



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la  
Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**Département :** Microbiologie

**قسم :** الميكروبيولوجيا.

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master  
Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Ecologie et Environnement

**Spécialité :** Ecologie Microbienne

Intitulé :

Optimisation et modélisation de la production de  
la Kératinase par la souche *Actinopolyspora* sp.

**Présenté et soutenu par :** *HAFID Ouafa*

**Le :** 08/07/2019

*BENFETIMA Meriem*

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** M. BENHIZIA Y. (Professeur - UFM Constantine).

**Rapporteur :** M. KITOUNI M. (Professeur-UFM Constantine).

**Examineurs :** Mme. GUERGOURI I. (MAA - UFM Constantine).

Année Universitaire

2018 – 2019

## Table des matières

### Remerciements

المخلص.....i

Résumé.....ii

Abstract.....iii

Liste des tableaux.....iv

Liste des figures.....v

INTRODUCTION ..... 1

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1.Traitement et valorisation des déchets..... 2

1.1 Les différentes catégories de déchets .....2

1.2 Gestion des déchets .....2

2. Les principales techniques de gestions..... 3

2.1 Le compostage .....3

2.2 L'incinération.....4

2.3 Le recyclage.....4

3. Les déchets agricoles..... 5

3.1 Valorisation des déchets de l'agriculture.....6

3.2 Valorisation des déchets de l'aviculture .....7

4. Les actinomycètes ..... 7

4.1Généralité .....7

4.2 Caractéristiques morphologiques.....8

4.3 Les spores .....8

4.4 Ecologie.....9

4.5 Intérêt des actinomycètes dans la biotechnologie .....10

4.6 Production de substances bioactives .....11

4.7 Production d'enzymes .....12

4.8 Les Protéases .....14

5. Les kératinases ..... 15

5.1 Sources des kératinases .....15

5.2 Propriétés des kératinases.....16

5.3 Le mécanisme d'action .....16

6. Domaines d'application ..... 17

6.1 Domaine de l'agriculture.....17

6.2 Fabrication d'aliments pour les animaux.....17

6.3 Autres applications .....18

7. La kératine..... 18

7.1 Structure et classification des kératines.....18

7.2 Sources kératiniques.....20

7.2.1 La kératine des plumes .....21

7.2.2 Structure des plumes.....21

### MATERIEL ET METHODES

1. Origine de la souche..... 22

<b>2. La revivification et repiquage de la souche .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Conduite de la fermentation .....</b>	<b>22</b>
3.1 Préparation des milieux de cultures.....	22
3.2. Préparation de l'inoculum et ensemencement des milieux .....	26
<b>4. Dosage des sucres totaux selon la méthode de Dubois <i>et al.</i>, 1956.....</b>	<b>26</b>
<b>5. Dosage des protéines avant et après fermentation.....</b>	<b>26</b>
<b>6. Dosage de l'activité kératinolytique .....</b>	<b>26</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>1. Culture de la souche .....</b>	<b>28</b>
<b>2. Taux des sucres (avant fermentation) .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Taux des protéines totales .....</b>	<b>29</b>
3.1 Taux des protéines totales avant fermentation .....	29
3.2 Taux des protéines totales après fermentation.....	29
3.3 Production des kératinases .....	32
<b>4. Optimisation de la production des protéines.....</b>	<b>33</b>
4.1 Modélisation statistique de la production de protéines .....	33
4.1.1 Diagramme de Pareto des protéines .....	37
4.1.2 Graphiques de contour des réponses .....	38
4.2 Modélisation statistique de la production de kératinase .....	40
4.2.1 Diagramme de Pareto de la kératinase.....	44
4.2.2 Représentations et analyse des surfaces de réponses .....	45
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>49</b>
<b>ANNEXES</b>	

## **Remerciements**

Nos remerciements les plus sincères vont à monsieur KITOUNI (professeur au département de microbiologie à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Mentouri Constantine) notre encadrant qui a accepté de diriger ce travail. Nous lui sommes également reconnaissantes pour le temps conséquent qu'il nous a accordé, ses Qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie.

Nos vifs remerciements vont aussi à Monsieur BENHIZIA (professeur au département de microbiologie à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Mentouri Constantine) de nous avoir honoré de présider ce jury

Nos remerciements vont également à madame GUERGOURI (Maitre-assistant classe A au département de microbiologie à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Mentouri Constantine) d'avoir accepté d'examiner notre mémoire et faire partie du jury.

## **Remerciements**

Nous ne remercierons jamais assez toute l'équipe du laboratoire de génie-microbiologie et applications de leur patience et pour leur amabilité inégalée.

Que tous les professeurs qui nous ont enseigné durant toutes ces années trouvent ici l'expression de nos remerciements les meilleurs.

A nos familles

A nos amis

## الملخص

في سياق تبيين بعض المنتجات الثانوية للأغذية الزراعية (أسس القهوة، ريش الدواجن، قشور البطاطا). تم إختبار سلالة أكتينوميستال *Actinopolyspora sp.* لقدرتها على إنتاج الكيراتيناز في وسائط التخمير المصممة من النفايات، عن طريق تبني منهجية التصميم التجريبية، وخاصة الخطط المركبة المركزية (CCD) و منهجية أسطح الإستجابة (RSM) لتقييم آثار أسباب القهوة، ريش الدواجن، قشور البطاطا و كبريتات الأمونيوم على إنتاج الإنزيم. كشفت النتائج التي تم الحصول عليها عن وجود نشاط للإنزيم كيراتيناز في جميع الوسائط مع تركيزات مختلفة حيث سجل الحد الأقصى للنشاط في الإختبار 15 بقيمة 3,25 ملغ/ مل/ دقيقة. المنهجية المعتمدة أقرت أن ثلاث عوامل من أصل أربع إجابات (أسس القهوة، ريش الدواجن، قشور البطاطا و كبريتات الأمونيوم) فقط لها تأثيرات فعالة. التأثير الخطي لكبريتات الأمونيوم على إنتاج البروتين والتأثيرات الثنائية لأسس القهوة مع كبريتات الأمونيوم من جهة و قشور البطاطا و كبريتات الأمونيوم من جهة أخرى على إنتاج الكيراتيناز. نتيج لنا النتائج المتحصل عليها القول إن السلالة المدروسة منتجة للكيراتيناز.

**الكلمات المفتاحية:** أكتينوميستات، كيراتيناز، *Actinopolyspora sp.* ، نفايات، CCD ، RSM

## Résumé

Dans un contexte de valorisation de quelques sous-produits agro-alimentaires (marc de café, plumes de volailles, épluchures de pomme de terre), la souche actinomycetale *Actinopolyspora* sp. a été testée pour son aptitude à produire la kératinase dans des milieux de fermentation conçus à partir de ces déchets en adoptant la méthodologie des plans d'expériences, en particulier la Méthodologie des Surfaces de Réponses (RSM) et les Plans Composites Centrés (CCD), pour évaluer les effets du marc de café, des plumes de volaille, des épluchures de pomme de terre et du sulfate d'ammonium sur la production de l'enzyme. Les résultats obtenus ont révélé une activité kératinolytique dans tous les milieux néanmoins avec des concentrations différentes où l'activité maximale est atteinte dans l'essai 15, avec une valeur de 3,25 mg/ml/min. La méthodologie adoptée nous a permis de conclure que seuls trois parmi quatre facteurs (marc de café, les plumes de volaille, les épluchures de pomme de terre et le sulfate d'ammonium) ont des effets significatifs. L'effet linéaire du sulfate d'ammonium, sur la production des protéines totales et les effets combinés, du marc de café avec le sulfate d'ammonium d'un côté et les épluchures de pomme de terre avec le sulfate d'ammonium de l'autre sur la production de kératinase. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que la souche étudiée est productrice de kératinase.

**Mots clés :** Actinomycète, déchets, kératinase, *Actinopolyspora* sp., CCD, RSM.

## **Abstract**

In a context of valorization of some agri-food by-products (coffee grounds, poultry feathers, potato peelings), the actinomycetal strain *Actinopolyspora* sp. was tested for its ability to produce keratinase in fermentation media designed from waste by adopting the experimental design methodology, in particular the Response Surface Methodology (RSM) and the Centered Composite Plans (CCD), to evaluate the effects of coffee grounds, poultry feathers, peelings potato and ammonium sulfate on the production of the enzyme. The results obtained revealed a keratinolytic activity in all the media nevertheless different concentrations were observed, the maximum activity is reached in the test 15, with a value of 3,25 mg / ml / min. The methodology adopted concluded that only three among four factors (coffee grounds, poultry feathers, potato peels and ammonium sulphate) have significant effects. The linear effect of ammonium sulphate on total protein production and the combined effects of coffee grounds with ammonium sulphate on one side and potato peelings with ammonium sulphate in the other on the production of keratinase. The results obtained allow us to conclude that the studied strain is keratinase producing.

**Key words** : Actinomycete, wastes, k eratinase, *Actinopolyspora* sp., CCD, RSM



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Différences principales entre les métabolites primaires et secondaires (François et Corvini, 2000).	11
Tableau 2 : Les diverses enzymes produites par les actinobactéries et leurs différentes applications industrielles (Anandan <i>et al.</i> , 2016).	13
Tableau 3 : Une comparaison entre $\alpha$ - et $\beta$ -kératine basée sur leur structure et leur distribution (Shah <i>et al.</i> , 2019).	19
Tableau 4 : Composition des différents milieux de cultures.	25
Tableau 5 : Plan composite centré de Box et Wilson à quatre facteurs, avec le taux de protéines produites par la souche <i>Actinopolyspora</i> sp. comme réponse.	34
Tableau 6 : Effets estimés des variables et coefficient de régression de la production de protéines par la souche <i>Actinopolyspora</i> sp.	35
Tableau 7 : Analyse de la variance pour la production des protéines du plan composite centré.	36
Tableau 8 : Plan composite centré de Box et Wilson à quatre facteurs, avec l'activité kératinolytique de la souche <i>Actinopolyspora</i> sp. Comme réponse.	40
Tableau 9 : Effets estimés des variables et coefficient de régression de la production de kératinase par la souche <i>Actinopolyspora</i> sp.	42
Tableau 10 : Analyse de la variance pour l'activité kératinolytique du plan composite centré.	43

## Liste des figures

Figure 1: Production de déchets par pays, en kg par jour et par habitant selon la banque mondiale (Futura planète, 2018).	3
Figure 2 : Schéma simplifié du mécanisme réactionnel mis en jeu lors du compostage (Debenest, 2015).	4
Figure 3 : Une réduction de 30% des déchets au Japon (Nagoya) grâce au recyclage efficace (Our world, 2008).	5
Figure 4 : Processus de valorisation des sous produits biodégradables dans l'agriculture urbaine et périurbaine (Faust Kakai <i>et al.</i> , 2010).	6
Figure 5 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes montrant le mycélium substrat et mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores. (Qinyuan Li <i>et al.</i> , 2016).	8
Figure 6 : Production de spores uniques et spores dans les chaînes courtes Monospores : (A) Micromonospora, (B) Thermomonospora, (C) Saccharomonospora, (D) Thermoactinomyces. Dispores : (E) Microbispora. Oligospores : (F) Nocardia brevicatena, (G) Catellatosp.	9
Figure 7 : Quelques enzymes produites par les actinobactéries. a. Amylase, b. Protéase et c. Lipase. La zone d'inhibition autour de l'actinobactérie inoculé témoigne la production d'une enzyme particulière (Anandan <i>et al.</i> , 2016).	12
Figure 8 : a- Représentation schématique de la protéine de Kératine en 3D. b- l'hélice $\alpha$ résulte de la torsion des chaînes polypeptidiques en vissage et c- La structure de la feuille $\beta$ résulte de l'extension et de l'étirement maximum des chaînes polypeptidiques. (Shah <i>et al.</i> 2019).	20
Figure 9 : Anatomie de la plume (Kazilek, 2017).	21
Figure 10: Plumes avant et après lavage.	23
Figure 11 : Epluchures de pomme de terre avant et après broyage.	23
Figure 12 : Le marc du café avant et après séchage.	23
Figure 13 : Croissance de la souche sur milieu ISP5 solide et liquide.	28
Figure 14 : Histogramme représentant les différents taux des sucres totaux des 27 milieux avant fermentation.	28
Figure 15 : Histogramme représentant les taux des protéines totales avant fermentation dans les différents milieux de culture.	29
Figure 16 : La séparation de la biomasse.	30

Figure 17 : Histogramme représentant le dosage des protéines totales après fermentation.	31
Figure 18 : Histogramme groupé du dosage des protéines avant et après fermentation.	32
Figure 19 : Histogramme représentant les résultats de l'activité kératinolytique dans les essais.	33
Figure 20 : Diagramme de Pareto montrant l'effet linéaire, quadratique et croisé du Mc, EP, PV et SA sur la production de protéines par <i>Actinopolyspora</i> sp.	37
Figure 21 : Contours des surfaces de réponse de la production de protéines par <i>Actinopolyspora</i> sp.	39
Figure 22 : Diagramme de Pareto montrant l'effet linéaire, quadratique et croisé du Mc, EP, PV et SA sur la production de la kératinase par <i>Actinopolyspora</i> sp.	44
Figure 23 : Valeurs prédites et réelles des composés des milieux de culture et de la production de kératinase.	45
Figure 24 : Model de surface de réponse de la kératinase (mg/ml/min) produite par la souche <i>Actinopolyspora</i> sp.	46

# **INTRODUCTION**

---

La croissance démographique a fait que l'activité humaine demeure le principal générateur de déchets. Les chiffres ont atteint des proportions alarmantes (3,4 milliards de tonnes chaque année). Hélas l'accumulation des déchets est en perpétuelle évolution (Banque mondiale, 2018). Ceci ne peut avoir que des conséquences néfastes sur la santé publique et sur l'environnement car il contamine l'air, l'eau et le sol (Tchobanoglous *et al.*, 1993). Pour pallier ce problème, plusieurs techniques de gestion des déchets sont utilisées : l'incinération, la mise en décharge, le recyclage ou encore le compostage. Les déchets organiques sont les plus abondants et regroupent tous les déchets fermentescibles produits par les particuliers. La gestion de ce type de déchets se fait généralement de manière biologique par compostage (Lacour *et al.*, 2011).

Les microorganismes sont les principaux acteurs de la décomposition des déchets agricoles. Ils sont hautement performants et sont souvent exploités en biotechnologie pour la production de molécules bioactives. Les actinomycètes se démarquent des autres groupes bactériens par leur capacité à produire des antibiotiques et des enzymes ayant une activité biologique assez importante (Rugthaworn *et al.*, 2007).

A cet égard, la présente étude visera à valoriser quelques déchets agroalimentaires par le biais d'une souche actinomycétale *Actinopolyspora* sp. afin d'augmenter le rendement en kératinase, une méthodologie de surface de réponse (RSM) a été introduite pour quantifier et interpréter les effets avec précision. Ces surfaces décrivent la façon dont les variables (facteurs) affectent la réponse (production de métabolites). Elles fournissent des informations sur les relations entre les variables testées ainsi que l'effet combiné de toutes les variables sur la réponse (Box et Draper, 1987).

Nous réserverons une partie théorique à la valorisation des déchets et à la description biotechnologique des actinomycètes et de l'enzyme kératinolytique. Alors que la partie expérimentale visera à optimiser les milieux de cultures pour la production de protéines et de kératinase qui constitue l'objectif principal de notre travail.

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1. Traitement et valorisation des déchets**

### **1.1 Les différentes catégories de déchets**

Le déchet est tout matériel destiné à l'abandon. Il peut s'agir d'un résidu d'un processus de production, de transformation ou de de tout autres biens indésirables (Futura planète, 2018). L'activité humaine est considérée comme le principal producteur de déchets. La présence des déchets dans la nature à une influence négative sur l'hygiène environnementale. L'insalubrité engendre ainsi l'émergence et la propagation des maladies (Kassangye Kangoy *et al.*, 2016). Pour y remédier les déchets ont été classés en plusieurs catégories. Selon leurs degrés de dangerosité pour l'environnement, leurs natures et leurs provenances. Les différentes classes sont comme suit : les déchets municipaux qui constituent la classe la plus importante en regroupant les déchets ménagers issu de l'activité domestique ou autre, suivi par les déchets industriels qui comportent des déchets solides ou liquides selon l'activité ainsi que les déchets inertes, d'autres catégories de déchets sont à citer comme les déchets agricoles (industrie agro-alimentaire, culture ou élevage) qui ont une grande valeur économique (Balet, 2016). Il existe encore une autre catégorie qui est destinée aux déchets dangereux, tel que les produits chimiques, les déchets radioactifs, etc. (Blackman, 2001).

### **1.2 Gestion des déchets**

L'activité humaine génère des quantités de déchets indénombrables. L'étude prospective de la banque mondiale montre que la production de déchets va augmenter de 70% au cours des 30 ans à venir pour atteindre le chiffre alarmant de 3,4 milliards de tonnes produites chaque année dans le monde (La banque mondiale, 2018). Sachant que la production de déchets ne va pas diminuer en raison de la croissance démographique et économique, des mesures ont été prise par les autorités afin de gérer et de valoriser ces déchets, et ce depuis les années 1970 (Rhyner *et al.*, 1995) Il est à noter que la production de déchets est relative à la richesse du pays (Figure1). Cependant la gestion des déchets dans les pays en voie de développement a connu le jour grâce à la sensibilisation mondiale (Ben ammar, 2008). En Algérie par exemple, la gestion du déchet est défini comme toute opération en relation avec le ramassage ou la collecte du déchet, le tri (la sélection des déchet selon leur nature et le traitement qui vont subir), la valorisation (elle consiste en l'utilisation ultérieure du déchet grâce au recyclage ou compostage etc.), l'élimination du déchet (ce traitement utilise des procédé physico-chimique comme l'incinération) et l'enfouissement

(il est destiné au déchets ultime qui ne peuvent être traité) (Djemaci, 2012 ; Agence nationale des déchets, 2019)

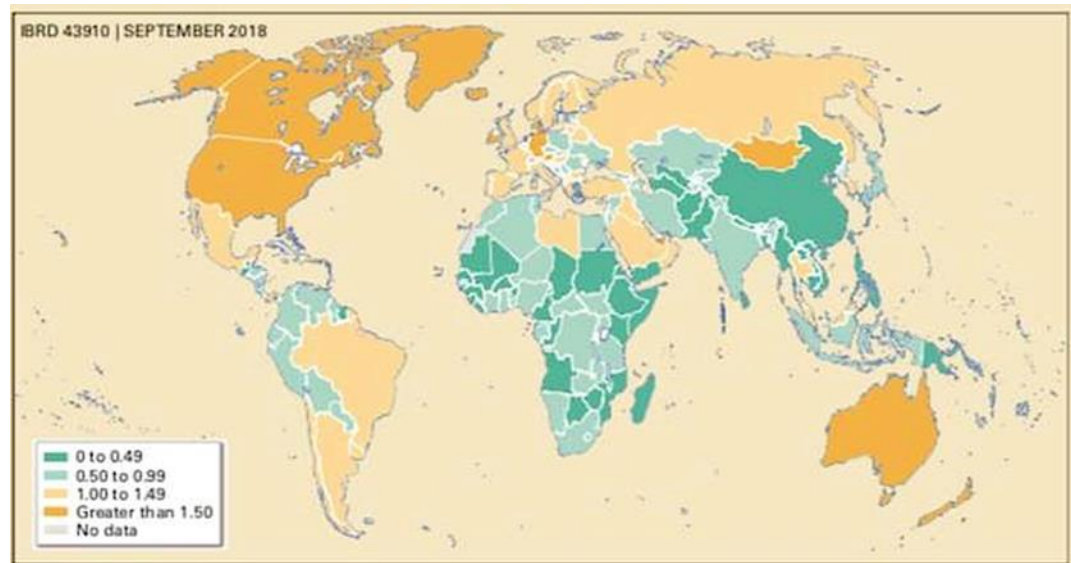


Figure 1: Production de déchets par pays, en kg par jour et par habitant selon la banque mondiale (Futura planète, 2018).

## 2. Les principales techniques de gestions

Pour pallier l'insalubrité environnementale qui met en péril la biodiversité des écosystèmes, une panoplie de techniques de traitements est proposée comme alternative à la décharge brute. Les principales méthodes sont les suivantes : recyclage, compostage incinération.

### 2.1 Le compostage

C'est la dégradation biologique des déchets organique à l'aide de microorganismes en présence d'oxygène et d'humidité (Figure 2), contrairement à la méthanisation qui se fait en anaérobiose. Le produit issu du compostage est appelé le compost. C'est un fertilisant proche du terreau et a une couleur brune. Il est utilisé dans l'agriculture pour améliorer le taux de matière organique (Agence de protection environnementale des états unis, 2017). Il est nécessaire de savoir que les microorganismes qui dégradent la matière organique (végétale et animale) ne sont pas pathogène (Zegels, 2018).



