0,0287	Significatif
X₃X₄	5476,00	1	5476,00	13,26	0,0034	Significatif
X₁²	164,28	1	164,28	0,3978	0,5400	Non significatif
X₂²	89,65	1	89,65	0,2171	0,6496	Non significatif
X₃²	4973,54	1	4973,54	12,04	0,0046	Significatif
X₄²	397,90	1	397,90	0,9636	0,3457	Non significatif
Résidus	4955,32	12	412,94			
Lack of fit	4953,32	10			0,200	Non significatif
Erreur pure	2,00	2	1,0000			
Total	43950,62	26				

Le tableau VI montre que la faible valeur du modèle p value est égal 0,0010, indiquant que ce modèle (quadratique) est statistiquement significatif à un niveau de confiance de 95%, cela signifie que les variables du modèle ont un effet significatif sur la réponse Y en l'occurrence l'activité kératinolytique de la souche ES41.

L'analyse de la variance montre que les effets linéaires du temps (X₁), de la température (X₂), celle du pH (X₃) et de la source de carbone (X₄) sont significatifs. En effet, les valeurs

de p des coefficients X_1 , X_2 , X_3 et X_4 sont inférieurs à 0,05, étant donné que ce sont des variables importantes pour une production élevée de kératinases.

Ces résultats révèlent aussi la présence des effets d'interactions entre la température et la source de carbone X_2X_4 et entre le pH et la source de carbone X_3X_4 ainsi la présence de l'effet quadratique de pH X_3^2 qui présentent des valeurs de p value inférieures ou égales à 0,01. Ceci prouve la présence des effets synergiques entre les facteurs sus-cités.

Ces résultats sont encore confirmés par le manque d'ajustement (Lack of Fit ; LOF) du modèle qui est d'une valeur égale à 0.2000, ce qui n'était pas significatif par rapport à l'erreur pure (Pena-Maravilla et al., 2017). Sur ce, l'équation de régression peut bien être validée (He et al., 2018).

Cette analyse indique principalement que le modèle utilisé est bien ajusté puisque la somme des carrés totale est très importante par rapport à la somme des carrés due à l'erreur.

III.2 Modèle mathématique de régression

Le tableau suivant donne les valeurs des coefficients du modèle de régression obtenues dans cette étude.

Tableau VII : Valeurs des coefficients du modèle de régression.

Kérati- nase	+32	+29,88	-18,19	-13,9	+20,33	-17,13	+16,5	+2,25	+6,8	-25,25	-37	-5,55	+4,1	+30,54	+8,64
=	b_0	b_1	b_2	b_3	b_4	b_{12}	b_{13}	b_{14}	b_{23}	b_{24}	b_{34}	b_1^2	b_2^2	b_3^2	b_4^2

Les résultats obtenus sur la production de kératinases sont exprimés sous forme d'une équation de régression. Lorsque des variables du modèle sont non significatives, elles sont exclues de l'équation polynomiale quadratique du modèle (Bagewadi et al., 2016 ; Hosseinkhani et al., 2016).

Ce modèle est volontairement simplifié par élimination des effets jugés non significatifs dans l'analyse, ceci permet de manipuler plus facilement cette expression réduite tout en

gardant une qualité d'ajustement quasiment similaire. D'autre part, le signe positif de chacun des facteurs (temps X_1 et concentrations en source de carbone X_4) indique que les valeurs maximales de ces facteurs entraînent une réponse plus élevée qu'avec les valeurs minimales. Les facteurs pH et température possèdent un signe négatif ce qui indique que les valeurs minimales de ces facteurs se traduisent par une réponse plus élevée.

$$Y=32+29,88(X_1)-18,19(X_2)-13,19(X_3) +20,33(X_4)-25,24(X_2X_4)-37(X_3X_4) +30,54(X_3^2)$$

III.3 Effets d'interactions

Afin de comprendre les effets des différents facteurs et de leurs interactions sur la production enzymatique, des courbes à deux dimensions (2D) ont été tracées par le modèle statistiquement significatif.

➤ Interaction entre la température et la source de carbone

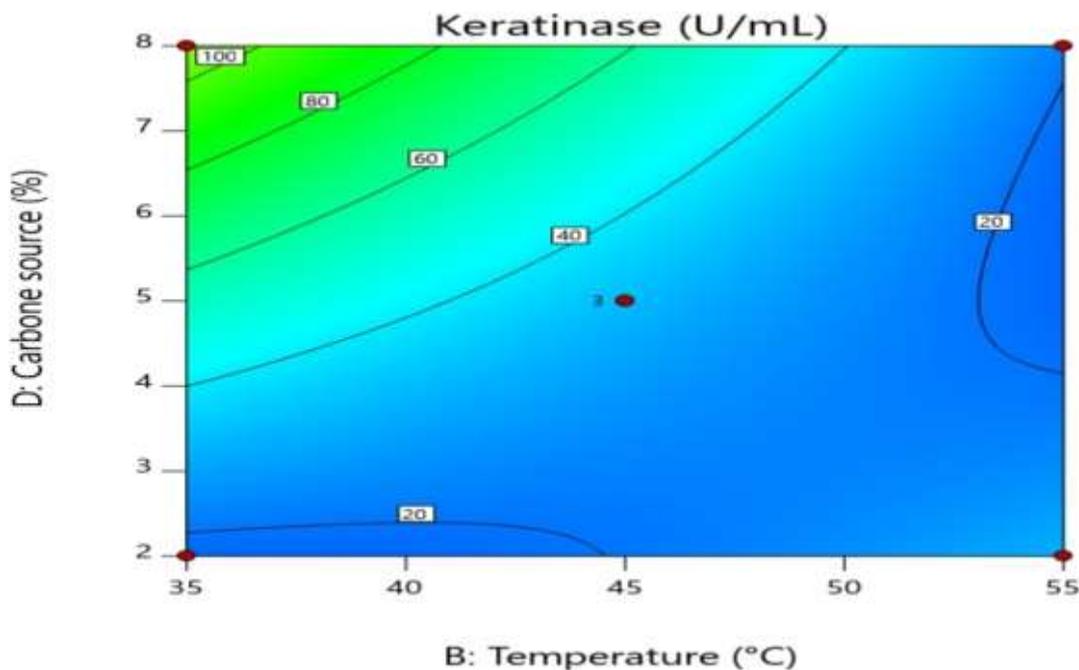


Figure 16 : Surface de réponse définissant l'effet d'interaction entre la température et la concentration en source de carbone.

Cette figure montre les différentes zones traduisant l'activité kérotinolytique de la souche étudiée.

La zone en bleu représente l'intervalle des valeurs entre la température et la source de carbone où l'on retrouve la zone d'activité la plus petite (0-40 U/ml) et donc une production de kératinases moins importante. Cet intervalle se situe dans toute la zone de température étudiée (35-55°C) ainsi que dans toute la zone de la concentration en source de carbone (2-8 %)

La zone en vert représente l'intervalle des valeurs entre la source de carbone et la température où l'on retrouve la zone d'activité la plus importante (60-100 U/ml) ce qui signifie une production élevée de kératinases. Cet intervalle se situe entre (35-46 °C) pour la température et à des niveaux hauts pour la source de carbone (5,4-8)%.

➤ Interaction entre le pH et la source de carbone

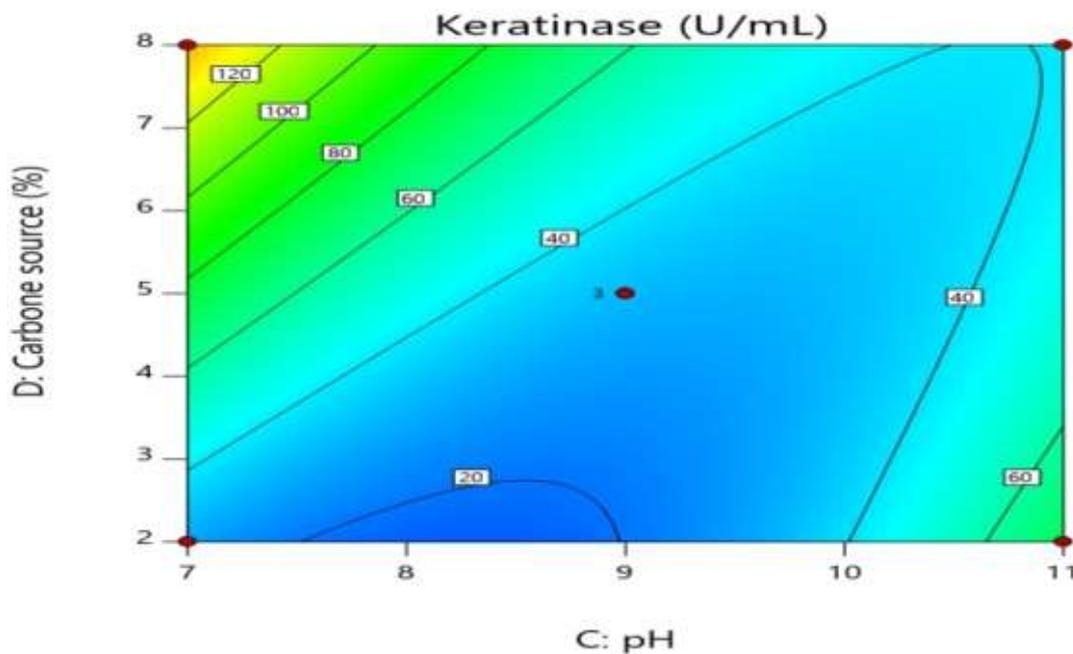


Figure 17 : Surface de réponse définissant l'effet d'interaction entre le pH et la source de carbone

Cette figure montre les différentes zones traduisant l'activité kératinolytique de la souche étudiée.