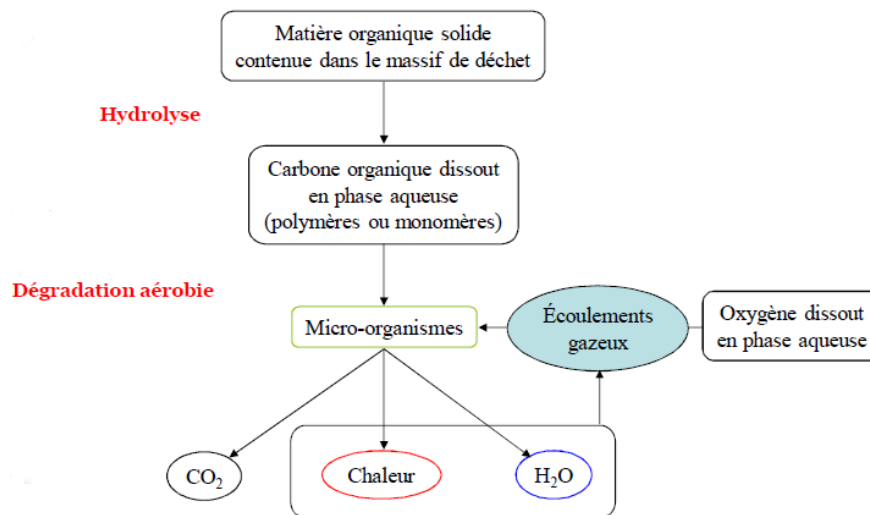


Figure 2 : Schéma simplifié du mécanisme réactionnel mis en jeu lors du compostage (Debenest, 2015)

## 2.2 L'incinération

L'incinération est par définition la combustion contrôlée des déchets à très haute température. Les déchets sont réduits en cendres, gaz et en énergie thermique qui peut être utilisée ultérieurement. La combustion complète des déchets génère des gaz à effet de serre comme le dioxyde de carbone, l'anhydride sulfureux ainsi que la vapeur d'eau (Rhyner *et al.*, 1995). L'incinération est la solution souvent promue par les pays développés (Ben ammar, 2008). C'est la solution d'urgence pour remédier à la mise en décharge, Bien qu'elle soit polluante, cette alternative reste très répandue dans le monde car elle permet un gain de surfaces et une élimination des masses de déchets en un temps record (Balet, 2016).

## 2.3 Le recyclage

Le recyclage est un procédé qui consiste à récupérer et réduire les déchets en les réintroduisant dans le cycle primaire, tout en produisant un matériau de qualité équivalente ou moindre au produit initial (Balet, 2016). Le recyclage est une technique ancienne qui a débuté dans les années 1940 avec le recyclage du nylon et caoutchouc et autres matériaux pour la production d'armes, et pris fin après la 2<sup>ème</sup> guerre mondiale. Cependant l'avènement du mouvement écologiste en 1970 et la hausse de la production de déchets imposent l'utilisation de ce procédé (Miller, 2009). C'est une technique salvatrice pour l'environnement (Figure 3) et dispose d'un bel avenir, particulièrement dans le recyclage du verre, de l'aluminium, du papier et du plastique (Beazley, 2009).

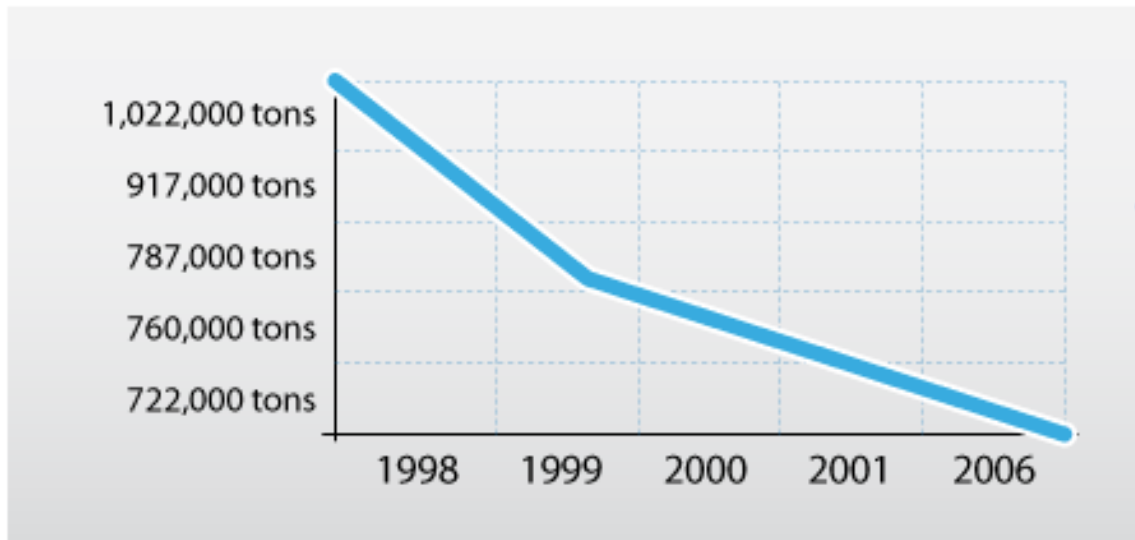


Figure 3 : Une réduction de 30% des déchets au Japon (Nagoya) grâce au recyclage efficace (Our world, 2008)

### 3. Les déchets agricoles

Le domaine agricole est l'un des importants producteurs de déchets. Selon Loehr (1974) les déchets issus de l'agriculture seraient largement supérieurs aux déchets municipaux. De ce fait le traitement et la valorisation de ces déchets s'avèrent une tâche difficile vu le grand volume généré (Loehr, 1974). Cette activité génère essentiellement des résidus de récolte et des déchets animaux et végétaux. Autrement dit ce sont des excédents de la production agricole qui n'ont pas été utilisés de manière efficace (Rhyner *et al.*, 1995).

Néanmoins les déchets d'un secteur peuvent devenir la matière première d'un autre (Figure 4). C'est grâce à la nature fermentescible des déchets que leur utilisation polyvalente devient possible. Le retour au sol est la gestion privilégiée dans le traitement biologique soit par compostage ou par méthanisation (Balet, 2016). D'autres méthodes permettent de remettre les excès de déchets à un usage bénéfique. La réutilisation des résidus du secteur agricole et agroalimentaire s'avère une tâche réelle à notre époque. Les déchets des végétaux et des animaux contiennent des éléments utiles qui peuvent être traités pour la production de biofertilisants, de composte pour la remise en culture du sol ou encore du biocarburant (Aladjadjiyan, 2018).

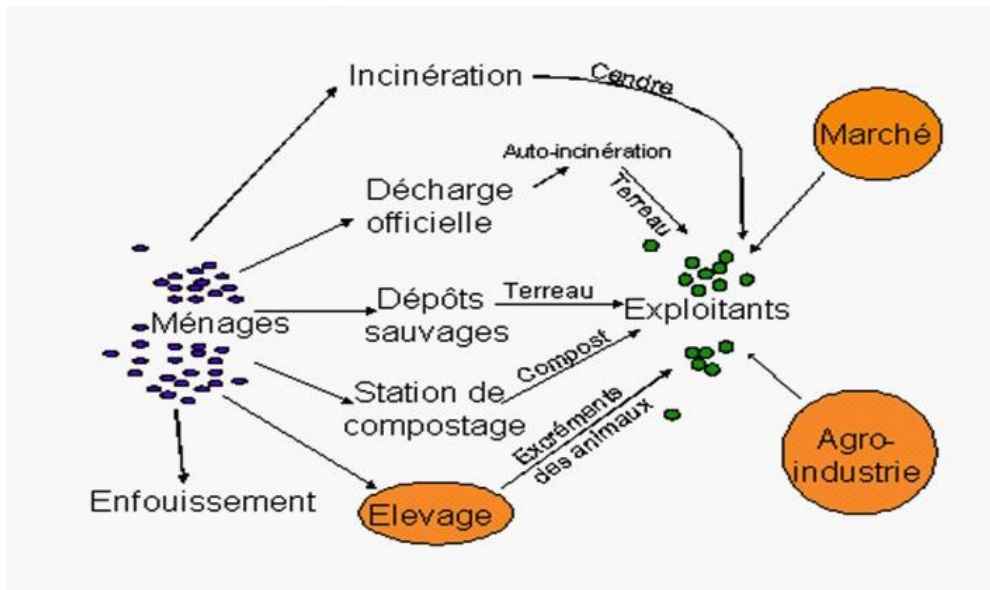


Figure 4 : Processus de valorisation des sous-produits biodégradables dans l'agriculture urbaine et périurbaine (Faust Kakai *et al.*, 2010).

### 3.1 Valorisation des déchets de l'agriculture

L'élevage est un élément substantiel de l'activité agricole. C'est un secteur privilégié car il profite d'une attention particulière consistant à améliorer les rendements des bovins, des ovins et des caprins, mais aussi les porcs, les lapins et les volailles. Chaque espèce a sa place et sa particularité dans cet écosystème. Alors que l'agriculteur offre abri et nourriture, les animaux quant à eux offrent des excréments (urine, fiente, bouse, crotte ou crottins) (Hollard *et al.*, 2015). Ces déchets s'avèrent être une source de fertilisants naturels riches en matière organique et en sels minéraux. La quantité en azote, phosphore, zinc, potassium et carbone varie en fonction de l'alimentation. Dans le cas des porcs, un modèle a été adopté en France en vue de traiter le lisier.

C'est la séparation, l'épuration et le compostage qui sont en tête des méthodes de traitement. Quant aux déjections avicoles qui ne constitue que 2 à 3% de la masse des déjections animales, elles sont stockées et transformées, car elles s'avèrent être dix fois plus performantes que les déjections porcine et bovine en terme de richesse en azote et en phosphore (Espagnole, 2010). Hormis l'apport minérale et la qualité fertilisante du lisier, les déchets de l'agriculture sont aussi utilisés dans la production de gaz. Les excréments des bovins, des porcs, la fiente de volaille ainsi que les déchets agroalimentaires constituent la matière première du biogaz. Le meilleur exemple à cet égard concerne la production d'électricité et de chaleur (Görisch, 2008).

### **3.2 Valorisation des déchets de l'aviculture**

Les déchets issus de l'activité agricole sont nombreux, en premier lieu se trouve la fiente qui est réputée pour sa forte teneur en minéraux, elle est donc utilisée comme fertilisant biologique. Elle rentre tout naturellement dans la composition du fumier frais et le fumier composté. Ces déjections peuvent subir une combustion dans des centrales de production d'électricité. Cependant les inconvénients de ce mode de valorisation (production de gaz à effet de serre) nécessitent d'être réexaminés au vu de préserver l'environnement (Espagnole, 2010).

Les déjections avicoles affichent une forte popularité au seins du secteur avicole faisant ombre sur les autres déchets de l'aviculture. Les plumes par exemples se positionnant en seconde place ne connaissent que peu de valorisation. Elles finissent souvent dans des décharges. Néanmoins parfois elles sont recyclées en fin duvet ou transformées en farine pour servir de nourriture à d'autres animaux domestiques. Ce n'est qu'au cours de ces dernières années que des chercheurs de l'université de Nabraska en Amérique ont eu l'idée ingénieuse de fabriquer du plastique à partir de plumes de poulets, une alternative aux hydrocarbures. Les plumes comme les fanères (ongle, cheveux, cornes...) sont composées essentiellement de kératine. Cette dernière a été traitée avec des produits chimiques et subi des polymérisations pour former de longues chaînes caractéristique du plastique. Le plastique biologique est recyclable et très facile à traiter. Un simple chauffage suffit pour le remodeler (Futura science, 2011).

## **4. Les actinomycètes**

### **4.1 Généralité**

Le mot actinomycète peut être scindé en deux parties *aktino* du grec qui signifie rayon et *mycètes* qui veut dire champignons. Ensemble les deux mots désignent champignons rayonnants ou à rayons (Kitouni, 2007). Les hyphes résultant de la croissance des actinomycètes ont longtemps prêté à confusion. Alors que les bactériologistes et les mycologistes se disputaient leur appartenance (Habbache, 2014), les résultats des recherches scientifiques quant à leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques permirent de les ranger parmi les procaryotes, (Boudmagh, 2011). Ces derniers ont pour corollaire la structure cytologique du diamètre des hyphes qui est dix fois inférieur à celui des hyphes fongiques ; ce qui les classe tout naturellement parmi les bactéries.

## 4.2 Caractéristiques morphologiques

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive, possédant un coefficient de Chargaff très élevé, variant d'un peu moins de 50 mol % à un G+C supérieur à 70 mol %. Les actinobactéries ont également une paroi cellulaire très rigide composée d'acide muramique (Bergey, 2012). Les actinomycètes regroupent des bactéries anaérobies strictes comme le genre *Actinomyces* et aérobie strict appartenant entre autres au genre *Micromonospora*, en outre la paroi des actinobactéries ne contient ni chitine ni cellulose. Ceci confirme l'appartenance procaryote des actinomycètes (Lechevalier et Lechevalier, 1967).

Le groupe des Actinomycétales comprend des organismes phénotypiquement très variable partant d'un simple bacille aux coccobacilles jusqu'aux formes mycéliennes complexes (Goodfellow et Williams, 1983). Le développement de ces hyphes donne naissance à des colonies circulaires entourant le germe géniteur (Kitouni, 2007). Selon les différences morphologiques, les hyphes peuvent se diviser en mycélium aérien et mycélium du substrat (Figure 5) (Qinyuan Li *et al.*, 2016).

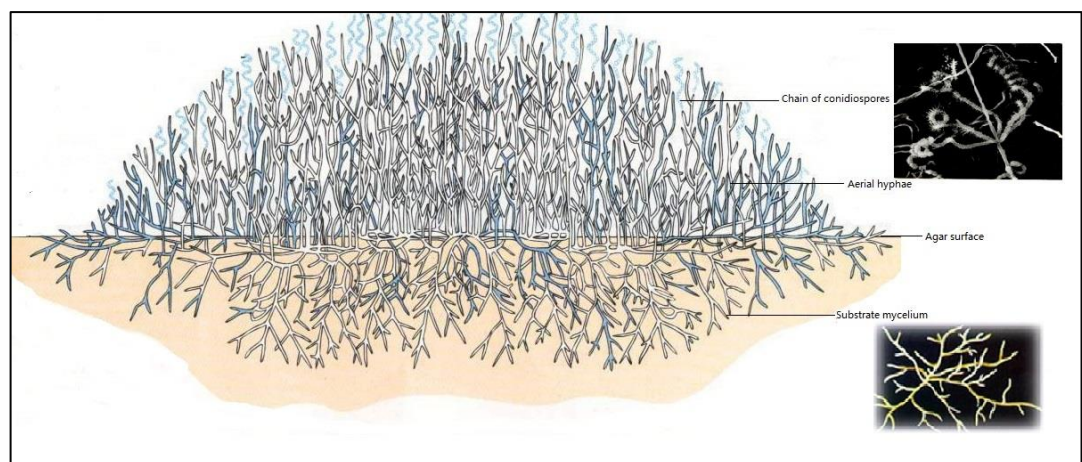


Figure 5 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes montrant le mycélium substrat et mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores. (Qinyuan Li *et al.*, 2016)

## 4.3 Les spores

Les actinomycètes forment des spores par fragmentation de leurs hyphes, par subdivisions des hyphes existants ou encore par la formation des spores endogènes. Les mycéliums qui se subdivisent en spores peuvent être engainés ou sans gaine. Ces spores en termes de différence dans la structure est peu connu, néanmoins il est certain que ces

dernières entraînent une différence dans le comportement et la survie des cellules (Reponen *et al.*, 1998).

A l'exception de la plupart des actinomycètes qui sont immobiles, certains produisent des spores flagellées communément appelées zoospore. Elles procurent à la bactérie la capacité à se mouvoir dans les milieux aquatiques. Comme cité précédemment cette diversité de spore offre des arrangements variés. En suivant la terminologie de Cross et par addition aux zoospores les autres types de spores que nous pouvons avoir sont les arthrospores, les endospores et les aleuriospores caractéristiques des *Streptomyces*, des *Thermoactinomyces* et des *Micromonospora* respectivement (Enseign, 1978 ) (Figure 6). De nombreux autres genres de groupes phylogénétiquement différents sporulent en produisant des sporanges. Ces derniers proviennent soit des hyphes aériens soit des hyphes du substrat (Figure 5)

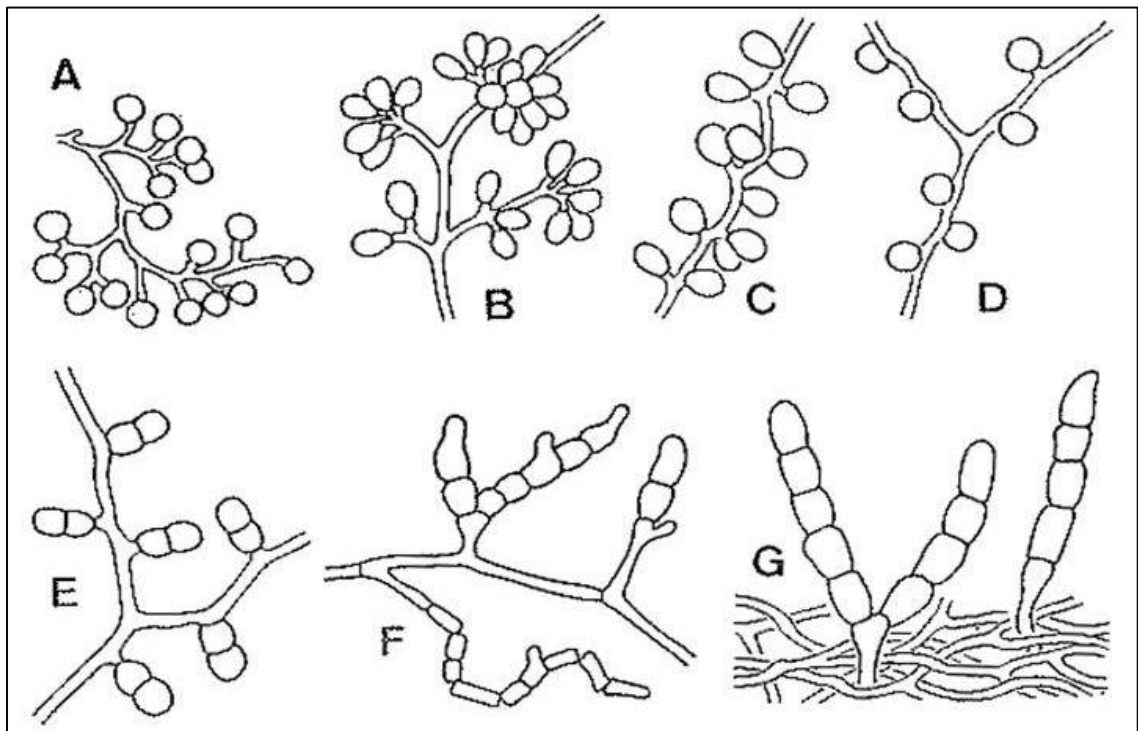


Figure 6 : Production de spores uniques et spores dans les chaînes courtes  
 Monospores: (A) *Micromonospora*, (B) *Thermomonospora*, (C) *Saccharomonospora*, (D) *Thermoactinomyces*. Dispores : (E) *Microbispora*.  
 Oligospores : (F) *Nocardia brevicatena*, (G) *Catellatosp* (Qinyuan Li *et al.*, 2016)

#### 4.4 Ecologie

Les actinomycètes existent dans divers habitats de la nature et représentent un groupe très abondant de microbes, largement répandus dans les écosystèmes naturels. Ils habitent principalement le sol et sont responsables de l'odeur caractéristique qui se dégage

de la terre. Cependant ils occupent d'autres écosystèmes tel les milieux aquatiques (Chamikara, 2016). Ils sont aussi saprophytes et permettent ainsi la dégradation de la matière organique dans les sols (Waksman, 1950). Les actinomycètes préfèrent les pH peu alcalins et les températures ambiantes (mésophiles). Néanmoins certains sont thermophiles comme *Thermoactinomyces*. Ensemble les thermophiles et les mésophiles jouent un rôle important dans la dégradation des fourrages et des graines humides mal stockées (Embley, 1994). Il est à noter aussi que les actinomycètes ont été trouvés présents dans les environnements extrêmes, spécialement dans la région cryophile, par exemple des sols prélevés en Antarctique, sols désertiques chauds et secs, pétrole brut, sols hautement contaminés par des métaux lourds, lacs extrêmement alcalins et lacs salés (Goodfellow et Williams, 1983). L'omniprésence de ces bactéries affecte peu la nature. Cependant il se trouve que les actinobactéries sont des agents pathogènes importants et causent de nombreuses maladies humaines, animales ou encore végétales. Nous citons à titre d'exemple la tuberculose qui affecte aussi bien l'humain que l'animal, et est causée par les mycobactéries.