La zone en bleu représente l'intervalle des valeurs entre le pH et la concentration en source de carbone où l'on retrouve la zone d'activité la plus faible (0-40 U/ml) et donc une

production de kératinases moins importante. Cet intervalle se situe dans toutes les zones de pH (7-11) et concentrations en source de carbone entre (2-8%)

La zone en vert représente l'intervalle des valeurs entre la concentration en source de carbone et la température où l'on retrouve la zone d'activité la plus importante (60-120 U/ml) ce qui signifie une production élevée de kératinase. Cet intervalle se situe à des niveaux bas (7-9) pour le pH et à des niveaux hauts pour les concentrations en source de carbone (4,1-8%).

V. Test de signification de la regression

IV.1 Coefficient de détermination R^2

Lorsque l'échantillon est d'étendue assez faible, il est nécessaire d'apporter une correction pour l'erreur systématique. L'estimation de la force de la liaison par le coefficient de corrélation. Plus le coefficient de détermination s'approche de 1, plus le modèle est représentatif c'est-à-dire, meilleur.

Tableau VIII : Valeurs du coefficient de détermination R^2

Std. Dev.	20,32	R^2	0,8873
Mean	48,77	R^2 ajusté	0,7557

Le coefficient de détermination R^2 est un paramètre statistique qui nous indique la validité du modèle étudié. La mesure de la corrélation R^2 est égale à 0.8873 ce qui indique que 88.73% de la variabilité de la réponse peut être exprimé par le modèle ce qui signifie que uniquement 11.27% des variations ne sont pas exprimé par le modèle et la valeur du coefficient de détermination ajusté R^2 ajustée est égale à 0,7557.

IV.3 Analyse des résultats

Le tableau suivant donne les valeurs réelles obtenues et celles prédites données par le plan

Box-Behnken Design.

Tableau IX : Résultats des valeurs réelles obtenues et prédites par données par le plan Box- Behnken Design

Rang	Valeurs réelles	Valeurs prédites
1	108,00	105,53
2	21,00	21,63
3	35,00	31,46
4	9,00	17,35
5	66,00	84,26
6	38,00	73,94
7	8,00	1,74
8	29,00	40,61
9	96,00	108,51
10	31,00	32,00
11	80,00	64,13
12	0,0000	-12,87
13	0,0000	-0,3917
14	175,00	142,41
15	16,00	23,30
16	36,00	57,51
17	62,00	42,38
18	33,00	32,00
19	92,00	95,74
20	102,00	89,46
21	32,00	32,00
22	52,00	55,55
23	87,00	87,55
24	51,20	41,35
25	36,00	27,74
26	15,50	25,11
27	6,00	-3,29

La comparaison entre les valeurs prédites et réelles nous permet de juger de manière précise la qualité de l'ajustement réalisé.

D'après les résultats illustrés dans le tableau IX la plupart des valeurs réelles sont proches de celles prédites ce qui montre une forte corrélation entre celles-ci. Le modèle peut donc être jugé de qualité suffisante.

V. Validation du modèle

Afin de vérifier la validité du modèle, des conditions optimales sont proposées par le modèle BBD de l'activité kératinolytique. Trois solutions proposées sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau X : Conditions optimales pour une meilleure production de kératinases proposée par le modèle BBD

Essai n°	Temps (jours)	Température (°C)	pH	Source de carbone (%)	Activité Kératinase (U/ml)
1	6,856	38,048	7,148	7,674	182,927
2	6,387	35,000	11,000	8,000	124,278
3	7,000	35,000	10,999	2,522	118,994

Les résultats obtenus suite à la réalisation des essais proposés par le modèle dans les conditions opératoires prédites sont regroupés dans le tableau suivant

Tableau XI : Les valeurs prédites et les résultats des valeurs réelles de validation de test

Essais	Valeurs prédites (U/ml)	Valeurs réelles (U/ml)	Standard erreur
1	182,927	186	22.885
2	124,278	132.4	26.766
3	118,994	95	28.407

La bonne corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales après optimisation justifie la validité de la réponse du modèle et l'existence d'une valeur optimale à l'essai N°1 avec des conditions optimales d'un temps d'incubation de 6,856 jours, d'une température d'incubation de 38,048 °C, d'un pH de 7,148 et une concentration en source de carbone de 7,674 %, pour un taux de production d'enzymes kératinolytiques de l'ordre de 186 U/ml.

Les résultats obtenus montrent que les paramètres de culture sélectionnés en l'occurrence les concentrations en source de carbone, température, la valeur du pH et le temps d'incubation jouent un rôle important dans la production des kératinases par la souche ES41.

Le pH du milieu de culture est déterminant dans la production de kératinases, ainsi dans notre étude, pour augmenter l'activité kératinolytique de la souche *ES41*, la valeur optimale du pH doit être inférieure à la valeur moyenne dans l'intervalle étudié.

Les travaux réalisés par Victoria et Aruna en 2018 sur la souche *Bacillus thuringiensis strain Bt407* leur ont permis d'obtenir une activité kératinolytique de l'ordre de 60 U/ml à un pH neutre 7. Dipak et al (2012) ont montré que la production de protéases kératinolytiques chez la souche *Bacterium Under* est de 12 U/ml à une valeur de pH de 8. Lors d'une étude similaire réalisée en 2012 par Sivakumar et collaborateurs sur une souche de *Bacillus thuringiensis TS2* le résultat était beaucoup plus performant : 100 U/ml à un niveau de pH de l'ordre de 8.

La température d'incubation est un facteur environnementale très important dans la production de kératinases. Dans le présent travail pour augmenter l'activité kératinolytique de la souche *ES41*, la valeur optimale de la température doit être inférieure à la valeur moyenne (35 au lieu de 45) dans l'intervalle étudié, ainsi l'activité kératinolytique observée est de 186 U/ml à 38°C.

Aishwarya et Sunita ont obtenus en 2020, lors de travaux réalisés sur une culture de *Bacillus cereus N14*, une température d'incubation optimale de 35°C pour un meilleur rendement en production de kératinases de 17,96 U/ml.

Lors d'un travail de recherche similaire effectué, la température optimale d'incubation pour une production de protéases kératinolytiques de l'ordre de 100 U/ml chez la souche *Bacillus thuringiensis TS2* est de 50°C (**Sivakumar et al 2012**). Des travaux réalisés sur une culture de *Bacillus thuringiensis Bt407* ont donné lieu à une activité kératinolytique d'environ 52 U/ml à une température est de 37°C (**Victoria et Aruna 2018**).

**Conclusion
et
perspective**

Dans cette présente étude, on s'est intéressé à la production de kératinases thermostables à partir d'une souche d'actinomycète locale nommée ES41 appartenant à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université A/ Mira de Bejaia.

Le milieu de culture utilisé pour la production est le milieu liquide à base de farine de plumes (FBML), contenant cette dernière comme seule source de carbone et d'azote.

Dans le but d'optimiser certains paramètres opératoires influençant la production de kératinases par la souche étudiée, la méthode de plans d'expériences, quatre facteurs ont été choisis comme variables à savoir le temps d'incubation, la température d'incubation, le pH et la concentration en source de carbone.

La modélisation par le plan Box-Behnken avec interactions a montré que les facteurs X_1 et X_4 influencent positivement sur l'activité kératinolytique et les facteurs X_3 et X_2 influencent négativement sur l'activité kératinolytique de la souche étudiée et par conséquent ce sont des termes significatifs du modèle statistique utilisé. Ceci montre l'importance de ces variables pour une production élevée en kératinases chez la souche étudiée.

Concernant les effets des interactions entre les facteurs choisis, l'interaction la plus importante est remarquée pour les couples : température d'incubation et concentration en source de carbone et le couple pH et concentration en source de carbone.

La méthodologie de surface réponse a permis d'obtenir des valeurs optimales des variables étudiées de l'ordre de 7,674 % en source de carbone, une température de l'ordre de 38,048°C pendant un temps d'incubation de 6,856 jours et un pH de 7,148 pour une activité kératinolytique prédite de 182,927 U/ml.

L'utilisation des conditions optimales obtenues des variables étudiées a permis d'atteindre un niveau de production d'enzymes kératinolytiques de l'ordre de 186 U/ml. Ce résultat est proche de celui prédit par le plan Box-Behnken (182,927 U/ml) confirmant ainsi la validité du modèle statistique utilisé.

Les résultats obtenus à travers cette étude semblent prometteurs et incitent à poursuivre la recherche dans cette thématique en vue de définir une ligne de conduite pour une application à l'échelle pilote puis industrielle. Toutefois, il est intéressant de poursuivre les investigations autour des axes suivants :

Conclusion et Perspectives

- ❖ La récupération et valorisation des plumes de volailles à partir des abattoirs et des tueries.
- ❖ Préparation de milieux de cultures et de solutions kératiniques tamponnées en vue de réaliser des séances de travaux pratiques pour les étudiants en cycle de graduation.
- ❖ Tester d'autres substrats bon marché tels que la laine, les cornes, et les sabots d'animaux
- ❖ Purification et caractérisation des kératinases produites par la souche ES41.
- ❖ Optimiser la production des kératinases de la souche en impliquant d'autres paramètres opératoires tels que le taux d'inoculum, l'agitation et les composants du milieu de culture.

Références

Bibliographiques

A

Abdel-Fattah, A. M., El-Gamal, M. S., Ismail, S. A., Emran, M. A., & Hashem, A. M. (2018). Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16 : 311-318.

Aikat K., Bhattacharyya B. C. (2000). Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. *Process Biochemistry*, 35: 907-914.

Anbu, P., Gopinath, S. C. B., Hilda, A., & Annadurai, G. (2005). Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme and microbial technology*, 36 : 639-647.

Anbu, P., Gopinath, S. C. B., Hilda, A., Lakshmipriya, T., & Annadurai, G. (2007). Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource Technology*, 98(6), 1298-1303.