#### **4.5 Intérêt des actinomycètes dans la biotechnologie**

Les actinomycètes sont le pilier de l'industrie actuelle. Ils produisent un nombre incommensurable de produits actifs. Les bactéries du genre *Streptomyces* est trôné meilleur producteur de métabolite secondaire d'intérêt médical et agronomique. Les métabolites en question peuvent être divisés en quatre classes : la première classe est réservée aux composés à activité régulatrice telle que les sidérophores, la seconde comprend les agents antagonistes (les antifongiques, les antiviraux, les antibactériens, etc.), la troisième inclut les composés agrobiologiques comme les insecticides et les herbicides et la quatrième compte pour elle seule tous les agents pharmacologiques dont les immunomodulateurs et les inhibiteurs d'enzymes. (Harir *et al.*, 2018 ; Kassangye Kangoy *et al.*, 2016). Cette polyvalence procure aux actinomycètes la faculté d'intégrer de multiples domaines biotechnologiques, les rendant ainsi très précieuses sur le plan économique et commercial.

Les actinomycètes ont depuis très longtemps été réputés par leurs productions abondantes d'antibiotique. Ils se classent meilleur producteur microbien avec une possession de 55% des antibiotiques commercialisés dans les années 1978 (Embley, 1994). Ce titre leur en demeure et se trouve indétrônable, puisque la production d'antibiotique s'élève à 65% ayant pour acteur principal les *Streptomyces* (Joanne Willey *et al.*, 2017). Ces derniers s'avèrent d'une importance commerciale et médicale inégalée. La streptomycine, le chloramphénicol, les tétracyclines et plein d'autres antibiotiques ont été détectés dans le



genre suscité. Malgré cette multitude d'antibiotique notre santé reste en péril à cause de l'émergence de la pharmaco-résistance. Les bactéries multirésistantes inquiètent les chercheurs qui se trouvent dans l'obligation de découvrir des antibiotiques performants avec de nouveaux mécanismes d'action (Chamikara, 2016). *Streptomyces griseus* est connu pour être l'organisme le plus fréquemment isolés depuis les années 50 (Waksman, 1950) cependant il démontre encore une fois sa productivité pléthorique et ouvre ainsi la porte de l'espoir vers une recherche d'un antibiotique salvateur (Takahashi et Nakashima, 2018).

#### 4.6 Production de substances bioactives

Les actinobactéries, est un groupe de micro-organismes partageant les caractéristiques des bactéries et des champignons (Anandan *et al.*, 2016), il se démarque par sa polyvalence métabolique. Les actinomycètes possèdent un potentiel de substances bioactives qui leur permet de survivre facilement dans les conditions écologiques défavorables (Nawani *et al.*, 2013). Elles sont bien connues pour leur production de métabolites primaires et secondaires (Tableau 1), qui ont des applications importantes dans divers domaines (Anandan *et al.*, 2016). Définis comme de petites molécules organiques produites par des organismes, les métabolites secondaires ne sont pas indispensables à leur croissance, leur développement et leur reproduction (Pandey *et al.*, 2018). Ces derniers peuvent être des vitamines, des antibiotiques, des bactériostatiques et bactéricides, des enzymes ou d'autres agents lytiques (Waksman, 1950 ; Jayanthi et Ritika, 2017).

Tableau 1 : Différences principales entre les métabolites primaires et secondaires (François et Corvini, 2000).

<b>Métabolites primaires</b>	<b>Métabolites secondaires</b>
Synthétisés pendant la trophophase (phase de croissance cellulaire) et présents tout au long du cycle cellulaire.	Synthétisés lors de l'idiophase (phase de ralentissement et stationnaire), et apparition à un moment du cycle.
Nécessaires à la croissance.	Ne sont pas indispensables à la croissance.
Rôle physiologique connu.	Rôle physiologique mal connu.
« Turn-over » élevé.	« Turn-over » pratiquement nul.
Produits dans des conditions de culture diverses.	Produits dans des conditions de culture diverses bien définies.
Ubiquitaires.	Spécifiques.
Enzymes à spécificité étroite.	Enzymes à spécificité large.
Voies de synthèse simples et courtes.	Synthèse longue et complexe.
Synthèse d'un produit parfaitement défini.	Synthèse d'un mélange de produits.
Structure chimique généralement simple.	Structure chimique souvent complexe.
Concentration élevée.	Concentration faible.



#### 4.7 Production d'enzymes

Les enzymes microbiennes sont davantage demandées relativement aux enzymes animales et végétales, non seulement parce qu'elles sont économiques, mais aussi du fait qu'elles peuvent être produites à grande échelle dans un espace réduit et un temps limité (Valsange *et al.*, 2012). Sachant aussi qu'elles sont capables d'avoir une activité appréciable dans des conditions difficiles (Nigam, 2013). Les actinomycètes ont fourni de nombreux composés bioactifs importants de haute valeur commerciale et continuent d'être régulièrement sélectionnés pour de nouvelles substances bioactives (Takizawa *et al.*, 1993). Parmi lesquelles on retrouve les enzymes et d'autres substances. (Jayanthi et Ritika, 2017).

Ces enzymes sont des protéines de haut poids moléculaire, constituées de longues chaînes d'acides aminés retenues ensemble par des liens peptidiques, agissant comme des catalyseurs, accélérant les réactions chimiques qui autrement serait très lentes ou mêmes statiques, d'une façon très spécifique grâce à leur possession d'un site actif, sans être consommées dans le procédé (Meunier, 1999). La grande variété d'enzymes produites par les actinomycètes marines et terrestres. La figure 7 et le tableau 2 représentent les produits industriels les plus importants de ces micro-organismes après les antibiotiques (Harir *et al.*, 2018).

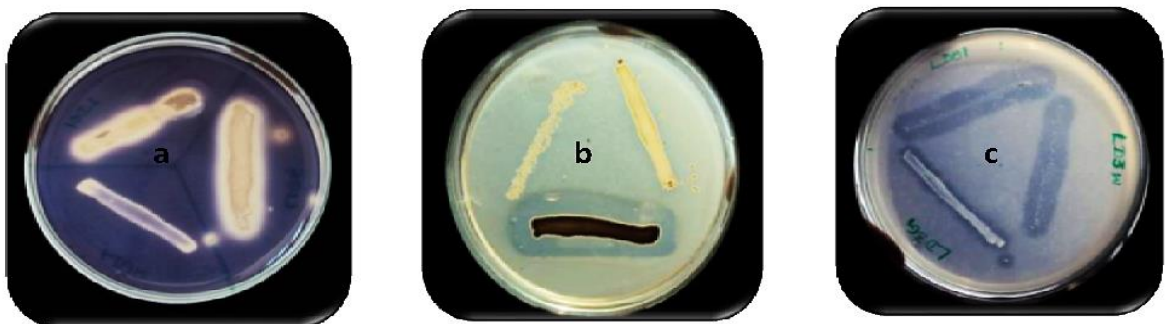


Figure 7 : Quelques enzymes produites par les actinobactéries. a. Amylase, b. Protéase et c. Lipase. La zone d'inhibition autour de l'actinobactérie inoculé témoigne la production d'une enzyme particulière (Anandan,*et al.*, 2016).

Tableau 2 : Les diverses enzymes produites par les actinobactéries et leurs différentes applications industrielles (Anandan, *et al.*, 2016).

Enzyme	Actinobactéries	Usage	Application industrielle
Protéase	<i>Thermoactinomyces</i> sp., <i>Nocardiopsis</i> sp., <i>Streptomyces pactum</i> , <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> , <i>Streptomyces</i> sp	Détergents	Détergent
		Fabrication de fromage	Aliments
		Clarification-bière à faible calories	Brassage
		Dépouillement	Cuir
		Traitement du caillot sanguin	Médecine
Cellulase	<i>Streptomyces</i> sp., <i>Thermobifida halotolerans</i> , <i>Streptomyces</i> sp., <i>Thermomonospora</i> sp., <i>Streptomyces ruber</i>	Enlèvement des taches	Détergent
		Finition denim, adoucissement du coton	Textile
		Désencrage, modification des fibres	Enlèvement des taches
Lipase	<i>Streptomyces griseus</i>	Enlèvement des taches	Détergent
		Stabilité de la pâte	Cuisson
		Assaisonnement de fromages	Laitiers
		Désencrage, nettoyage	Textile
Xylanase	<i>Actinomadura</i> sp., <i>Streptomyces</i> spp.	Conditionnement de la pâte	Cuisson
		Digestibilité	Alimentation animale
		Javellisant stimulant	Papier et pâtes
Pectinase	<i>Streptomyces lydicus</i>	Clarification, brassage	Boisson
		Récurage	Textile
Amylase	<i>Streptomyces</i> sp., <i>Streptomyces erumpens</i> , <i>Nocardiopsis</i> sp. ,  <i>Thermobifida fusca</i> , <i>Nocardiopsis</i> sp.	Enlèvement des taches	Détergent
		Douceur du pain et volume	Cuisson
		Désencrage, amélioration du drainage	Papier et pâtes
		Production de sirops de glucose et de fructose	Industrie de l'amidon
		Enlèvement de l'amidon des tissus	Textile
Glucose oxydase	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Renforcement de la pâte	Cuisson
Kératinase	<i>Nocardiopsis</i> sp. SD5	Dégradation des plumes	Alimentation animale
Phytase	<i>Streptomyces luteogriseus</i> R10	Digestibilité de phytate	

## 4.8 Les Protéases

Les actinomycètes, particulièrement les *Streptomyces* sont connues pour leur production de multiples protéases dans le milieu de culture (Bressollier *et al.*, 1999 ; Sharma *et al.*, 2014). En effet, les protéases sont omniprésentes dans la nature, relativement à leur implication dans de nombreuses réactions biologiques et leur rôle écologique important. Elles sont connues pour leur activité catalytique incroyable, ainsi que leur spécificité envers le substrat (Kumar et Jain, 2018). Les protéases appartiennent à la classe des enzymes hydrolytiques (Vidmar et Vodovnik, 2018).

Ces enzymes sont bien recherchées, par rapport à leur activité à des températures plus élevées, tout en conservant leur stabilité pendant une période prolongée de traitement dans un large éventail de températures (Nigam, 2013). Ces enzymes sont dénommées peptidases par l'union internationale de biochimie et biologie moléculaire (IUBMB). De même les termes protéinases ou enzymes protéolytiques sont employés pour définir ces enzymes (Benkahoul, 2016 ; Appolaire, 2014). Ainsi une protéase est utilisée dans le but d'orienter l'hydrolyse des protéines en morcelant la liaison peptidique avec différents degrés de spécificités (Habbeche, 2014 ; Kumar et Jain, 2018).

Les enzymes protéolytiques constituent l'un des plus importants groupes d'enzymes commercialisées (Brandelli, 2008). 60% des ventes globales d'enzymes dans le monde revient aux protéases, principalement les protéases extrêmophiles, et particulièrement les alcalophiles, les halophiles et les thermophiles qui sont classées comme favorites, en vertu de leur utilisation commode, leur activité accrue, leur haute stabilité, leur réaction cursive ainsi que leur moindre risque de contamination, ce qui leur donnent une importance industrielle remarquable ( Ningthoujam *et al.*, 2009).

Les protéases peuvent être classées selon la gamme de pH dans laquelle leur activité est optimale en protéases acides, neutres et alcalines (Kumar *et al.*, 2008). Communément, elles sont classées soit en exopeptidases (clivant les liaisons peptidiques aux extrémités de la chaîne protéique) ou bien en endopeptidases (scindant les liaisons peptidiques au sein de la protéine) (Vaijyanthi *et al.*, 2016). De plus, une classification des protéases selon les acides aminés de leur site actif est également possible, ce qui permet de les regrouper en protéases à Sérine, protéases à Cystéine, protéases à Aspartate, Métalloprotéase etc. Cette dernière classification démontre la diversité des mécanismes catalytiques de chaque groupe (Benkahoul, 2016 ; Vidmar et Vodovnik, 2018).

## 5. Les kératinases

Les kératinases représentent un groupe d'enzymes protéolytiques capables de catalyser l'hydrolyse des protéines hautement stables et fibreuses telle que les kératines (Purchase, 2016). Ainsi appelées enzymes kératinolytiques, elles sont majoritairement extracellulaires et inductibles (Habbeche, 2014). Etant donné que ces enzymes sont largement produites sur un milieu contenant un substrat kératinique comme seule source de carbone et d'azote (Vidmar et Vodovnik, 2018). Cela a été démontré dans les travaux de (Riffel et Brandelli, 2006) sur huit isolats.

Ces enzymes, appartiennent aux sérines protéases ou aux métalloprotéases (Valsange *et al.*, 2012 ; Călin *et al.*, 2017). La caractéristique singulière qui les fait connaître des autres protéases, revient à leur capacité de se lier aux substrats complexes et insolubles (plumes, laine, soie, collagène, élastine, cornes, couche cornée, poils, azokératine et ongles). La synergie de croissance microbienne influence la production d'enzymes protéolytiques. À la fin de la phase exponentielle et/ou la phase stationnaire, la production de protéases est très significative, ce qui est lié à l'adaptation du manque de nutriments. Ainsi, le stress nutritionnel est suggéré dans la régulation de la production ou la sécrétion des protéases, exemple : le manque de sources de carbone et d'azote (Vidmar et Vodovnik, 2018).

### 5.1 Sources des kératinases

Divers groupes de micro-organismes ont été désignés pour leur production de kératinase (Abdel-Fattah *et al.*, 2018), parmi lesquels on retrouve quelques espèces thermophiles de *Bacillus* (Riffel *et al.*, 2003) tel que *Bacillus licheniformis* (Lin *et al.*, 1992 ; Vidmar et Vodovnik, 2018) et d'autres *Bacillus* comme *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. coagulans*, et *B. megatherium* (Łaba *et al.*, 2018). La dégradation de la kératine, peut ainsi avoir lieu avec des kératinases fongiques de *Paecilomyces marquandii* (Brandelli *et al.*, 2015). D'une autre manière, des représentants du genre *Streptomyces* se sont démarqués comme une source prometteuse pour la production industrielle des keratinases, comme *S. gulbergensis*, *S. thermoviolaceus* (Vidmar et Vodovnik, 2018 ; Habbeche, 2014).

L'isolement des micro-organismes impliqués dans la production de la kératinase s'effectue à partir de divers environnements, principalement des plumes en décomposition et de l'eau polluée par les abattoirs (Brandelli *et al.*, 2015). Les micro-organismes kératinolytiques sont devenus l'axe d'intérêts scientifiques, en raison de leur

capacité à bio-synthétiser des kératinases spécifiques et leur application prospective dans la gestion des déchets kératiniques (Łaba *et al.*, 2018). La biodégradation des déchets kératiniques à l'aide de micro-organismes kératinolytiques, se révèle comme une méthode alternative rémunératrice dans l'amélioration de la valeur nutritive de ces déchets, en offrant des conditions de réactions succinctes et peu coûteuses pour générer des produits de valeur (Gushterova *et al.*, 2005).

## 5.2 Propriétés des kératinases

Qualifiées de robustes, les Kératinases possèdent diverses propriétés biochimiques (Vidmar et Vodovnik, 2018). Ces propriétés, changent d'une espèce microbienne à une autre (Riffel *et al.*, 2007 ; Brandelli *et al.*, 2015). La plupart de ces enzymes sont monomériques (Vidmar et Vodovnik, 2018). Le poids moléculaire de la plupart des kératinases est concentré entre 30 et 70 kDa. Cependant, leur poids moléculaire peut fluctuer d'une dizaine de kDa à plusieurs centaines de kDa (Creative Enzymes, 2019). La plus petite kératinase est une enzyme monomère d'un poids moléculaire de 18 kDa, contrairement à la plus grande qui est une enzyme complexe et qui peut atteindre les 200 kDa ou plus (Vidmar et Vodovnik, 2018).

Les kératinases sécrétées par les actinomycètes présentent un maximum d'activité dans un large éventail de pH compris entre 7 à 12, résistantes à des températures très élevées allant de 55 à 90 °C, tel que la kératinase produite par *Thermoanaerobacter keratinophilus* qui présente une stabilité pendant 6h à 80 °C (Habbeche, 2014).

## 5.3 Le mécanisme d'action

L'insolubilité et l'accès difficile aux liaisons peptidiques cibles des molécules compactes comme les kératines, rendent le clivage des liaisons peptidiques ardu. La kératinolyse implique un enchainement de plusieurs étapes, où l'adsorption des kératinases à la surface de la macromolécule par des interactions électrostatiques et hydrophobes, précède une action catalytique. Bien que le mécanisme d'adsorption enzymatique ne soit pas encore bien compris, mais il est reconnu que la capacité d'adsorption de l'enzyme est corrélative au degré d'hydrolyse de la kératine (Vidmar et Vodovnik, 2018).

En effet, le mécanisme exact et le mode d'action des kératinases sur la dégradation de la kératine native ne sont pas encore bien élucidés (Brandelli *et al.*, 2015). Les enzymes kératinolytiques attaquent principalement les ponts disulfures du substrat non soluble en clivant ces derniers. Plusieurs travaux montrent que la partie intracellulaire comprend une

fonction disulfure réductase qui intervient en coopération avec les kératinases extracellulaires pour dégrader la kératine par réduction des ponts disulfures (Habbeche, 2014).

Par conséquent, il est généralement consenti que le processus kératinolytique inclut deux étapes importantes. Ce dernier s'initie par une sulfitolyse, au cours de laquelle, le clivage des liaisons disulfure modifie la conformation des kératines et expose davantage de sites d'action de la kératinase, en les rendant accessibles pour la protéase alcaline qui oriente la digestion protéolytique ultérieure et en libérant des peptides solubles et des acides aminés (Navone et Speight, 2018).

La sulfitolyse ne peut s'accomplir qu'en présence de certains agents réducteurs tels que le sulfure de sodium, le dithiothréitol (DTT), le mercaptoéthanol, le glutathion, la cystéine, l'acide thioglycolique ou les disulfures réductases. La coopération de l'une de ces pratiques avec l'activité kératinolytique permet d'aboutir à une dégradation complète de la kératine (Vidmar et Vodovnik, 2018). De même, l'inhibition de ces enzymes se fait par les mêmes inhibiteurs des protéases à sérine (Habbeche, 2014).

## **6. Domaines d'application**

La dégradation de la kératine en hydrolysats de protéine de kératine par exploitation des kératinases microbiennes, a connu un triomphe dans le secteur économique. Ce qui fait acquérir aux kératinases graduellement une importance biotechnologique dans la valorisation des déchets kératiniques (Ningthoujam *et al.*, 2018). Tout en leur donnant de vastes perspectives d'applications dans les domaines de l'alimentation animale, du cuir, des médicaments, des aliments et autres, ainsi que dans la gouvernance environnementale (Creative Enzymes, 2019.).

### **6.1 Domaine de l'agriculture**

La kératinase peut être utilisée dans le domaine agricole, dans la mesure où elle peut transformer la kératine en polypeptides et en acides aminés qui seront par la suite utilisés dans la fabrication d'engrais organiques. Ces derniers résorbent non seulement le problème de pénurie d'énergie, mais anéantissent également les sources de pollution et participent énormément à l'amélioration de l'environnement (Creative Enzymes, 2019).

### **6.2 Fabrication d'aliments pour les animaux**

Les industries avicoles représentent une source de pollution pour l'environnement, vu leur production de millions de tonnes de déchets keratiniques (plumes) par an et

sachant que ces déchets sont plantureux en kératine (environ 90%), ceci les renvoie à une des alternatives de valorisation de déchets kératiniques résidant dans leur transformation en farine de plumes qui sera par la suite utilisée comme aliment pour les animaux (Vidmar et Vodovnik, 2018).

### **6.3 Autres applications**

Les kératinases sont également performantes dans la modification de la structure de base des fibres de laine ou de soie. D'autre part, elles ont des applications notamment dans le domaine des cosmétiques (exemple : pour le traitement d'acné, les callosités, l'enlèvement de peau kératinisée et sèche, traitement de psoriasis etc.). Ainsi elles ont connu un exploit dans l'industrie pharmaceutique, en étant utiles dans l'amélioration des traitements fongicides des ongles (Vidmar et Vodovnik, 2018). De plus, ces enzymes ont pu prospérer dans la décontamination des prions (Purchase, 2016), qui sont des protéines compactes très robustes responsables de maladies neurodégénératives graves (Vidmar et Vodovnik, 2018). Ces enzymes ont pu aussi dominer le marché des détergents. Comme elles peuvent être employées dans l'hydrolyse partielle des déchets kératiniques pour la production de films, de revêtement et de colles biodégradables. Il est aussi possible d'utiliser les microorganismes kératinolytiques et leurs enzymes dans le traitement des eaux usées (Sahoo *et al.*, 2017).