Anandan, R., Dharumadurai, D., & Manogaran, G. P. (2016). An introduction to actinobacteria. In *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. Intechopen.

B

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 : 1-43.

Bernal C, DiazI, & Coello, N. (2006). Response surface methodology for the optimization of Keratinase production in culture medium containing feathers produced by *Kocuria rosea*. *Canadian journal of microbiology*, 52 : 445-450.

Références Bibliographiques

Boudjella H. (2007). Étude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique El-Harrach (Alger).

Box G. E., & Behnken D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2 : 455-475.

Bragulla H. H., & Homberger D. G. (2009). Structure and functions of Keratin protein in simple, stratified, keratinize and cornified epithelia. *Journal of anatomy*, 214 : 516-559.

Brandelli A. (2005). Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic protease of *Chryseobacterium Sp.* *Ann Microbiol*, 55: 47-50.

Brandelli A. (2008). Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food and Bioprocess Technology*, 1 : 105-116.

Brandelli A., Daroit D. J., & Riffel A. (2010). Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 85 : 1735-1750.

Brandelli A., & Riffel A. (2005). Production of an Extracellular Keratinase from *Chryseobacterium Sp.* growing on raw feathers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8 : 35-42.

C

Cai, C. G., Lou, B. G., & Zheng, X. D. (2008). Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9 : 60-67.

Chauhan, A., & Devi, S. (2020). Optimization of cultural conditions for enhanced keratinase production by *Bacillus cereus* N14 obtained from the poultry farm of Himachal Pradesh (India). *IJCS*, 8 : 2610-2619.

Çalık P., Bilir E., Çalık G., & Özdamar T. H. (2002). Influence of PH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31 : 685-697.

Cavello, I. A., Hours, R. A., & Cavalitto, S. F. (2012). Bioprocessing of “hair waste” by *Paecilomyces lilacinus* as a source of a bleach-stable, alkaline, and thermostable keratinase with potential application as a laundry detergent additive: characterization and wash performance analysis. *Biotechnology Research International* : 369308.

D

Descamps, F., Brouta, F., Baar, D., Losson, B., Mignon, B., Monod, M., & Zaugg, C. (2002). Isolation of a *Microsporum canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed in vivo. *Journal of investigative dermatology*, 119 : 830-835.

Desai, A. J., & Dhala, S. A. (1969). Purification and properties of proteolytic enzymes from thermophilic actinomycetes. *Journal of bacteriology*, 100 : 149-155.

G

Goupy, J., Creighton, L. (2001). *Introduction aux plans d'expériences*. Paris: Donud, 12-13.

Goupy, J. (1999). *Plans d'expériences pour surfaces de réponses*. Paris : Donud. 409.

Références Bibliographiques

Goupy, J. (1988). *La méthode des plans d'expériences: optimisation du choix des essais & de l'interprétation des résultats.* Paris: Dunod.

Gross, R. (1956). WATER SOLUBLE COMPOUNDS (NON-KERATINS) ASSOCIATED WITH THE PLUMAGE OF THE PIGEON (COLUMBA LIVIA). *Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science*, 34 : 65-70.

Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual review of microbiology*, 37 : 189-216.

Goodfellow, M., Stanton, L. J., Simpson, K. E., & Minnikin, D. E. (1990). Numerical and chemical classification of Actinoplanes and some related actinomycetes. *Microbiology*, 136 : 19-36.

Goodfellow, M., & O'Donnell, A. G. (1989). Microbial Products: New Approaches. *Eds. Baumberg, S., I. Hunter & M. Rhods, Cambridge University Press, Cambridge*, 343-383.

Goodfellow, M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl.nov. In : Goodfellow et al., (Editors) Bergey's Manual of Systematic Bactériologie in *Actinobacteria*, second edition

Goupy J. (2006) les plans d'expérience, *Revue MODULAD*, 34.

Gupta, R., & Ramnani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied microbiology and biotechnology*, 70 : 21-33.

Garrity, G. M. (2007). Lilburn, TG Cole, JR Harrison, SH Euzeby, J. *Tindall, BJ.*

H

Habbeche A. (2014). Purification et caractérisation d'une kératinase thermostable KERAK-

Références Bibliographiques

29 chez une nouvelle souche d'Actinomycète. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba.

He, X. L., Song, C., Li, Y. Y., Wang, N., Xu, L., Han, X., & Wei, D. S. (2018). Efficient degradation of azo dyes by a newly isolated fungus *Trichoderma tomentosum* under non-sterile conditions. *Ecotoxicology and environmental safety*, 150 : 232-239.

Hames, B. D., Hooper, N. M., & Houghton, J. D. (2006). L'essentiel en biochimie. *Ed. BERTI, Paris*, 109-327.

Hameed, A., Keshavarz, T., & Evans, C. S. (1999). Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 74 : 5-8.

I

Ignatova, Z., Gousterova, A., Spassov, G., & Nedkov, P. (1999). Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 45 : 217-222.