## **7. La kératine**

La kératine est une protéine structurale insoluble, connue pour sa haute stabilité (Friedrich et Antranikian, 1996), elle représente un polymère solide (Kumawat *et al.*, 2018), amplement distribué dans la nature (Ningthoujam *et al.*, 2018). Cette protéine ne connaît pas de digestibilité par les enzymes protéolytiques communes comme la trypsin, pepsin et la papain lorsqu'elle est dans son état natif (Williams *et al.*, 1990). La kératine forme les tissus superficiels des mammifères (Sharaf et Khalil, 2011). On la retrouve aussi chez les poissons, les oiseaux et les reptiles. Dans ce sens, la kératine constitue un moyen de défense efficace contre le stress abiotique et les attaques biotiques, ainsi que les attaques microbiennes (Lang *et al.*, 2016).

### **7.1 Structure et classification des kératines**

En ce qui concerne la structure des kératines, ces dernières sont définies comme protéines hélicoïdales et fibreuses, formant des filaments intermédiaires qui s'entortillent

sur d'autres molécules de kératines (Habbeche, 2014). Leur structure secondaire consiste à leur permettre d'être subdiviser en  $\alpha$ -kératine ou en  $\beta$ -kératine. La  $\beta$ -kératine est opulente en feuilles plissées en  $\beta$  formant des faisceaux de fibrilles supramoléculaires (Figure 8). Tandis que l' $\alpha$ -kératine est constituée de spires enroulées en hélice  $\alpha$  auto-assemblées en filaments intermédiaires (Navone et Speight, 2018).

Dans la structure  $\alpha$ -hélicoïdale, la chaîne polypeptidique crée une liaison hydrogène avec le maximum de possibilités d'interaction entre le groupe carbonyle d'un acide aminé et le groupe amino d'un autre acide aminé, Un genre identique de structure est mis en place en bobine enroulée, contribuant ainsi à un arrangement structurel homogène pour allonger la chaîne polypeptidique. D'autre part, la structure  $\beta$  porte des liaisons hydrogène intermoléculaires entre les groupes carbonyle et amino (Shah *et al.*, 2019).

Généralement, l' $\alpha$ -kératine se trouve dans les sabots, les ongles, le stratum corneum, ainsi que dans les fanons des baleines et les myxines. Tandis que la  $\beta$ -kératine se trouve dans les plumes, les griffes et le bec d'espèce aviaires, ainsi que dans les écailles et griffes de reptiles (Sahoo *et al.*, 2017). Le Tableau 3 ci-dessous nous montre la différence qui existe entre les deux types de kératine.

Tableau 3 : Une comparaison entre  $\alpha$ - et  $\beta$ -kératine basée sur leur structure et leur distribution (Shah *et al.*, 2019)

<b>Caractérisation</b>	<b><math>\alpha</math>-Kératine</b>	<b><math>\beta</math>-Kératine</b>
Liaison	Liaison hydrogène intramoléculaire	Liaison hydrogène intermoléculaire
Diamètre (nm)	7-10	3-4
Caractéristiques structurelles	Matrice de filament intermédiaire	Matrice amorphe
Poids moléculaire (kDa)	40-68	10-22
Distribution	Laine, cornes, poils, ongles et sabots	Becs d'oiseaux, plumes, griffes, épidermes de reptiles
Rigidité	Haute	Inférieure à l' $\alpha$ -kératine

Le fait d'être qualifiées de protéines fibreuses et insolubles et d'être caractérisées par une haute stabilité, revient à la réticulation des liaisons disulfures, les ponts



d'hydrogènes et les interactions hydrophobes (Lin *et al.*, 1992). La protéine de kératine présente une concentration élevée en cystéine, soit 7 à 20% du total des résidus d'acides aminés, qui forment des liaisons disulfures inter et intramoléculaires (Kumawat *et al.*, 2018). En se basant sur la teneur des kératines en soufre (Ningthoujam *et al.*, 2018), on peut aussi les classer en kératines molles qui entrent dans la formation des tissus épithéliaux, ou bien les ranger dans la classe des kératines dures lorsqu'elles contribuent à la formation des tissus protecteurs (exemple : les cheveux, les ongles, la laine, les plumes et les cornes) (Navone et Speigh, 2018). Les kératines sont également connues comme protéines hétérogènes en raison de leur composition variée en acides aminés. Elles contiennent une forte teneur en glycine, proline, sérine et d'autres acides aminés, contrairement à la lysine, histidine et méthionine qui sont présentes avec une faible teneur, ainsi qu'elles sont caractérisées par l'absence de tryptophane (Habbeche, 2014).

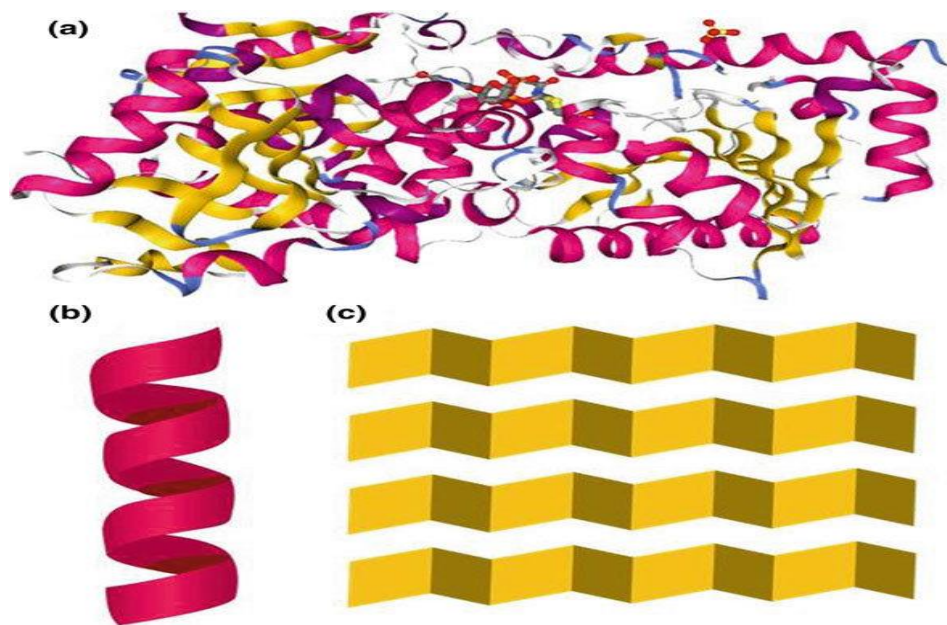


Figure 8 : **a-** Représentation schématique de la protéine de Kératine en 3D. **b-** l'hélice  $\alpha$  résulte de la torsion des chaînes polypeptidiques en vissage et **c-** La structure de la feuille  $\beta$  résulte de l'extension et de l'étirement maximum des chaînes polypeptidiques. (Shah *et al.*, 2019)

## 7.2 Sources kératiniques

Les sources de kératine sont diverses, elles émanent des organismes vivants ou des parties de leurs corps après la mort. Les plumes et les différentes peaux d'animaux, les cheveux, les sabots ainsi que les écailles et la couche cornée représentent des sources substantielles de kératine (Kumawat *et al.*, 2018). La plume est le déchet kératinique le

plus abondant libéré dans l'environnement. La production annuelle de plume à l'échelle mondiale s'élève à environ  $8 \text{ à } 9 \times 10^5$  tonnes. L'industrie de transformation de la viande de poulet contribue grandement à la production de cette quantité (Ningthoujam *et al.*, 2018).

### 7.2.1 La kératine des plumes

Les plumes sont composées d'une partie comprenant 95 à 98% de protéines, qui sont principalement des  $\beta$ -kératine (Ningthoujam *et al.*, 2018) et d'une seconde partie non protéique qui inclut des pigments, des minéraux, des polysaccharides, des nucléotides, de l'acide urique, du glucose et du ribose. Ces déchets kératiniques demeurent une source très riche en protéines et particulièrement en acides aminés essentiels (Habbeche, 2014)

### 7.2.2 Structure des plumes

Une plume se compose au centre d'un axe appelé le rachis ayant une forme creuse à la base et pleine dans sa partie axiale (Figure 9). Le rachis possède des barbes incluses de part et d'autre du centre, emmêlées l'une dans l'autre par des barbules perpendiculaires dans un seul cadre, qu'on ne peut pas observer à l'œil nu. Les barbules sont maintenues ensemble par des crochets inextricables fonctionnant comme une fermeture éclair (Habbeche, 2014).

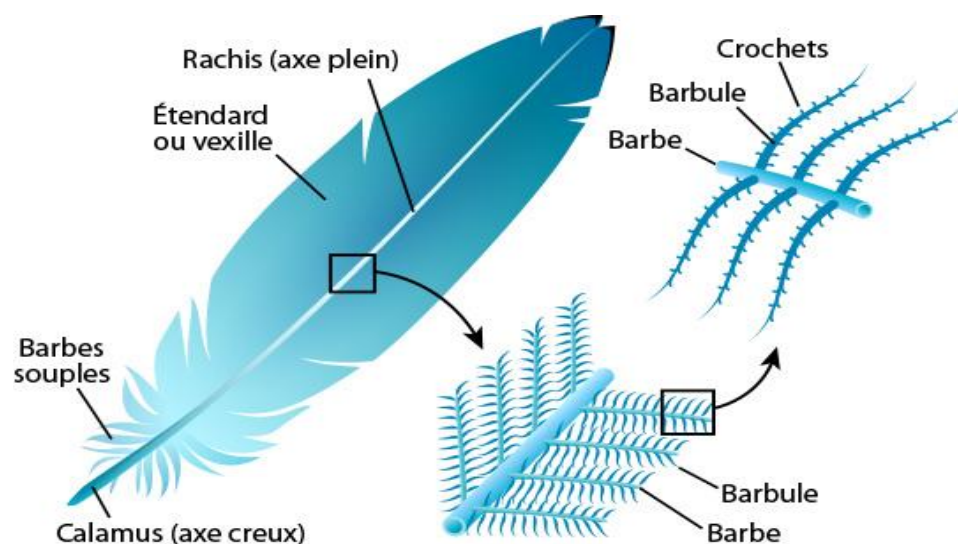


Figure 9 : Anatomie de la plume (Kazilek, 2017)

## **MATERIEL ET METHODES**

## **1. Origine de la souche**

L'isolat d'actinomycète utilisé durant notre travail, nous a été remis affablement par la doctorante SMATI Maria du laboratoire de génie-microbiologie et applications qui l'a isolé à partir d'un lac salé (Sebkha de Ain Mlila) lors de ces travaux de recherche. La souche a été conservée à -18 °C dans un tube Eppendorf.

## **2. La revivification et repiquage de la souche**

La revivification de la souche est une étape importante qui nous permet de restaurer l'activité métabolique du micro-organisme après avoir eu une activité biologique nulle lors de sa congélation.

Cette étape consiste premièrement à prélever, à l'aide d'une anse de platine, les spores de la souche qui ont été conservés dans du glycérol en vue de les inoculer dans les milieux liquides préalablement préparés, le milieu ISP2 additionné de NaCl à 10% et le milieu ISP5 additionné de NaCl à 5% (annexe 1), puis incubés à 30 °C pendant 5 jours. Ensuite un ensemencement sur les milieux solides ISP2 et ISP5 additionnés de NaCl (citées précédemment) est réalisé. L'incubation des boîtes se fait à 30 °C pendant 7 jours.

## **3. Conduite de la fermentation**

### **3.1 Préparation des milieux de cultures**

Les milieux de cultures utilisés dans le présent travail sont composés principalement de déchets agroalimentaires il s'agit de :

- Plumes de volailles, types duvet. Elles sont lavées et séchées, ensuite découpées en petites pièces (Figure 10).
- Epluchures de pomme de terre qui sont séchées à l'ombre puis moulu (Figure 11).
- Marc de café séché jusqu'à obtention d'une poudre (Figure 12).



Figure 10: Plumes de volailles.



Figure 11 : Epluchures de pomme de terre avant et après broyage.



Figure 12 : Le marc du café avant et après séchage.

Vingt-sept milieux de cultures ont été préparés à partir des déchets cités préalablement exemple le Marc de café (Mc) ; Plumes de volaille (PV) ; Epluchures de pomme de terre (EP) ; Le Sulfate d'ammonium (SA) et le NaCl, avec de différentes concentrations présentées dans le tableau 4 ci-dessous. Ils ont subi par la suite une tyndallisation puis une stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Tableau 4 : Composition des différents milieux de cultures

Essais	Mc (g/ml)	PV (g/ml)	EP (g/ml)	SA (g/ml)	NaCl (g/ml)
1	4	4	4	4	80
2	4	4	4	8	40
3	4	4	8	4	40
4	4	4	8	8	80
5	4	8	4	4	40
6	4	8	4	8	80
7	4	8	8	4	40
8	4	8	8	8	80
9	8	4	4	4	80
10	8	4	4	8	40
11	8	4	8	4	40
12	8	4	8	8	40
13	8	8	4	4	80
14	8	8	4	8	40
15	8	8	8	4	40
16	8	8	8	8	80
17	2	0	6	6	60
18	10	0	6	6	60
19	6	2	6	6	60
20	6	10	6	6	60
21	6	6	2	6	60
22	6	6	10	6	60
23	6	6	6	2	60
24	6	6	6	10	60
25	6	6	6	6	20
26	6	6	6	6	100
27	6	6	6	6	60

### **3.2. Préparation de l'inoculum et ensemencement des milieux**

Après sporulation, les spores de la souche ont été raclées à l'aide d'une anse de platine dans de l'eau distillée stérile puis agité au vortex. Ensuite un millilitre de la suspension sporale préparé est inoculé dans le milieu ISP5 liquide. L'incubation est réalisée à 30 °C pendant 4 jours. Les milieux sont ensuite inoculés avec l'inoculum préparé à raison de 10% sous haute à flux laminaire. L'incubation est réalisée à 30 °C pendant 7 jours sous agitation modérée.

### **4. Dosage des sucres totaux selon la méthode de Dubois *et al.*, 1956**

Le dosage des sucres est effectué selon la méthode de Dubois *et al.*, (1956) à partir des milieux de cultures stérilisés avant fermentation. 1ml de l'échantillon est inséré dans un tube vide. 1ml d'une solution de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique concentré sont alors ajoutés. Le mélange est laissé reposer 10 min à température ambiante, puis incubé à 30 °C pendant 20 minutes au bain marie. L'absorbance est mesurée à 488 nm.

La concertation en sucres totaux contenu dans les milieux de cultures est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions en utilisant le glucose comme standard (annexe 3).

### **5. Dosage des protéines avant et après fermentation**

Les protéines seront quantifiées selon la méthode de Lowry *et al.*, (1951) à partir des milieux de cultures avant et après fermentation. 1ml de l'échantillon est introduit dans des tubes vides. 5 ml de la solution M (annexe 2) sont alors ajoutés, le mélange est agité puis laissé reposer 10 minutes à température ambiante. 0,5 ml du réactif de Folin-ciocalteu dilué au 1/10 sont ensuite additionnés. Les tubes sont directement placés à l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance est lue à 650 nm au spectrophotomètre contre une gamme étalon établie à partir de la solution de sérum albumine bovine dont les concentrations varient de 0 à 0,5 mg/ml (annexe 3).

### **6. Dosage de l'activité kératinolytique**

L'activité kératinolytique est mesurée selon la méthode de Yamamura *et al.*, (2002). De légères modifications du protocole ont été introduites en vue d'obtenir de meilleur résultat. Dans des tubes contenant 1ml du tampon Gly/NaOH préparé au préalable (annexe 2), ajouter 50 mg de poudre de laine et 1 ml de la solution enzymatique (filtrat des milieux de cultures après fermentation). Le mélange est incubé 1 heure à 50 °C au bain marie. La réaction est arrêtée par



l'ajout de 2 ml de TCA à 4%. Après précipitation 200  $\mu$ l du surnageant sont prélevés. 1 ml de la solution  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 4% est alors ajouté suivi de 200  $\mu$ l de Folin-ciocalteu. Le mélange est laissé réagir pendant 1h à 20 °C. L'absorbance est lue à 660 nm, l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions en utilisant la tyrosine comme standard (annexe 3).

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

---

## 1. Culture de la souche

Après 5 jours d'incubation les résultats de la culture de la souche ont montré la performance du milieu ISP5 dans la revivification et la récupération de l'activité microbienne, contre une timide croissance sur le milieu ISP2 (Figure13).

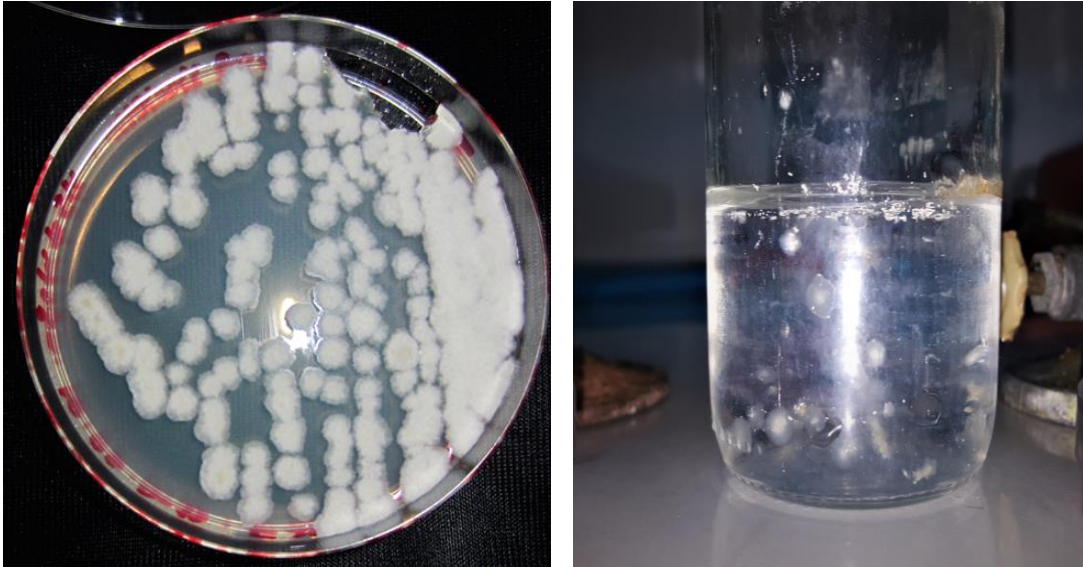


Figure 13 : Croissance de la souche sur milieu ISP5 solide et liquide.

## 2. Taux des sucres (avant fermentation)

Les taux des sucres totaux des vingt-sept milieux de cultures préparés avant fermentation sont présentés sur la figure 14.

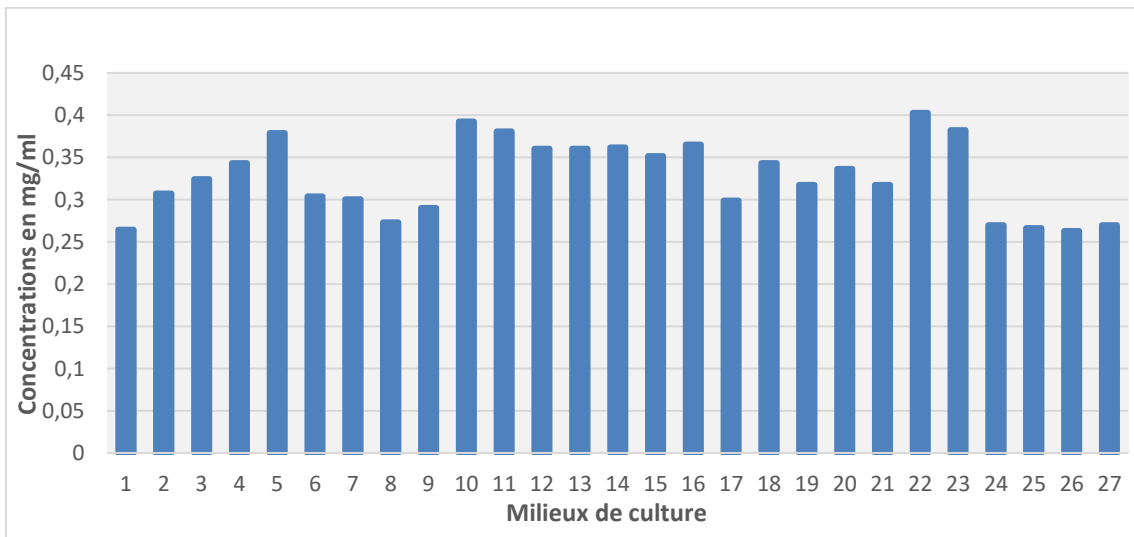


Figure 14 : Histogramme représentant les différents taux des sucres totaux des 27 milieux avant fermentation.

Les taux des sucres varient d'un milieu à l'autre. Le milieu du 22<sup>ème</sup> essai représente la concentration la plus élevée en sucres (~0.4027 mg/ml), contrairement au milieu de l'essai 26 dont la concentration en sucres est la plus faible avec (~ 0.2627 mg/ml). Il en ressort aussi de la figure 14 que les milieux des essais 12 à 16 ont pratiquement la même concentration en sucres (~ 0.36 mg/ml). De même, les essais 1, 24, 25, 26 et 27 ont approximativement la même concentration en sucres (~0.26 mg/ml).