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. Institut National Polytechnique, Toulouse.

K

Références Bibliographiques

Kembhavi, A. A., Kulkarni, A., & Pant A. (1993). Salt - tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. *Applied biochemistry and biotechnology*, 38 : 83-92.

Kubo, M., Murayama, K., Seto, K., & Imanaka, T. (1988). Highly thermostable neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of fermentation technology*, 66 : 13-17.

Kumar R., Balaji S., Uma T. S, Mandal A. B., & Sehgal P. K. (2010). Optimization of influential parameters for extracellular Keratinase production by *Bacillus subtilis* (MTCC9102) in solid state fermentation using horn meal—a biowaste management. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160 : 30-39.

Kumar C. G, & Takagi H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*, 17 : 561-594.

L

Łaba, W., Żarowska, B., Chorążyk, D., Pudło, A., Piegza, M., Kancelista, A., & Kopeć, W. (2018). New keratinolytic bacteria in valorization of chicken feather waste. *AMB Express*, 8 : 1-14.

Lin, X., Lee, C. G., Casale, E. S., & Shih, J. C. (1992). Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 : 3271-3275.

Lechevalier, M. P., De Bievre, C., & Lechevalier, H. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5 : 249-260.

Lange, L., Huang, Y., & Busk, P. K. (2016). Microbial decomposition of keratin in nature—

Références Bibliographiques

a new hypothesis of industrial relevance. *Applied microbiology and biotechnology*, 100 : 2083-2096.

M

Mariat, F., Sebald M. (1990). Les Actinomycetes. Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. *Edition Médecine- Science. Flammarion. France.*

Mercer, D. K., & Stewart, C. S. (2019). Keratin hydrolysis by dermatophytes. *Medical mycology*, 57 : 13-22.

Moritz, J. S., & Latshaw, J. D. (2001). Indicators of nutritional value of hydrolyzed feather meal. *Poultry Science*, 80 : 79-86.

Machehaleka F., Yakhlef. (2015). Production de la protéase alcaline par des moisissures isolées de source thermale sur milieu à base de plumes de poulet. Mémoire Université des frères Mentouri Constantine.

N

Ningthoujam, D. S., Kshetri, P., Sanasam, S., & Nimaichand, S. (2009). Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous actinomycetes. *World Appl Sci J*, 7 : 907-916.

Nouredine. L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université de Tizi Ouzou (Algerie).

Références Bibliographiques

Navard, P., & Haudin, J. M. (1985). Spinning of a cellulose methylmorpholine oxide solution. *Polymer process engineering*, 3 : 291-301.

O

Onifade, A. A., Al-Sane, N. A., Al-Musallam, A. A., & Al-Zarban, S. (1998). 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*, 66 : 1-11.

P

Pillai, P., & Archana, G. (2008). Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78 : 643-650.

Park, G. T., & Son, H. J. (2009). Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium. *Microbiological research*, 164 : 478-485.

Peña-Maravilla, M., Calixto-Romo, M. A., Guillén-Navarro, K., Sánchez, J. E., & Amaya-Delgado, L. (2017). Cellulases and xylanases production by *Penicillium citrinum* CGETCR using coffee pulp in solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16 : 757-769.

Peng, Z., Mao, X., Zhang, J., Du, G., & Chen, J. (2019). Effective biodegradation of chicken feather waste by co-cultivation of keratinase producing strains. *Microbial cell factories*, 18 : 1-11.

Références Bibliographiques

Prakash, P., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2010). Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 : 625-633.

Puhl, A. A., Selinger, L. B., McAllister, T. A., & Inglis, G. D. (2009). *Actinomadura keratinilytica* sp. nov., a keratin-degrading actinobacterium isolated from bovine manure compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59 : 828-834.

Q

Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K., & Meyer, A. S. (2020). Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechnology Advances*; 44 : 6-7.

R

Rai, S. K., Konwarh, R., & Mukherjee, A. K. (2009). Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline β -keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate. *Biochemical Engineering Journal*, 45(3), 218-225.

Rajput, R., Sharma, R., & Gupta, R. (2010). Biochemical characterization of a thiol-activated, oxidation stable keratinase from *Bacillus pumilus* KS12. *Enzyme research*, 132148.

Rangaswani G., Bagyaraj D.J. Bagyaraj D.G. (2004). Agricultural Microbiology *PHI:New Delhi.Pp:440.*

Robert, D., & Vian, B. (2013). *Eléments de biologie cellulaire-3e édition.* 33-69.

Références Bibliographiques

Rouse, J. G., & Van Dyke, M. E. (2010). A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*, 3 : 999-1014.

Ramnani, P., & Gupta, R. (2004). Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. *Biotechnology and applied biochemistry*, 40 : 191-196.

S

Sahoo, D. K., Das, A., Thatoi, H., Mondal, K. C., & Mohapatra, P. K. D. (2012). Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167 : 1040-1051.