La variation de la concentration en sucres dans les 27 essais, peut être due à la composition et la concentration des déchets qui constituent les différents milieux de cultures. La composition chimique moyenne des co-produits de la pomme de terre ont la plus grande teneur en sucres totaux (annexe 4). La forte concentration en sucre obtenue revient principalement aux épiluchures de pomme de terre qui sont riche en xylose, mannose, glucose etc. (Guan *et al.*, 2019). Le marc de café quant à lui, il est riche en polysaccharides (annexe 8). La torréfaction du café entraîne une dégradation des polysaccharides en monosaccharides ce qui entraîne une augmentation du pourcentage des sucres totaux de 16,2 à 37,9 % (Debry, 1993) (annexe 4).

### 3. Taux des protéines totales

#### 3.1 Taux des protéines totales avant fermentation

Les taux des protéines totales des vingt-sept essais avant fermentation sont présentés sur la figure 15.

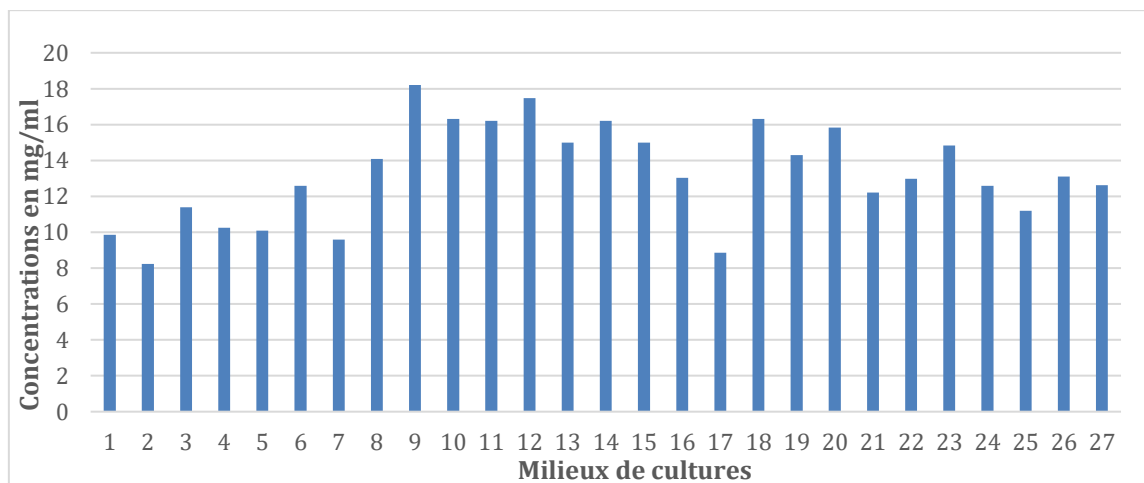


Figure 15 : Histogramme représentant les taux des protéines totales avant fermentation dans les différents milieux de culture.

Les résultats des dosages des protéines présentés sur la figure 15 révèlent que les concentrations varient considérablement d'un milieu à un autre.

Les teneurs les plus faibles sont comprises entre 8 mg/ml et 10 mg/ml. La valeur minimale est observée dans le milieu 2 avec une concentration de l'ordre de 8,23 mg/ml. Tandis que la concentration la plus élevée 18,19 mg/ml est enregistrée dans le milieu 9. Cette variation de teneur en protéine peut être liée à la propriété chimique des composants des milieux de cultures. Selon les travaux de (Debry, 1993) le marc de café composé principalement de robusta et d'arabica contient un taux de protéine qui varie entre 13 et 15% (annexe 4), ce qui est d'ailleurs confirmé par Carassou (2015). Dans notre cas le milieu 9 est composé de 8 g/l de marc de café combiné à d'autres déchets qui peuvent également être source de protéines comme les plumes de volailles principale la source de protéines, observée dans ce milieu. (Habbeche, 2014)

### 3.2 Taux des protéines totales après fermentation

Après 7 jours d'incubation à 30 °C, les milieux des 27 essais sont filtrés en vue de séparer leur biomasse et de récupérer les jus des fermentations (figure 16).



Figure 16 : La séparation de la biomasse.

La figure 17 représente les résultats du dosage des protéines totales après fermentation. La production des protéines varie d'un milieu à un autre.

La concentration en protéine la plus faible appartient au milieu 23 avec une valeur de l'ordre de 16,20 mg/ml. La production en protéine s'élève jusqu'à arriver à un pic de 32,10 mg/ml correspondant au milieu 16. Les propriétés chimiques des composants des milieux de culture

contrôlent la production de protéines. Cette variation de concentration peut être liée à la teneur en sucre de chaque composé des milieux de cultures. Le milieu 16 ayant la valeur la plus élevée de protéine est composé de (8 g/l d'épluchure de pomme de terre, 8 g/l de marc de café, 8 g/l de plume de volailles et 8 g/l de sulfate d'ammonium) parmi ces composants le marc de café et les épluchures de pomme terre offrent une importante source de sucre pouvant influencer la production de protéines (annexe 4) (Debry, 1993 ; Carassou, 2015).

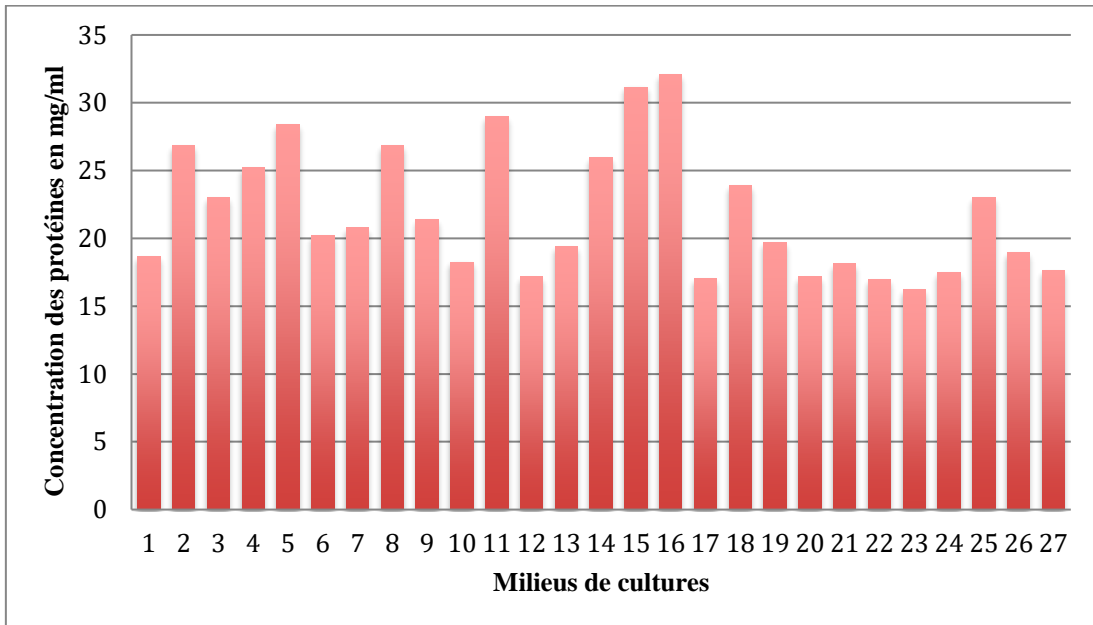


Figure 17 : Histogramme représentant le dosage des protéines totales après fermentation.

D'après la figure 18 qui montre les concentrations des protéines avant et après fermentation nous constatons qu'il y a eu une production de protéines importante lors de la fermentation. Les concentrations maximales et minimales que nous avons obtenues avant fermentation n'ont pas conservé leur titre. De nouveaux milieux se démarquent (les milieux 16 et 15) et donnent les meilleurs rendements en protéines. Ce qui confirme que la fermentation permet de puiser les sucres contenus dans les milieux de cultures (épluchures de pomme de terre et marc de café) d'où les valeurs élevées en protéines pour les deux milieux.

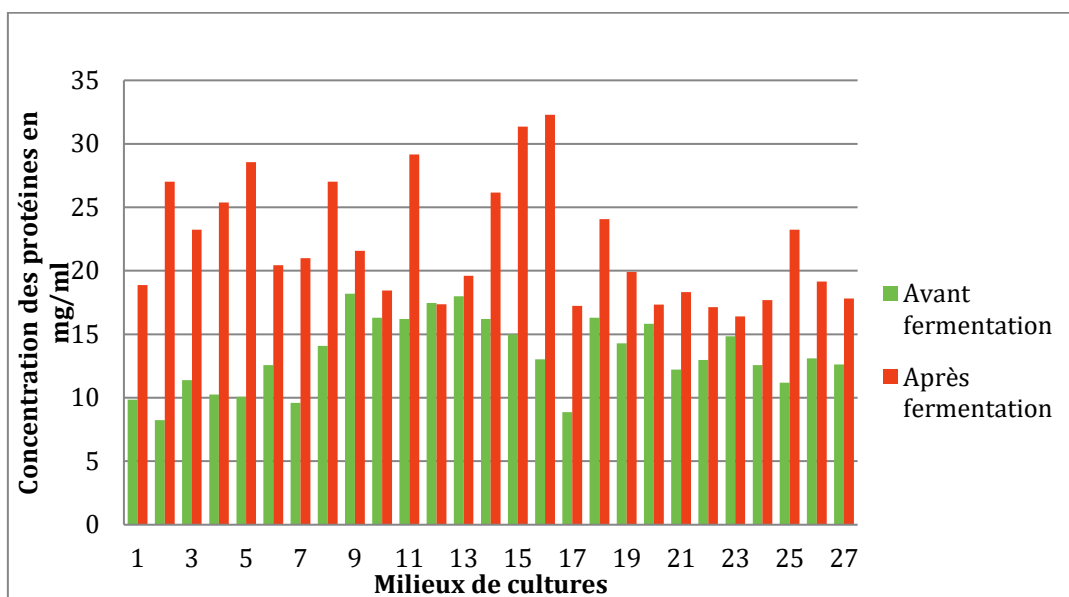


Figure 18 : Histogramme groupé du dosage des protéines avant et après fermentation.

### 3.3 Production des kératinases

Les jus de fermentation des 27 essais de fermentation obtenu après filtration servent pour le dosage de l'activité kératinolytique. Cette dernière a été déterminée par la méthode Yamamura *et al.*, (2002). Les résultats sont représentés sur la figure 19 d'où il ressort : l'activité kératinolytique est présente dans tous les essais, avec des valeurs qui varient d'un essai à un autre. Une activité maximale est atteinte dans l'essai 15, avec une valeur de 3,25 mg/ml/min. Ces variations peuvent être liées à la propriété chimique des composants des milieux de cultures comme les plumes de volailles (Habbeche, 2014).

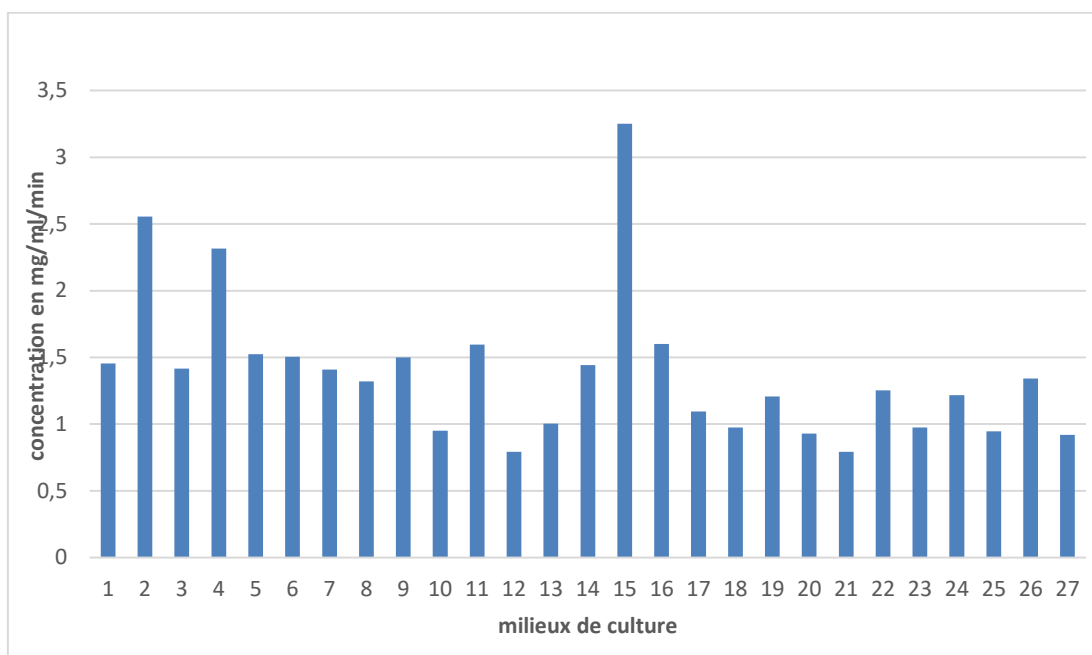


Figure19 : Histogramme représentant les résultats de l'activité kératinolytique dans les 27 essais.

#### 4. Optimisation de la production des protéines

Les effets de l'interaction entre les différents facteurs sont étudiés par le plan composite centré (CCD) de Box et Wilson (1951) associé à la méthodologie de surface de réponse (RSM). Ce sont des dispositifs efficaces et largement employés au niveau industriel. Leur objectif dans l'amélioration des milieux de cultures est de définir les concentrations parfaites des facteurs étudiés. Ces méthodes ont été amplement utilisés pour améliorer le processus de production où de nombreux facteurs et leurs interactions affectent la réponse souhaitée, tels que la production d'enzyme (Oussadi et Kitouni, 2015 ; Gasmi et Kitouni, 2017).

Un total de 27 essais avec une combinaison différente de concentration de marc de café ( $X_1$ ), d'épluchures de pomme de terre ( $X_2$ ), de plumes de volailles ( $X_3$ ) et de sulfate d'ammonium ( $X_4$ ) ont été consignés dans le (Tableau5). Les réponses observées et prédites des 27 expériences sont également présentées dans le (Tableau7).

##### 4.1 Modélisation statistique de la production de protéines

Les taux des protéines observés et prédits des 27 expériences sont présentés dans le (Tableau5).



Tableau 5 : Plan composite centré de Box et Wilson à quatre facteurs, avec le taux de protéines produites par la souche *Actinopolyspora* sp. comme réponse.

Essais	Observée	Prévue	Résidus
1	9,64842	9,38784	0,26058
2	8,02937	10,05318	-2,02381
3	11,18810	11,06906	0,11905
4	10,04525	12,34551	-2,30026
5	9,88652	10,67488	-0,78836
6	12,37858	13,75292	-1,37434
7	9,39445	11,13387	-1,73942
8	13,88652	14,82302	-0,93651
9	17,99763	16,17752	1,82011
10	16,10874	15,44604	0,66270
11	16,01350	15,71588	0,29762
12	17,26747	15,59551	1,67196
13	14,79128	13,56773	1,22354
14	16,01350	15,24895	0,76455
15	14,79128	11,88387	2,90741
16	12,83890	14,17620	-1,33730
17	8,66429	10,81112	-2,14683
18	16,10874	13,76879	2,33995
19	14,09287	14,46191	-0,36905
20	15,63255	15,07038	0,56217
21	12,01350	12,36403	-0,35053
22	12,77540	12,23175	0,54365
23	14,63255	10,33757	4,29497
24	12,37858	16,48043	-4,10185
25	10,99763	12,18405	-1,18643
26	12,90239	12,18405	0,71834
27	12,42620	12,18405	0,24214
28	12,41000	12,18405	0,22595

Pour déterminer la relation entre une réponse (variables dépendantes) dans ce cas le taux des protéines produites et les facteurs indépendants (Mc, EP, PV, SA), et évaluer les valeurs optimales de ses dernier pour une production optimale de protéines. Une analyse de régression multiple est appliquée sur les données expérimentales (Tableau 6), ce qui nous a permis d'écrire le modèle polynomial de second degré proposé dans l'équation 1.

$$Pr=12,18+0,73X_1+0,15X_2-0,03X_3+1,53X_4+0,02X_1^2+0,64X_2^2+0,02X_3^2+0,30X_4^2-0,15(X_1X_2)-0,60(X_1X_3)-0,34(X_1X_4)-0,30(X_2X_3)-0,53(X_2X_4)-0,97(X_3X_4). \quad (\text{Equation 1})$$

Tableau 6 : Effets estimés des variables et coefficient de régression de la production de protéines par la souche *Actinopolyspora* sp.

	Effet	Err-Type	t(13)	p	-94% Lim.Conf	+94% Lim.Conf	(coeffs)	Err-Type (coeffs)	-94% Lim.Conf	+94% Lim.Conf
Moy ord/Orig	12,18405	1,264159	9,63807	0,000000	9,57984	14,78827	12,18405	1,264159	9,57984	14,78827
Mc ( $X_1$ )	1,47884	1,032182	1,43273	0,175543	-0,64750	3,60517	0,73942	0,516091	-0,32375	1,80258
Mc ( $X_1$ ) <sup>2</sup>	0,05295	1,032182	0,05130	0,959867	-2,07338	2,17928	0,02648	0,516091	-1,03669	1,08964
PV ( $X_2$ )	0,30423	1,032182	0,29475	0,772841	-1,82210	2,43057	0,15212	0,516091	-0,91105	1,21528
PV ( $X_2$ ) <sup>2</sup>	1,29105	1,032182	1,25079	0,233054	-0,83529	3,41738	0,64552	0,516091	-0,41764	1,70869
EP ( $X_3$ )	-0,06614	1,032182	-0,06408	0,949885	-2,19247	2,06020	-0,03307	0,516091	-1,09624	1,03010
EP ( $X_3$ ) <sup>2</sup>	0,05692	1,032182	0,05514	0,956862	-2,06942	2,18325	0,02846	0,516091	-1,03471	1,09163
SA ( $X_4$ )	3,07143	1,032182	2,97567	0,010729	0,94509	5,19776	1,53571	0,516091	0,47255	2,59888
SA ( $X_4$ ) <sup>2</sup>	0,61247	1,032182	0,59338	0,563110	-1,51386	2,73881	0,30624	0,516091	-0,75693	1,36940
$X_1X_2$	0,30556	1,264159	0,24171	0,812778	-2,29866	2,90977	0,15278	0,632080	-1,14933	1,45489
$X_1X_3$	1,20635	1,264159	0,95427	0,357356	-1,39787	3,81057	0,60317	0,632080	-0,69893	1,90528
$X_1X_4$	-0,69841	1,264159	-0,55247	0,589998	-3,30263	1,90580	-0,34921	0,632080	-1,65131	0,95290
$X_2X_3$	-0,61111	1,264159	-0,48341	0,636843	-3,21533	1,99311	-0,30556	0,632080	-1,60766	0,99655
$X_2X_4$	-1,07143	1,264159	-0,84754	0,412026	-3,67565	1,53279	-0,53571	0,632080	-1,83782	0,76639
$X_3X_4$	-1,94841	1,264159	-1,54127	0,147234	-4,55263	0,65580	-0,97421	0,632080	-2,27631	0,32790

L'analyse de la variance résumée dans le tableau 7 montre que l'effet linéaire de la variable sulfate d'ammonium ( $X_4$ ) est significatif. Tous les autres coefficients ont des valeurs de p supérieures à 0,06. Ce qui montre l'absence d'effets d'interaction et d'effets quadratiques significatifs.

Tableau 7 : Analyse de la variance pour la production des protéines du plan composite centré.

Model	SC	dl	MC	F	P
MC ( $X_1$ )	13,1217	1	13,12174	2,052710	0,175543
MC ( $X_1$ ) <sup>2</sup>	0,0168	1	0,01682	0,002632	0,959867
PV ( $X_2$ )	0,5553	1	0,55535	0,086876	0,772841
PV ( $X_2$ ) <sup>2</sup>	10,0008	1	10,00080	1,564483	0,233054
EP ( $X_3$ )	0,0262	1	0,02625	0,004106	0,949885
EP ( $X_3$ ) <sup>2</sup>	0,0194	1	0,01944	0,003041	0,956862
SA ( $X_4$ )	56,6020	1	56,60204	8,854588	0,010729
SA ( $X_4$ ) <sup>2</sup>	2,2508	1	2,25075	0,352098	0,563110
$X_1X_2$	0,3735	1	0,37346	0,058422	0,812778
$X_1X_3$	5,8211	1	5,82111	0,910631	0,357356
$X_1X_4$	1,9511	1	1,95112	0,305225	0,589998
$X_2X_3$	1,4938	1	1,49383	0,233688	0,636843
$X_2X_4$	4,5918	1	4,59184	0,718328	0,412026
$X_3X_4$	15,1852	1	15,18525	2,375517	0,147234
Erreur	83,1012	13	6,39240		
Total SC	194,5740	27			

A partir du tableau 6 nous constatons que le coefficient avec un signe (+) indique que le facteur a un effet synergétique. En revanche, un signe (-) met en évidence un effet antagoniste du facteur. De ce fait, Les combinaisons (Mc.SA), (PV.EP), (PV.SA), (EP.SA) ainsi que le facteur 3 (EP) linéaire, ont une influence négative sur le rendement des protéines.

Afin de simplifier le modèle nous allons donc éliminer les autres termes de l'équation. Donc la réponse de Pr est représentée par le modèle réduit :

$$Pr = 12,18 + 1,53X_4 \quad (\text{Equation 2})$$

À partir de l'équation 1, il a été prédit que la concentration croissante du sulfate d'ammonium pourrait augmenter la production de protéine en raison de son effet positif. Le sulfate d'ammonium ( $X_4$ ) a l'effet le plus performant sur la réponse. D'après le tableau 6 nous constatons que le coefficient du sulfate d'ammonium ( $X_4 = +1,53$ ) est supérieur aux coefficients des autres facteurs étudiés.

#### 4.1.1 Diagramme de Pareto des protéines

Les résultats seront également présentés dans le graphique des effets de Pareto (Figure 20). La figure montre chacun des effets estimés linéaire et quadratique ainsi que leurs niveaux optimaux qui affecte le rendement.

Toutes les combinaisons possibles des quatre variables s'avèrent non significatives. L'effet quadratique du marc de café est le plus faible, il nous renvoie vers le caractère écotoxique de cette matière qui peut agir sur le rendement (Carassou, 2015).

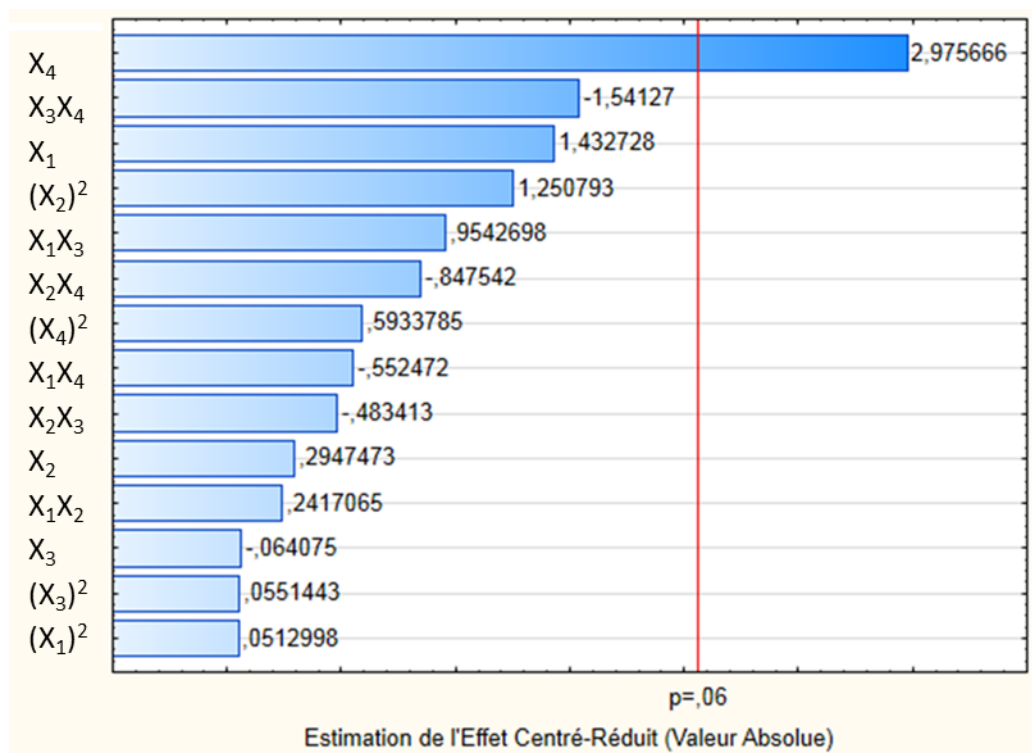


Figure 20 : Diagramme de Pareto montrant l'effet linéaire, quadratique et croisé du Mc, d'EP, des PV et SA sur la production de protéines par *Actinopolyspora* sp.

#### 4.1.2 Graphiques de contour des réponses

La figure 21 représente les contours de surface des modèles d'interaction des différents facteurs sont obtenus en maintenant les autres variables constantes au niveau central (niveau 0) et en faisant varier deux autres dans les limites expérimentales qui sont dans notre étude l'intervalle de 2 à 10 g/l codé par les valeurs (-2,5 et +2,5) respectivement pour l'ensemble des facteurs.

A travers les courbes de contour dessinées, nous observons clairement l'absence d'interactions mutuelles entre les combinaisons de sulfate d'ammonium et les plumes de volailles, le sulfate d'ammonium et les épluchures de pomme de terre et le sulfate d'ammonium et le marc de café respectivement.

Les contours de réponse indiquent que les réponses optimales se situent dans la limite supérieure de la concentration en sulfate d'ammonium.

Le rendement en protéines est indépendant de la concentration en marc de café les variations en concentration affectent peu la production (Figure 18c)

Malgré l'absence d'interaction entre les deux variables dans les figures (a) et (b) nous constatons que l'augmentation de la concentration en sulfate d'ammonium combiné à des valeurs minimales d'épluchures de pomme de terre (b) et de plumes de volailles (a) donnent les meilleurs rendements et permettent d'atteindre une concentration maximale de 24mg/ml de production en protéine.

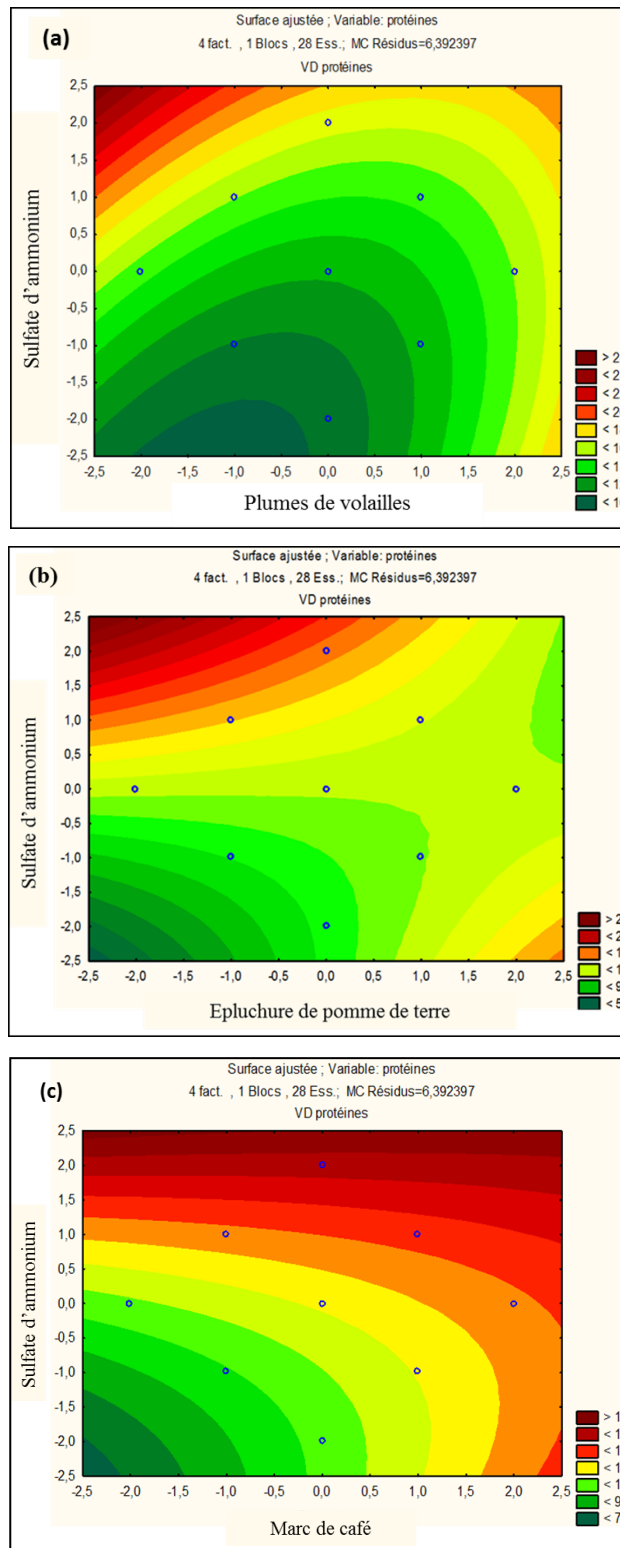


Figure 21 : Contours des surfaces de réponses de la production de protéines par *Actinopolyspora sp.*

## 4.2 Modélisation statistique de la production de kératinase

Les réponses observées et prédites des 27 expériences sont présentées dans le (Tableau8).

Tableau 8 : Plan composite centré de Box et Wilson à quatre facteurs, avec l'activité kératinolytique de la souche *Actinopolyspora* sp. Comme réponse.

Essais	Observée	Prévue	Résidus
1	1,454	1,434	0,020
2	2,554	2,487	0,067
3	1,417	1,191	0,226
4	2,317	1,592	0,725
5	1,525	0,936	0,589
6	1,504	1,497	0,007
7	1,408	1,304	0,105
8	1,321	1,213	0,108
9	1,500	0,998	0,502
10	0,950	0,936	0,014
11	1,596	1,484	0,112
12	0,792	0,770	0,021
13	1,004	1,611	-0,606
14	1,442	1,057	0,385
15	3,250	2,707	0,543
16	1,600	1,502	0,098
17	1,096	1,476	-0,380
18	0,975	1,323	-0,348
19	1,208	1,332	-0,124
20	0,929	1,534	-0,605
21	0,792	1,270	-0,479
22	1,254	1,504	-0,250
23	0,975	1,534	-0,559
24	1,217	1,386	-0,170
25	0,946	1,027	-0,081
26	1,342	1,027	0,315
27	0,921	1,027	-0,106
28	0,900	1,027	-0,127

Afin d'évaluer la relation entre les variables dépendantes et indépendantes, et de déterminer la production optimale de kératinase correspondante aux niveaux optimaux des facteurs, une analyse de régression multiple est appliquée sur les données expérimentales (Tableau 9), ce qui nous a permis d'écrire le modèle polynomial de second degré proposé dans l'équation 3.

$$Kr = 1,02 - 0,03X_1 + 0,05X_2 + 0,05X_3 - 0,03X_4 + 0,09X_1^2 + 0,10X_2^2 + 0,09X_3^2 + 0,10X_4^2 - 0,16(X_1X_2) - 0,12(X_1X_3) - 0,27(X_1X_4) + 0,15(X_2X_3) + 0,18(X_2X_4) + 0,27(X_3X_4). \quad (\text{Equation 3})$$

Où Kr est la réponse prédite de l'activité kératinolytique (mg/ml/min) et  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$  sont les valeurs codées indiquant la concentration du marc de café, les épluchures de pomme de terre, les plumes de volailles et le sulfate d'ammonium, respectivement.



Tableau 9 : Effets estimés des variables et coefficient de régression de la production de kératine par la souche *Actinopolyspora* sp.

	Effet	Err-Type	t(13)	P	-94,% Lim.Conf	+94,% Lim.Conf	(coeffs)	Err-Type (coeffs)	-94,% Lim.Conf	+94,% Lim.Conf
Moy ord/Orig	1,027083	0,257491	3,98881	0,001544	0,49664	1,557525	1,027083	0,257491	0,496641	1,557525
MC (X <sub>1</sub> )	-0,076389	0,210241	-0,36334	0,722191	-0,50949	0,356715	-0,038194	0,105120	-0,254746	0,178358
MC (X <sub>1</sub> ) <sup>2</sup>	0,186285	0,210241	0,88605	0,391684	-0,24682	0,619389	0,093142	0,105120	-0,123410	0,309694
PV (X <sub>2</sub> )	0,100694	0,210241	0,47895	0,639931	-0,33241	0,533798	0,050347	0,105120	-0,166205	0,266899
PV (X <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>	0,202951	0,210241	0,96533	0,351996	-0,23015	0,636055	0,101476	0,105120	-0,115076	0,318028
EP (X <sub>3</sub> )	0,116667	0,210241	0,55492	0,588371	-0,31644	0,549771	0,058333	0,105120	-0,158219	0,274885
EP (X <sub>3</sub> ) <sup>2</sup>	0,180035	0,210241	0,85633	0,407325	-0,25307	0,613139	0,090017	0,105120	-0,126535	0,306569
SA (X <sub>4</sub> )	-0,073611	0,210241	-0,35013	0,731851	-0,50672	0,359493	-0,036806	0,105120	-0,253358	0,179746
SA (X <sub>4</sub> ) <sup>2</sup>	0,216493	0,210241	1,02974	0,321911	-0,21661	0,649597	0,108247	0,105120	-0,108305	0,324799
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0,326042	0,257491	-1,26622	0,227653	-0,85648	0,204400	-0,163021	0,128746	-0,428242	0,102200
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-0,245833	0,257491	-0,95472	0,357134	-0,77628	0,284609	-0,122917	0,128746	-0,388138	0,142304
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	-0,557292	0,257491	-2,16431	0,049641	-1,08773	-0,026850	-0,278646	0,128746	-0,543867	-0,013425
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,305208	0,257491	1,18532	0,257108	-0,22523	0,835650	0,152604	0,128746	-0,112617	0,417825
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0,364583	0,257491	1,41591	0,180314	-0,16586	0,895025	0,182292	0,128746	-0,082929	0,447513
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0,555208	0,257491	2,15622	0,050380	0,02477	1,085650	0,277604	0,128746	0,012383	0,542825

Tableau 10 : Analyse de la variance pour l'activité kératinolytique du plan composite centré.

Model	SC	dl	MC	F	P
MC ( $X_1$ )	0,035012	1	0,035012	0,132016	0,722191
MC ( $X_1$ ) <sup>2</sup>	0,208212	1	0,208212	0,785092	0,391684
PV ( $X_2$ )	0,060836	1	0,060836	0,229391	0,639931
PV ( $X_2$ ) <sup>2</sup>	0,247136	1	0,247136	0,931859	0,351996
EP ( $X_3$ )	0,081667	1	0,081667	0,307935	0,588371
EP ( $X_3$ ) <sup>2</sup>	0,194475	1	0,194475	0,733295	0,407325
SA ( $X_4$ )	0,032512	1	0,032512	0,122589	0,731851
SA ( $X_4$ ) <sup>2</sup>	0,281215	1	0,281215	1,060362	0,321911
$X_1X_2$	0,425213	1	0,425213	1,603323	0,2276*53
$X_1X_3$	0,241736	1	0,241736	0,911499	0,357134
$X_1X_4$	1,242296	1	1,242296	4,684249	0,049641
$X_2X_3$	0,372609	1	0,372609	1,404972	0,257108
$X_2X_4$	0,531684	1	0,531684	2,004788	0,180314
$X_3X_4$	1,233025	1	1,233025	4,649292	0,050380
Erreur	3,447692	13	0,265207		
Total SC	8,240037	27			

**SC:** somme des carrés; **dl:** degré de liberté; **MC:** moyenne des carrés; **F** = Fisher; **P** = probabilité.

Grâce à l'analyse des paramètres statistiques du tableau de l'analyse de la variance (ANOVA), Nous avons pu déterminer les relations entre les variables et la réponse représentée dans le tableau 6.

Les valeurs de probabilité inférieures à 0,06 ( $p < 0,06$ ) sont considérées comme significatives alors que la valeur de P supérieure à 0,06 ( $p > 0,06$ ) indiquant que le facteur n'pas une influence significative. Les valeurs de p obtenues après une ANOVA (Tableau10) révèlent que les interactions entre le marc de café et le sulfate d'ammonium ( $X_1X_4$ ), et l'interaction entre les épluchures de pomme de terre et le sulfate d'ammonium ( $X_3X_4$ ) sont considérées comme des facteurs significatifs pour la production de kératinase. Les autres variables, y compris ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ) linéaire et quadratique ainsi que les autres combinaisons ont une valeur de p supérieure à 0,06 et sont considérés comme non significatifs.

Une seconde analyse de régression multiple a été appliquée sur les données expérimentales, en ignorant les termes dont les effets ne sont pas significatifs. Ce qui a donné

une seconde équation polynomiale du second degré pour expliquer la production de kératinase par *Actinopolyspora* sp. :

$$Kr = 1.02 - 0.27(X_1X_4) + 0.27(X_3X_4). \quad (\text{Equation 4})$$

A partir de l'équation 4, il a été prédit que des concentrations croissantes des interactions entre le marc de café et le sulfate d'ammonium, ainsi que l'interaction entre les épluchures de pomme de terre et le sulfate d'ammonium dans les intervalles explorés devraient augmenter la production de kératinase en raison de leurs effets positifs.

#### 4.2.1 Diagramme de Pareto de la kératinase

Les résultats sont concertés par la représentation du graphique des effets de Pareto (figure 22). La figure montre les effets entre des facteurs étudiés et indique les facteurs qui ont une influence significative sur l'activité kératynolytique.

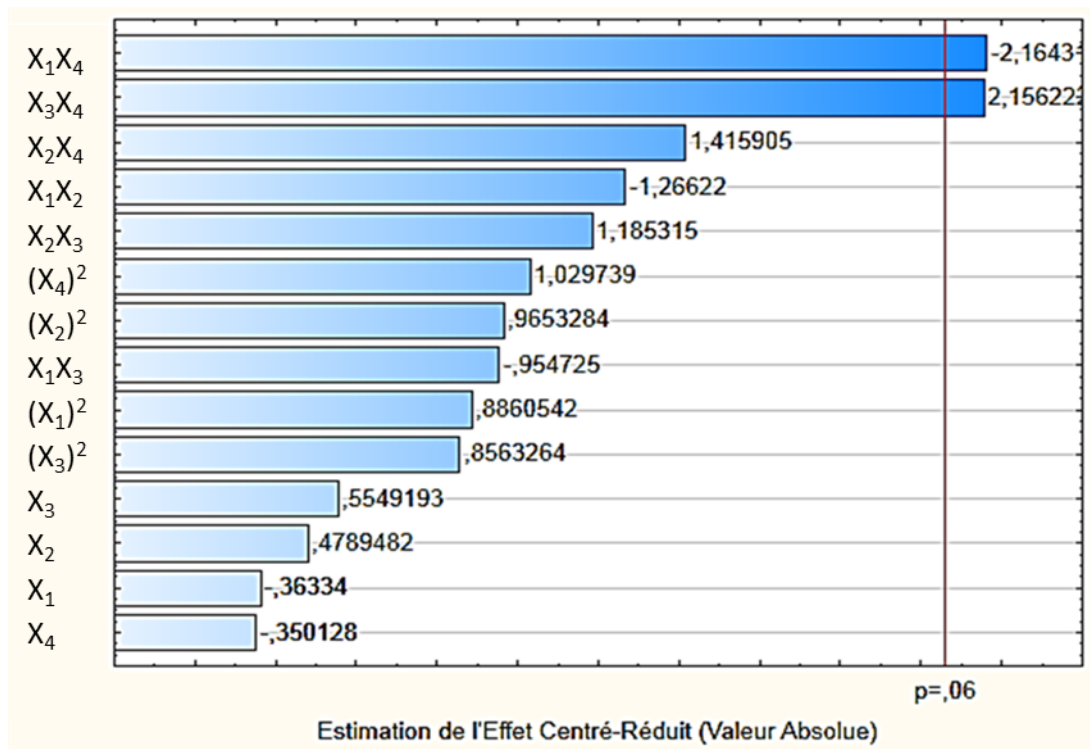


Figure 22 : Diagramme de Pareto montrant l'effet linéaire, quadratique et croisé du Mc, EP, PV et SA sur la production de la kératinase par *Actinopolyspora* sp.

A travers les résultats obtenus nous constatons que l'effet des facteurs, linéaire et quadratique n'a aucune influence sur l'activité kératynolytique. Mathématiquement parlant il a été prouvé que la production de kératinase est indépendante de la combinaison de tous les facteurs étudiés à l'exception de l'interaction significative entre  $(X_1X_4)$  et  $(X_3X_4)$ .