Su, C., Gong, J. S., Qin, J., Li, H., Li, H., Xu, Z. H., & Shi, J. S. (2020). The tale of a versatile enzyme: Molecular insights into keratinase for its industrial dissemination. *Biotechnology Advances*, 45 : 2-3.

Sanglier, J. J., & Trujill, M. (1997). Substances bioactives produites par les actinomycètes, stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*, 12 : 269-276.

Sneath. P.H.A.(1989). Numerical taxonomy. *in* : Bergey's Manual of systematic Bacteriology,. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.), Volume 4. Williams and Wilkins Co., *pBaltimore*. 2303- 2305.

Staneck. J.L; and. Roberts. G.D. (1974). - Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. *Appl. Environ. Microbiol*, 28 (2), 226-231.

Références Bibliographiques

Suh, H. J., & Lee, H. K. (2001). Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *Journal of Protein Chemistry*, 20 : 165-169.

Sahoo, D. K., Das, A., Thatoi, H., Mondal, K. C., & Mohapatra, P. K. D. (2012). Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167 : 1040-1051.

Sokolovská, I., Rozenberg, R., Riez, C., Rouxhet, P. G., Agathos, S. N., & Wattiau, P. (2003). Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. *Applied and environmental microbiology*, 69 : 7019-7027.

T

Sivakumar, T., Shankar, T., Vijayabaskar, P., & Ramasubramanian, V. (2012). Optimization for keratinase enzyme production using *Bacillus thuringiensis* TS2. *Academic Journal of Plant Sciences*, 5 : 102-109.

Tiwary, E., & Gupta, R. (2010). Extracellular expression of keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15 in *Escherichia coli*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 : 8380-8385.

V

Van Den Berg, D. J. C. G., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M., Vreeker, R., Kamerling, J. P., ... & Verrips, C. T. (1995). Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and environmental microbiology*, 61 : 2840-2844.

Références Bibliographiques

VAILLÉ, J., & GOUPY, J. (2006). Construire et interpréter un Plan d'expériences factoriel complet. *Revue MODULAD*, 1(35).

Vidmar, B., & Vodovnik, M. (2018). Microbial keratinases: enzymes with promising biotechnological applications. *Food technology and biotechnology*, 56 : 312-328.

Victoria Uttangi and K. Aruna(2018). Optimization of Production and Partial Characterization of Keratinase Produced by *Bacillus thuringiensis* strain Bt407 Isolated from Poultry Soil *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* ISSN: 2319-7706 Volume 7 Number 04.

W

Williams, C. M., Richter, C. S., MacKenzie Jr, J. M., & Shih, J. C. (1990). Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 56 : 1509-1515.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., ... & Truper, H. G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37 : 463-464.

Y

Yang Y (2012) Skin-whitening and freckle-dispelling essence and preparation method Thereof. Patent: Cn102612104.

Annexes

Annexe I

Matériels utilisé

I.1. Appareillages

- Etuve (MEMMERT)
- Autoclave
- pH mètre (BANTE)
- Balance (RADWAG)
- Spectrophotomètre (SHIMADZU UV mini 1240)
- Rotavapeur (BUCHI ROTAVAPOR R-114)
- Plaque chauffante agitatrice (VELP SCIENTIFICA, TRADE RAYPA)
- Centrifugeuse (BEIJING ERA BEILI CENTRIFUGE CO, LTD)
- Bain Marie (JULABO)
- Vortex (VELP, SCIENTIFICA REFERENCE : ZX3)
- SHAKER (GFL)
- Microscope Optique (EUROMEX)

I.2. Verrerie

- Boîtes de pétri
- Tubes à essai
- Pipette Pasteur
- Eprouvettes, falquons, bécher, pipettes...

Annexe II

Milieu solide à Base de Farine de plumes (FBMS) (Williams et al., 1990)

- Farine de plume..... 20g
- K₂HPO₄..... 1g
- MgSO₄(7H₂O).....0.5g
- CaCO₃ 3g
- FeSO₄(7H₂O).....0.01g
- NaCl..... 0.5g
- Solution des éléments en trace.....1ml
- Agar..... 20g
- H₂O distillée.....1000ml
- pH..... 7,2

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

Milieu liquide à base de farine de plumes (FBML)

- Farine de plume 20g
- K₂HPO₄ 1g
- MgSO₄(7H₂O)..... 0,5g
- CaCO₃3g
- FeSo4(7H2O)..... 0,01g
- NaCl..... 0,5g
- Solution des éléments en trace..... 1ml
- Eau distillée..... 1000ml
- pH..... 7.2

Gélose au lait écrémé

- Peptone.....10g
- NaCl..... 05g
- Extrait de levure.....03g
- Agar..... 20g

Annexe III

Les solutions utilisées

Eau physiologique

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

Solution tampon tris HCl (0,05M)

En vue de préparer 180 ml de tampon tris-HCl à 0,05 M, 1,09 g de Tris hydroxyméthylaminométhane (tris) est mise dans 180 ml d'eau distillée. La solution est ajustée à pH 8 par une solution de HCl.