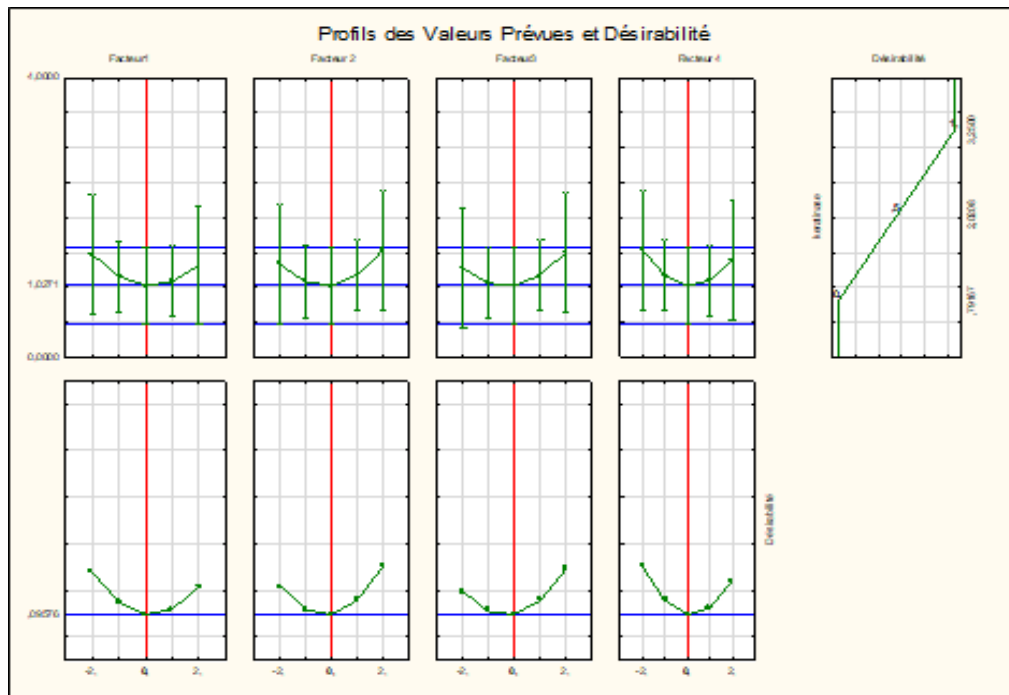


Figure 23 : Valeurs prédites et réelles des composés des milieux de culture et de la production de kératinase.

La figure 23 représente le résultat de l'optimiseur de réponse utilisant une fonction de désirabilité pour montrer quels niveaux de facteurs indépendants produisent la réponse prédite la plus souhaitable. Les profils de réponse prévus et le niveau de désirabilité des facteurs indiquent qu'il y a eu une amélioration de production de kératinase. Nous constatons que la valeur expérimentale (1,02mg/ml/min) est supérieure à la valeur prédite (0,97 mg/ml/min).

#### 4.2.2 Représentations et analyse des surfaces de réponses

La figure 24 représente les tracés de surfaces de réponses de l'activité kératinolytique. Elle illustre l'effet des interactions des différents facteurs sur l'activité kératinolytique par des représentations tri-dimensionnelles. Chaque illustration possède deux facteurs variables du domaine expérimental tandis que la troisième est fixée à son niveau central.

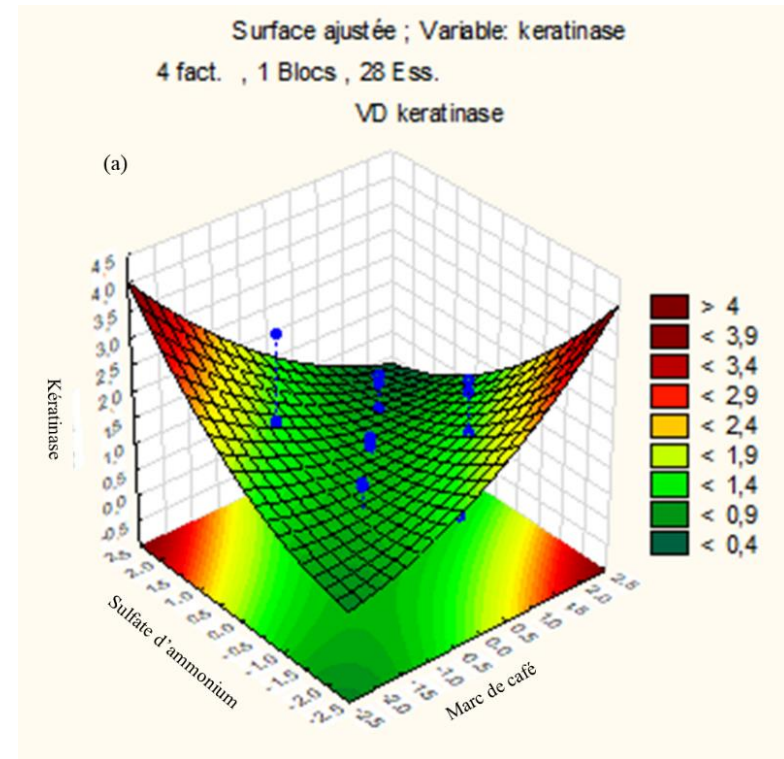
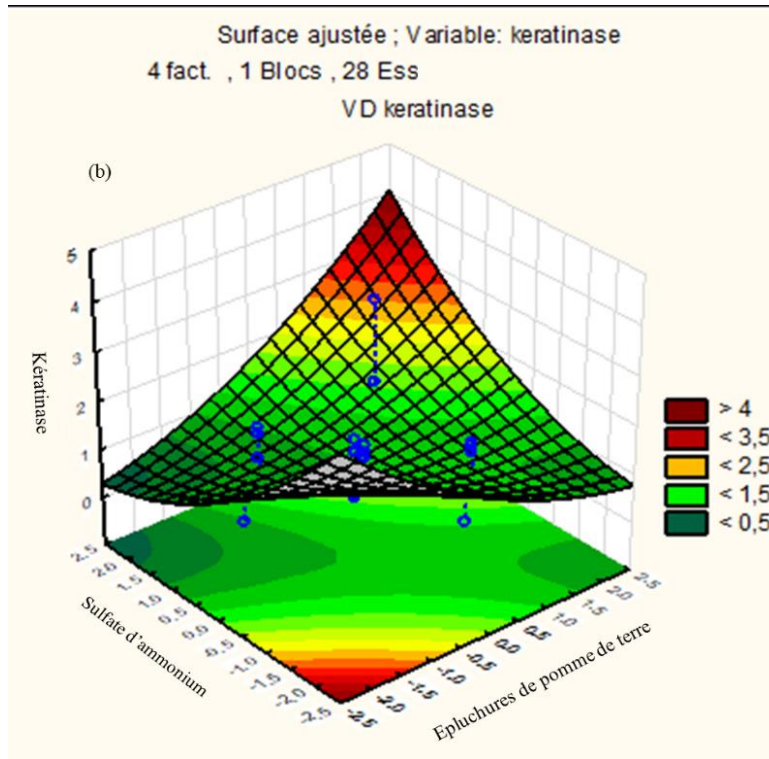


Figure 24 : Model de surface de réponse de la kératinase (mg/ml/min) produite par la souche *Actinopolyspora* sp.

La figure 24 représente les effets des variables croisés les plus significatifs sur la reponse (production de kératinase). La methodologie de surface de reponse est très efficace dans la determinacion des optimas dans la production des enzymes. Elle a ètè utilisèe par (Oussadi, 2018) dans la production de l'a- amylase.

Les effets croisés des facteurs observés sur la figure 24 nous ont permis de confirmer les résultats statistiques précédents (Tableau ANOVA). Nous constatons qu'il existe deux effets significatifs, l'effet croisé  $X_1 X_4$  ainsi que l'effet combiné des facteurs  $X_3 X_4$ . Nous notons ainsi que la production de kératinase est affectée de manière inversement proportionnelle quant à la concentration des deux facteurs marc de café et sulfate d'ammonium. Nous observons également, L'étroite corrélation entre l'effet des facteurs  $X_3$  et  $X_4$  sur La production de kératinase. Ces derniers ont l'effet positif le plus important. Leur interaction atteint une valeur optimale supérieur à 4 mg/ml/min. l'effet combiné des variables significatives a permis de donner une forme concave des surfaces de réponse qui indique que nous pouvons trouver les valeurs optimales de la kératinase dans la gamme moyenne des variables étudiées. Les mêmes formes ont été retrouvées par (Gasmi, 2017), dans l'étude de l'activité chitinolytique.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La dégradation des déchets agroalimentaire a été étudiée en vue de dépolluer l'environnement. La valorisation microbienne des déchets vise à produire des métabolites à forte valeur ajoutée notamment des protéines et spécialement la kératinase.

L'influence des quatre paramètres, le marc de café, les épluchures de pomme de terre, les plumes de volaille et le sulfate d'ammonium sur cette production a fait l'objet de notre travail. Pour atteindre nos objectifs nous avons adopté la méthodologie des surfaces de réponses (RSM) et le plan composite centré (CCD), qui nous ont permis de décrire et de modéliser d'une manière correcte l'influence de ces quatre facteurs expérimentaux sur l'efficacité du traitement.

L'analyse de la variance (ANOVA) nous a permis d'identifier les facteurs qui ont un effet significatif sur la production des protéines et de la kératinase par une souche actinomycétale *Actinopolyspora* sp. Parmi les 4 facteurs étudiés, seul trois effets se sont révélés significatifs, l'effet linéaire du sulfate d'ammonium et les effets croisés du ( $X_1X_4$ ) et ( $X_3X_4$ ). Nous avons noté que la production maximale de protéines est de l'ordre de 32,11 mg/ml appartenant au milieu 16. La valeur maximale de la kératinase (3,25 mg/ml/min) a été obtenue dans le milieu 15 contenant (8 g/l de Mc 8 g/l de PV 8 g/l d'EP et 4 g/l de SA). Néanmoins, des résultats positifs ont été obtenus depuis l'effet combiné de (McSA et EPMc).

D'après l'analyse des résultats finaux nous concluons que la souche *Actinopolyspora* sp. est capable de produire la kératinase.

Après cette étude la perspective majeure est d'optimiser expérimentalement l'influence des autres facteurs pour améliorer le rendement et d'étudier l'effet croisé des facteurs non significatifs. Des essais à l'échelle pilote sont envisageable pour se rapprocher d'une production d'enzyme à l'échelle industrielle est également possible. L'emploi de ces déchets dans la formulation de milieux de cultures pour la production d'autres métabolites à forte valeur ajoutée.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abdel-Fattah, A. M., El-Gamal, M. S., Ismail, S. A., Emran, M. A. et Hashem, A. M. «Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis*ALW1.» *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16, n° 2 (2018): 311.
- Aladjadjiyan, A. « Agricultural Waste as a Source of Raw Materials ». *National Biomass Association* . Aladjadjiyan. 3-5 (2018).
- Anandan, R, Dharumadurai, D, et Manogaran, G.P. «Actinobacteria - basics and biotechnological applications.» Chap. 1 dans *An introduction to Actinobacteria.*, de Dhanasekaran Dharumadurai, & Yi Jiang, édité par Dharumadurai Dhanasekaran, & Yi Jiang, 4-20. IntechOpen, 2016.
- Appolaire, A. «Étude des grands assemblages protéolytiques de la famille TET : processus d'oligomérisation et régulation fonctionnelle associée.» thèse de doctorat, Chimie Biologie , Université de Grenoble , 2014, 3.
- Balet, Jean-Michel « Gestion des déchets ».. 5ème édition, Dunod Paris, 31, 41, 90 ,91 . 2016.
- Beazley, A. « Recycling is better for the environnement » . Greenhaven press. (Viqi wagner) , 31-38 .2009.
- Belyagoubi, L. « Antibiotiques produits par des bactéries (Actinomycètes et bactéries lactiques) issu de différents écosystèmes naturels Algériens » Université Aboubakr Belkaid, Telemcen ,7. 2014.
- Ben ammar, S and Fouly, B. «Techniques sciences méthodes.» Situation des déchets dans les pays en développement et enjeux de leur caractérisation, (2008): 97-108.
- Benkahoul, M. «Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité coagulante des protéases de deux chardons endémiques, *Galactites tomentosa* et *Onopordum acanthium*.» thèse de doctorat, Département de Microbiologie, Constantine, 2016, 3-4.
- Bergey, W. « Bergey's manuel of systematic bactériology. The Actinobacteria ». (New York Springer). Five volum.35. 2012.
- Blackman, W C. « Basic hazardous waste managment ». third edition. (Lewis publishers).2-37 ( 2001).
- Boudmagh, A. « Isolement, à partir des sols sahariens, de bactéries actinomycétales productrice de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives ». Thèse de doctorat, Département de Microbiologie appliquée, Constantine, 2007, 41-44.

- Box. G. E. P and Wilson K. B. « the Experimental Attainment of Optimum Conditions ». *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. 13, n°1 (1951) : 1-45
  - Brandelli, A, Sala, L, et Kalil, S.J. «Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products.» *Food Research International* (Elsevier Ltd.) 73 (2015): 4, 10.
  - Brandelli, A. «Bacterial Keratinases : Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond.» *Food Bioprocess Technology* (Springer-Verlag) 1, n° 2 (2008): 105.
  - Bressollier, P, Letourneau, F, Urdaci, M, et Verneuil, B. «Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*.» *Applied and Environmental Microbiology* (American Society for Microbiology) 65, n° 6 (1999): 2570.
  - Călin, M, Constantinescu-Aruxandei, D, Alexandrescu, E, Răut, L, Doni, M.B. *et al.*, «Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi.» *Electronic Journal of Biotechnology* (Production and hosting by Elsevier) 28 (2017): 101.
  - Chamikara, P. « Advanced study on selected taxonomic groups of bacteria and archaea » microbiology university of Kelaniya, Sri Lanka .2016.
- Carassou, F. « Une récupération spécifique du marc de café aurait-elle une plus-value pour la communauté ? ». île de Montréal. Université de Sherbrooke.2015.13
- Debananda, S.N., P Kshetri, S Sanasam, et S Nimaichand. «Screening, identification of best producer and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkali tolerant indigenous actinomycetes.» *World Applied Sciences Journal*. 7, n° 7 (2009): 907.
  - Debenest, G. « Présentation dans le cadre de l'enseignement Génie de l'environnement , basé sur les travaux de F.Hénom., A.Pujol, 2015
  - Debey, Gerard. le café et la santé. John Libbey Eurotext, 1993.
  - Djemaci, B. « La gestion des déchets municipaux en Algérie / analyse prospective et élément d'efficacité ». Thèse de doctorat en sciences économiques Université de Rouen, 2012. 12-36.
  - Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K. ; Rebers P. A. et Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. 28 (1956) : 350-356.
  - Embley. « The molecular phylogeny and systematic of actinomycetes ». *Natural history museum, London, England. Annual reviews* , 1994.
  - Enseign. J C « Formation, propriétés et germination of actinomycetes spores » . *annual reviews* 186.( 1978).

- Faust Kakai, H, Alban Gilles Kakai et Armelle Grey Tohouegnon « Agriculture urbaine et valorisation des déchets au Bénin : une approche de développement durable. » (Vertigo) 10, n°2 (2010).
- François, P, et Corvini, X. « Etude physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* producteur de pristinamycines : Activités enzymatiques du métabolisme central et mesure du pH intracellulaire. » thèse de doctorat., Biotechnologies et Industries Alimentaires., Institut National Polytechnique De Lorraine, 2000, 10.
- Friedrich, A, et Antranikian, G. « Kertatin Degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a Novel Thermophilic Anaerobic Species of the Order Thermotogales. » *Applied and Environmental Microbiology* (American Society for Microbiology) 62, n° 8 (1996): 2875.
- Gasmi, M. « Isolement, identification et criblage d'actinomycètes à activité chitinolytique du sol de la région de Laghouat. optimisation de la production de chitinase par *Streptomyces griseorubens* C9 par la méthode des surfaces de réponse. » Biotechnologie et Biochimie, Université des frères mentouri, constantine, 2017.
- Gasmi M, Kitouni M « Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology ». (*Ann Microbiol*).67, (2017) :175– 183.
- Goodfellow et Williams. « Ecology of actinomycetes ». *Annu Rev Microbiol* 190.(1983).  
Guan-Yi Xu, Ai-Mei Liao, Ji-Hong Huang, Jian-Guo Zhang, Kiran Thakur, Zhao-Jun Wei « Evaluation of structural, functional, and anti-oxidant potential of differentially extracted polysaccharides from potato peels », *International journal of biological macromolecules* volume 129 (2019), 778-785
- Gushterova, A, Vasileva-Tonkova, E, Dimova, E, Nedkov, P et Haertle, T. « Keratinase production by newly isolated Antarctic actinomycete strains. » *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21 (2005): 831.
- Habbeche, A. « Purification et caractérisation d'une kératinase thermostable KERAK-29 chez une nouvelle souche d'Actinomycète. » thèse de doctorat, Département de Biochimie, Université Badji Mokhtar Annaba, 2014, 4-19.
- Harir, M, Bendif, H, Bellahcene, M, Fortas, Z et Pogni, R « *Streptomyces* Secondary Metabolites. » Chap. 6 dans *Basic Biology and Applications of Actinobacteria.*, de Shymaa Enany, 100-110. IntechOpen, 2018.

- Ismail, M, Bouzaza, A, Bouhelassa, M and Wolbert, D. «modélisation et optimisation de la photodegradation du 4-methylphénol dans un réacteur à recirculation en présence d'UV/ZnO.» *Revue des sciences de l'eau*, 2009: 461-573.
- Jayanthi, A, et Ritika, C. Bioprospecting of actinomycetes : Computational drug discovery approach . Vol. 1, chap. 6 dans *Advances in Biotechnology*, de Md Fakruddin, Hafiz Muhammad Nasir Iqbal, Jayanthi Abraham. Asis Datta, 3. Open Access eBooks, 2017.
- Joanne Willey, Linda Sherwood, Christopher J. Woolverton. « *Prescott's Microbiology* ». Chapitre 42 *Biotechnology and industrial microbiology* Vol. 10. McGraw-Hill Education, 2017. 948
- Kassangye Kangoyi John Ngoyi, et Olive Mudimbiyi « Household waste management in the health district of Bulaska in Mbuji-Mayi in Democratic republic of Congo.» *The Pan African Medical Journal*, 24. 2016.
- Kehila, Y. « La gestion des déchets solides en Algérie ». ANGED, giz, 29. 2014,
- Kitouni, M « Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées ». thèse de doctorat. Constantienne, 2007, 14.
- Kumar, D, Savitri, Thakur, N, Verma, R, and Bhalla, T.C. «Microbial Proteases and Application as Laundry Detergent Additive.» *Research Journal of Microbiology* 3, n° 12 (2008): 661-672.
- Kumar, L, and Jain, S.K.. «Proteases: A Beneficial Degradative Enzyme in Therapeutic Applications.» *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences* 1.5, n° 4 (2018): 114.
- Kumawat, T. K., Sharma, A, Sharma, V et Chandra, S. «Keratin Waste: The Biodegradable Polymers.» Chap. 9 dans *Keratin*, de Miroslav Blumenberg, 150. IntechOpen, 2018.
- Łaba, W, Żarowska, B, Chorążyk, D, Pudło, A, Piegza, M. and Kancelista, A. «New keratinolytic bacteria in valorization of chicken feather waste.» *AMB Express* 8, n° 9 (2018).
- Lacour J., Bayard R., Emmanuel E., Gourdon R. « Evaluation du potentiel de valorisation par digestion anaérobie des gisements de déchets organiques d'origine agricole et assimilés en Haïti ». *Déchets - Revue Francophone d'Écologie Industrielle*, n°60 (2011) : 30-40.

- Lange, L, Huang, Y and Busk, P. K.. «Décomposition microbienne de la kératine dans la nature: nouvelle hypothèse de pertinence industrielle.» *Applied Microbiology and Biotechnology* (Springer Berlin Heidelberg) 100, n° 5 (2016): 2083.
- Lechevalier A Hubert and Lechevalier Mary P « Biology of actinomycetes ». Institute of microbiology, new jersey. (1967). 94
- Lin, X, Lee, C, Casale, E.S., and Shih, J.C.H.. «Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading *Bacillus licheniformis* Strain.» *Applied And Environmental Microbiology* (American Society for microbiology) 58, n° 10 (1992): 3271.
- Loehr, R. « Agricultural Waste Management: Problems, Processes and Approaches ». Academic Press Inc. 1974.335-337
- Lowry O. H., Rosebroughi N. J., Farr A. L. et Randall R. J. Protein measurement
- Meunier, N. «Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes.» thèse de doctorat, B. Sc. Biochimie, Université du Québec INRS-Eau, 1999.
- Miller, D. « Garbage and Recycling » . Gale Cengage learning , 2009.28-35
- Navone, L., and Speight, R.. « Understanding the dynamics of keratin weakening and hydrolysis by proteases » *PLoS ONE* 13, n° 8 (2018).
- Nawani, N, Aigle, B, Mandal, A, Bodas, M, Ghorbel, S and Prakash, D. «Actinomycetes : Role in Biotechnology and Medicine.» *BioMed Research International / Hindawi Publishing Corporation.*, 2013: 1.
- Nigam, P.S. «Enzymes microbiennes ayant des caractéristiques spéciales pour les applications biotechnologiques.» *Biomolecules*, 2013: 598.
- Ningthoujam, D. S., Kshetri, P, Sanasam, S and Nimaichand, S. «Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes.» *World Applied Sciences Journal* 7, n° 7 (2009): 907.
- Ningthoujam, D. S., Tamreihao, K, Mukherjee, S, Khunjamayum, R, Devi, L.J. and Asem, R.S. «Keratinaceous Wastes and Their Valorization through Keratinolytic Microorganisms.» Chap. 8 dans *Keratin*, de Miroslav Blumenberg. IntechOpen, 2018.
- Oussadi, M.I., Kitouni, M « Statistical optimization of cultural conditions of an halophilic alpha-amylase production by halophilic *Streptomyces* sp. Grown on orange waste powder. (*Biocatal Agric Biotechnol*), 4, 2015 :685-693.

- Oussadi, M.I. «selection et optimisation de la production d'alpha-amylase par Streptomyces sp. 20r par la methodologie des surface de reponse.Clonage et expression de deux gènes.» Biotechnologie microbienne, génomes et environnement, Université des frères mentouri , constantine, 2018.
- Pandey, A, Chandra, N, Srivastava, A, Kumar, D, and Kumar, S. «Antimicrobial Metabolites Producing Soil Microorganisms: An update.» *Indian Journal of Applied Microbiology* 21, n° 1 (2018): 46.
- Purchase, D. «Microbial Keratinases: Characteristics, Biotechnological Applications and Potential.» Dans *The handbook of microbial bioresources*, de V. K. Gupta, G. D. Sharma, M. G. Tuohy, & R. Gaur, 22. International Publishing Wallingford,UK, 2016.
- Qinyuan Li Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang. « Actinobactéria bases and biotechnological application ». Dharumadurai dhanasekaran and Yi jiang. (2016).60
- Reponen TA, Gazenko, SV Grinshpun, S.A. Willeke, K andd Cole EC. «Characteristics of Airborne Actinomycete Spores.» *Applied and environmental microbiology* 64 (1998): 3807-3812.
- Rhyner, Charles R. Schwartz, Leander J Robert B. Wenger, Mary G. Kohrell. « Waste management and resource recovery ». CRC Press, (1995).6,241
- Riffel, A, and Brandelli, A. «Keratinolytic Bacteria Isolated From Feather Waste.» *Brazilian Journal of Microbiology* 37 (2006): 395-396.
- Riffel, A, Brandelli, A, Bellato, C. M. , Souza, G. H.M.F. , Eberlin, M. N., et Tavares, F. C.A. «Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from Chryseobacterium sp. kr6.» *Journal of Biotechnology* 128 (2007): 694.
- Riffel, A, Lucas, F, Heeb, P,and Brandelli, A. «Characterization on a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin.» *Archives of Microbiology* (Springer-Verlag), 2003: 258.
- Rugthaworn P, Dilokkunanant U, Sangchote S, *et al.*, « search and improvement of actinomycete strains for biological control of plant pathogens ». *Kasetsart J.(Nat. Sci)* 2,41 (2007):248–254.
- Sahoo , D. K., H. N. Thatoi, Bhabatosh, M, Mondal, K. C., and Das Mohapatra, P. K. *Advances in Microbial Keratinase and Its Potential Applications*. Vol. 1, chap. 5 dans *Microbial Biotechnology : Applications in Agriculture and environment*, édité par J. K. Patra, C. N. Vishnuprasad, & G. Das, 106-108. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2017.

- Shah, A, Tyagi, S, Bharagava, R, *et al.* «Keratin Production and Its Applications: Current and Future Perspective.» Chap. 2 dans *Keratin as a Protein biopolymer : Extraction from Waste Biomass and Applications*, édité par S Sharma, & A Kumar, 21-23. Springer Nature Switzerland AG, 2019.
- Sharaf, E. F., and Khalil, N. M. «Keratinolytic activity of purified alkaline keratinase produced by *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) and its amino acids profile.» *Saudi Journal of Biological Sciences* (Production and hosting by Elsevier B.V.) 18, n° 2 (2011): 117.
- Sharma, M, Dangi, P, and Choudhary, M. «Actinomycetes : source, identification and their applications.» *international journal of current microbiology* 3, n° 2 (2014): 811.
- Takahashi.Y and Nakashima.T. « Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics » *antibiotics* (Tokyo) 7, n°2 (2018): 7.
- Takahashi.Y and Nakashima.T. «Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics.» *antibiotics* (Tokyo) n°7, 2 (2018): 7.
- Takizawa, M, Colwell, Rita R. and Hill, Russell T.. «Isolation and Diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay.» *Applied And Environmental Microbiolog* 59, n° 4 (1993): 997.
- Tchobanoglous G., burton F., stensel H. « Waste-water Engineering: treatment and reuse ». Fourth edition. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited,( 2003), 1819.
- Vaijayanthi, G, Vaijayakumar, R., and Dhanasekaran. D. «Actinobacteria - A Biofactory of Novel Enzymes.» Chap. 14 dans *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, de Dharumadurai Dhanasekaran , & Yi Jiang, 330-339. IntechOpen, 2016.
- Valsange, A, Evarkar, S.P. and Kareppa, B.M. «Analysis of protease activity of enzyme isolated from compost soil.» *Internationa Multidisciplinary Research Journal* 2, n° 6 (2012): 1.
- Vidmar, B, and Vodovnik, M. «Microbial Keratinases: Enzymes with Promising Biotechnological Applications.» *Food Technol. Biotechnol.*, 2018: 313-321.
- Waksman, S.A. « Production of enzymes and of growth- promoting substances. Vol. 9, chap. 6 dans *Actinomycetes : their nature, occurrence, activity and importance* », de Selman Abraham Waksman, 22-23-40 -100. Waltham, Mass., U.S.A: Chronica Botanica Company, 1950.
- Williams, C. M., Richter, C. S., MacKenzie, J. M. JR., and Jason Shih, C. H. « Isolation, Identification and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium » *Applied Environmental Microbiology* (American Society for Microbiology) 56, n° 6 (1990): 1509.
- Zegels, A. « Composter les déchets organiques ». *Wallonie environnement SPW.6*. (2018).



## La webographie

- Agence nationale des déchets . 2019 [http:// and.dz/presentation/strategie-nationale-de-la-gestion-des-dechets/](http://and.dz/presentation/strategie-nationale-de-la-gestion-des-dechets/)(accès le 10 avril 2019)
- Creative enzyme. 2019. <https://www.creative-enzymes.com> (accès le 14 Mars 2019).
- Développement durable. <https://www.futursciences.com/planete/definitions/developpement-durable-dechet-5725/>.(accès le 9 avril 2019)
- <https://ourworld.unu.edu/en/the-waste-revolution-in-nagoya> (accès le 10 avril 2019)
- Kazilek, CJ. Arizona State University School of Life Sciences Ask A Biologist. 31 mai 2017. <https://askbiologist.asu.edu/explore/la-biologie-des-plumes> (accès le 04 18, 2019).
- La banque mondiale. « déchets quel gachi 2.0 des ordures ménager » un état des lieux actualisés des enjeux de la gestion (2018). <https://www.banquemonde.org/fr/news/immersive-story/2018/09/20/what-a-waste-an-updated-look-into-the-future-of-solid-waste-management>.( accès le 12 mai 2019)
- Our world « Nagoya’s waste revolution » (2008.)
- United States Environmental Protection Agency . « types of composting and understanding the process ». (2017). (Accès le 20 avril 2019) <https://www.epa.gov/reducefoodwaste/types-composting-and-understanding-process>.

## **ANNEXES**

---

## Annexe 1 La composition des milieux de cultures

### Milieu ISP2 (solide)

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml
NaCl	100g

pH = 7,3

### Milieu ISP5

Glycérol	10 g
L-Asparagine	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Solution saline <sup>1</sup>	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml
NaCl	50 g

pH = 7-7,4

### Solution Saline

FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Zn SO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Eau distillée qsp	100 ml

## Annexe 2 Préparation des solutions nécessaires

### Composition de la solution M.

- Solution A : 2% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans de  $\text{NaOH}$  0,1N.
- Solution B : 1% de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans l'eau distillée.
- Solution C : 2% tartrate double de sodium et de potassium dans l'eau distillée.
- Solution M : c'est un mélange de :
  - 20 ml de la solution A
  - 1 ml de la solution B
  - 1 ml de la solution C

### Préparation du tampon hydroxide de glycine et sodium

Recette et préparation du tampon à l'hydroxyde de glycine et de sodium (0,08 M, pH 10).

Pour la preparation de 100 ml du tampon **hydroxide de glycine et sodium (0.08 M, pH 10)**:

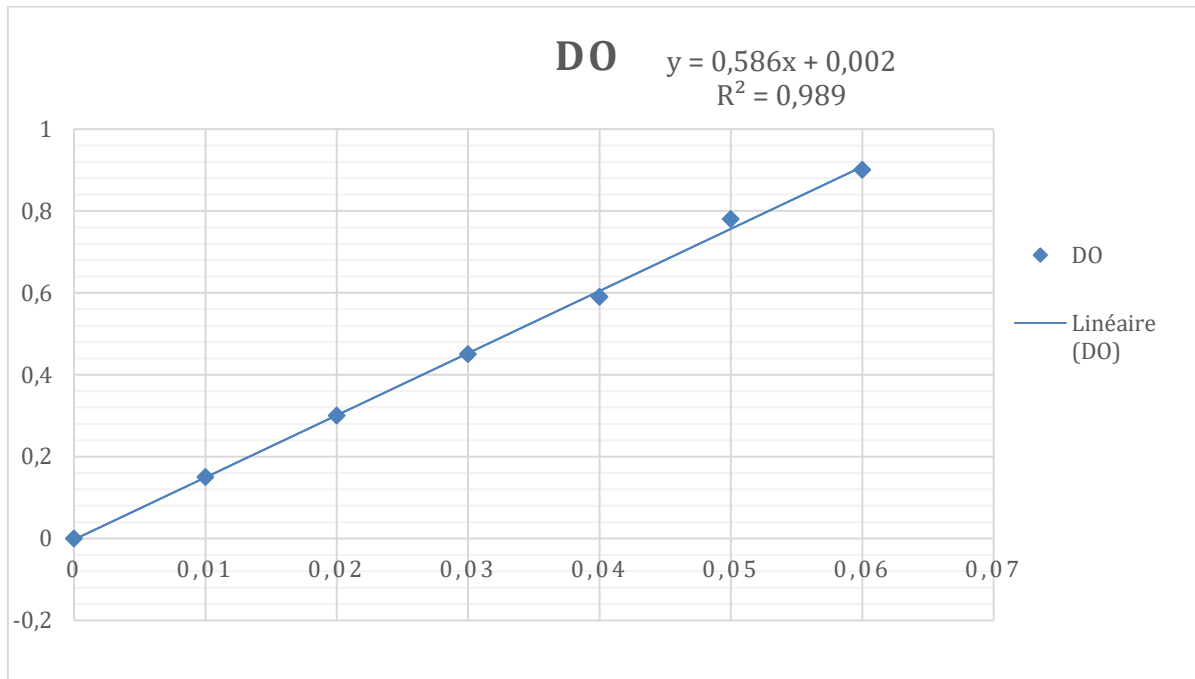
Table 1. Composants requis

Composant	Mass	Molarité
Glycine (mw : 75 g/mol)	375 mg	0.05 M
Sodium hydroxide (mw: 40 g/mol)	128 mg	0.032 M

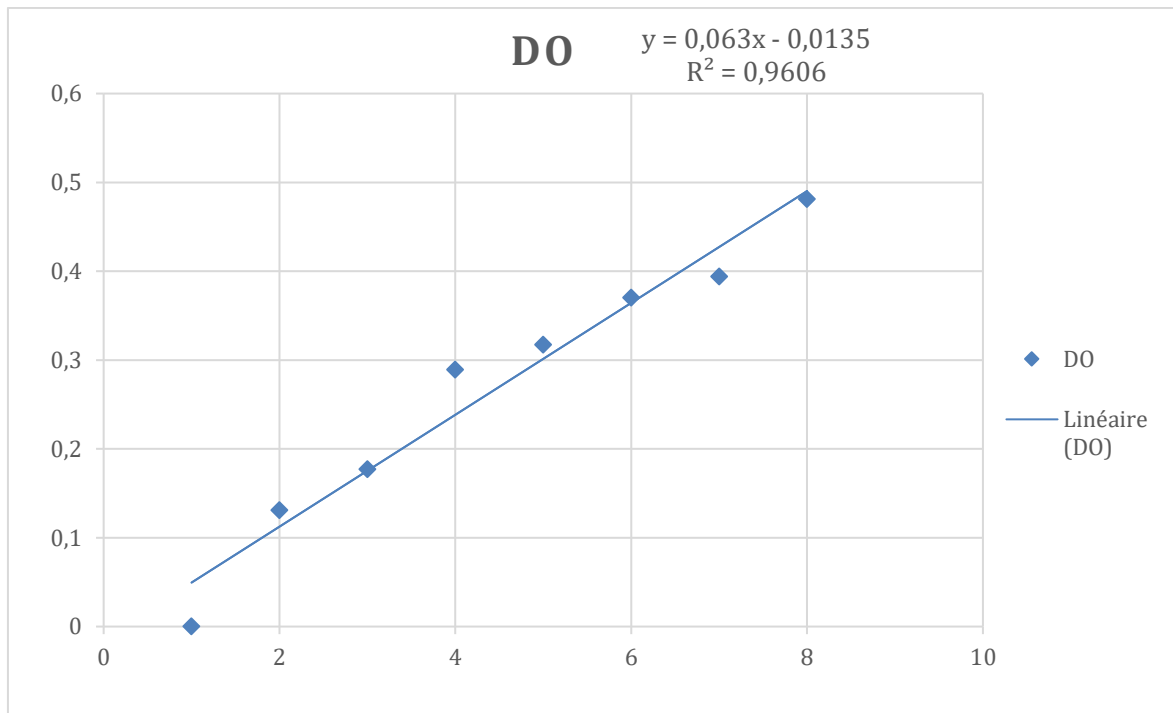
1. Préparez 80 mL d'eau distillée dans un recipient approprié.
2. Ajoutez 375 mg de glycine à la solution.
3. Ajoutez 128 mg of d'hydroxyde de sodium à la solution.
4. Ajoutez la solution au pH final souhaité avec  $\text{HCl}$  ou  $\text{NaOH}$ .
5. Ajoutez de l'eau distillée jusqu'à atteindre un volume de 100 mL.

### Annexe 3 : Les Courbes étalons réalisées

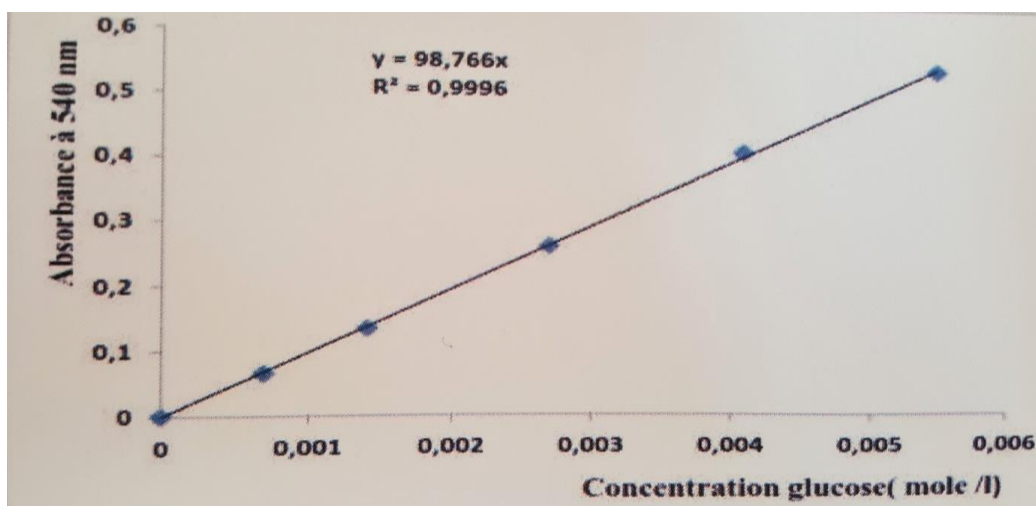
Courbe étalon de glucose (les sucres totaux)



Courbe étalon de protéines (Chicken Egg protéine).



Courbe de la tyrosine (activité kératinolytique).



**Annexe 4** Les tableaux des composants chimiques des déchets utilisés.

Composition (en %) de la matière sèche de café verts et torréfiés selon la variété et du café instantané soluble.

Composants	<i>Arabica</i>		<i>Robusta</i>		Poudre de café instantané soluble
	Vert	Torréfié	Vert	Torréfié	
Minéraux	3,0-4,2	3,5-4,5	4,0-4,5	4,6-5,0	9,0-10,0
Caféine	0,9-1,2	~ 1,0	1,6-2,4	~ 2,0	4,5-5,1
Trigonelline	1,0-1,2	0,5-1,0	0,6-0,75	0,3-0,6	-
Lipides	12,0-18,0	14,5-20,0	9,0-13,0	11,0-16,0	1,5-1,6
Acides chlorogéniques totaux	5,5-8,0	1,2-2,3	7,0-10,0	3,9-4,6	5,2-7,4
Acides alipathiques	1,5-2,0	1,0-1,5	1,5-2,0	1,0-1,5	-
Oligo-saccharides	6,0-8,0	0-3,5	5,0-7,0	0-3,5	0,7-5,2
Polysaccharides totaux	50,0-55,0	24,0-39,0	37,0-47,0	-	~ 6,5
Acides aminés	2,0	0	2,0	0	0
Protéines	11,0-13,0	13,0-15,0	11,0-13,0	13,0-15,0	16,0-21,0
Acides humiques	-	16,0-17,0	-	16,0-17,0	15,0

Composition chimique des épiluchures de pomme de terre.

Co-produits	MS	MAT	Cellulose	Amidon	Calcium	Phosphore	Potassium
	%	% MS					
<i>Ecart de triage</i>	19.4	11.0	2.7	64.2	0.04	0.21	2.40
<i>Screening</i>	20.3	10.3	3.0	72.3	0.12	0.24	/
<i>Pulpes</i>	19.0	5.5	18.6	40.6	0.46	0.13	1.00
<i>Protéines (CPPT)</i>	90.0	85	1	0.2	0.09	0.28	0.92
<i>Amidon</i>	87.8	0.6	0.6	91.2	0.11	0.23	0.57
<i>Epluchures vapeur</i>	13.7	17.4	9.0	20.6	0.30	0.24	/
<i>Purées solides</i>	26.0	8.0	3.0	72.5	0.06	0.06	0.9
<i>Chips (38 % MG)</i>	95.5	5.9	2.5	44.8	0.04	0.14	0.70

Composition en sucre du café torréfié.

Type de glucides	% matière sèche	Composants	Effet de la torréfaction
Monosaccharides	0,2-0	Glucose, Fructose, Arabinose (traces), Galactose.	Diminution à torréfaction intense augmentation (0,09-0.57 %)
Oligosaccharides	0,4-2,8	Saccharose.	Diminution
Polysaccharides solubles dégradés	5,8-12,1	Combinaison variée de Arabinose (arabane), Galactose (galactane), Mammose (mannane), Glucose (cellulose).	Augmentation Solubilisation partielle des polysaccharides dégradés.
Helocellulose	10-21	-	-
Phytates (inositol hexaphosphate)	0,1-0,2	-	-
TOTAL	16,2-37,9	-	-

**OPTIMISATION ET MODELISATION DE LA PRODUCTION DE LA  
KERATINASE PAR LA SOUCHE *ACTINOPOLYSPORA* SP.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie Microbienne

**Résumé**

Dans un contexte de valorisation de quelques sous-produits agro-alimentaires (marc de café, plumes de volailles, épluchures de pomme de terre), la souche *Actinomycetale* sp. a été testé pour son aptitude à produire la kératinase dans des milieux de fermentation conçus à partir de ces déchets en adoptant la méthodologie des plans d'expériences, en particulier la méthodologie des surfaces de réponses (RSM) et les plans composites centrés (CCD), pour évaluer les effets du marc de café, des plumes de volaille, des épluchures de pomme de terre et du sulfate d'ammonium sur la production de l'enzyme. Les résultats obtenus ont révélé une activité kératinolytique dans tous les milieux néanmoins avec des concentrations différentes où l'activité maximale est atteinte dans l'essai 15, avec une valeur de 3,25 mg/ml/min. La méthodologie adoptée nous a permis de conclure que seuls trois parmi quatre facteurs (marc de café, les plumes de volaille, les épluchures de pomme de terre et le sulfate d'ammonium) ont des effets significatifs. L'effet linéaire du sulfate d'ammonium, sur la production des protéines totales et les effets combinés, du marc de café avec le sulfate d'ammonium d'un côté et les épluchures de pomme de terre avec le sulfate d'ammonium de l'autre sur la production de kératinase. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que la souche étudiée est productrice de kératinase.

**Mots clés :** Actinomycète, déchets, kératinase, *Actinopolyspora* sp., CCD, RSM.**Laboratoire de recherche :** Génie microbiologie et applications

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** M. BENHIZIA Y. (Professeur - UFM Constantine),  
**Rapporteur :** M. KITOUNI M. (Professeur - UFM Constantine),  
**Examineur :** Mme. GUERGOURI I. (MAA - UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 08/07/2019