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

Pour la préparation d'une solution de 20 ml d'hydroxyde de sodium à 0,05mol/l, 0,04 g du NaOH sont dissous dans 20 ml d'eau distillée suivi d'une agitation vigoureuse. Le pH est ajusté à 8 par une solution de 0.1mol/l Tris et 0.1mol/l HCl.

Solution d'acide chlorhydrique à (1N)

On prend 8,28 ml du HCl (37%) et on dilue avec de l'eau distillé jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 ml de la solution acide à 1N.

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

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

Annexe IV

I. Domaine d'un facteur

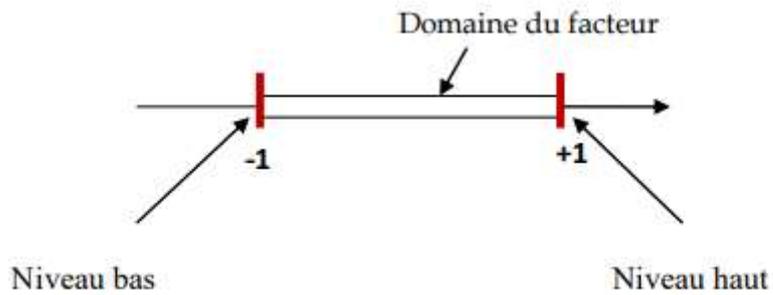


Figure 1 : Domaine d'un facteur

II. Domaine d'étude :

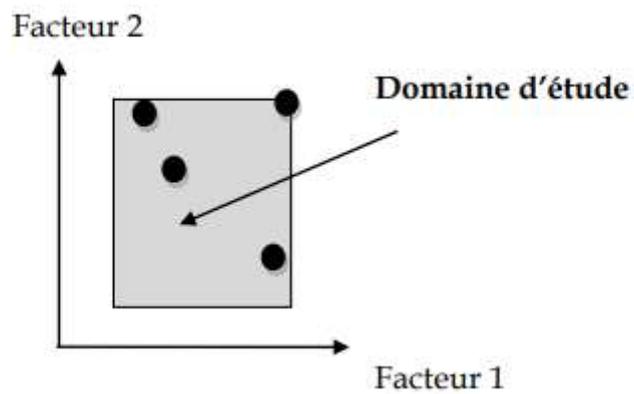


Figure 2 : les domaines de tous les facteurs forment le domaine d'étude

Annexe V :

Tableau I : 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 ₂	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	19.4	19.5	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

V₁ degrés de liberté au numérateur

V₂ degrés de liberté au dénominateur

Résumé

Résumé

Les kératinases microbiennes sont devenues importantes sur le plan biotechnologique elles ciblent l'hydrolyse d'un polypeptide structurel hautement rigide et fortement réticulé « kératine ». Notre souche d'actinomycète ES41 productrice de kératinases est isolée et repiquée sur un milieu solide à base de farine de plumes (FBMS). L'activité protéolytique de la souche est testée sur une gélose à base de caséine. L'activité kératinolytique est mesurée dans un milieu liquide à base de farine de plumes (FBML). Des modèles statistiques expérimentaux ont été utilisés pour optimiser les paramètres influençant l'activité kératinolytique de la souche étudiée. Dans le but d'améliorer le rendement de production enzymatique, le plan Box-Behnken à quatre facteurs à savoir, le temps d'incubation, la température, le pH et la concentration de source de carbone est utilisé. Les conditions optimales obtenues sont : 6,856 jours pour le temps d'incubation, 38,048 °C pour la température d'incubation, 7,148 pour le pH et 6,856 % pour la concentration en source de carbone pour un taux de production de 182,927 U/ml. Le test de validation modèle en utilisant les optimums obtenus a donné lieu à une production enzymatique de l'ordre de 186 U/ml confirmant ainsi le modèle utilisé.

Les mots clés : Actinobactérie, Kératinases, Farine de plumes, Optimisation, Box-Behnken.

Abstract

Microbial keratinases have become important in biotechnology as they target the hydrolysis of a highly rigid and highly cross-linked structural polypeptide "keratin". Our keratinase-producing actinomycete strain ES41 is isolated and subcultured on a feather meal-based solid medium (FBMS). The proteolytic activity of the strain is tested on casein-based agar. The keratinolytic activity is measured in a liquid feather meal medium (FBML). Experimental statistical models were used to optimize the parameters influencing the keratinolytic activity of the studied strain. In order to improve the enzymatic production yield, the Box-Behnken design with four factors namely, incubation time, temperature, pH and carbon source concentration is used. The optimal conditions obtained are: 6.856 days for incubation time, 38.048°C for incubation temperature, 7.148 for pH and 6.856% for carbon source concentration for a production rate of 182.927 U/ml. The model validation test using the obtained optimums resulted in an enzyme production of the order of 186 U/ml confirming the model used.

Keywords: Actinomycete, Keratinases, Feather meal, Optimization, Box-Behnken.