

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Saad Dahleb Blida**



**Faculté d'ingénierie**

**Département de Génie des Procédés**

**OPTION : génie de l'environnement**

**Mémoire de fin d'étude**

**Pour l'obtention du**

**TITRE DU DIPLOME EN MASTER 02**

**INTITULÉ**

***Contribution à l'étude de la production d'un  
biosurfactant issu d'une souche bactérienne marine et  
ses applications biotechnologiques***

- **Réalisé par :**
  - M<sup>ELLE</sup> MOUSLI Chaïma.
  - M<sup>ELLE</sup> RADJA Siham.
- **Encadreur :** **Prof. A. BADIS.**

**Année universitaire : 2018/2019**

## *Remerciements*

### الحمد لله رب العالمين

*Nos vifs remerciements à notre promoteur Monsieur le Professeur **BADIS Abdelmalek**, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour le temps consacré, les précieux conseils, la patience manifesté à notre égard durant la réalisation de ce mémoire et pour les nombreux encouragements prodigué. Nous vous exprimons notre reconnaissance.*

*A madame/ monsieur le président du jury, dont vous nous faites l'immense honneur de présider ce jury, nous vous en sommes profondément reconnaissantes.*

*Aux examinateurs/examinatrices, pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail, veuillez croire, à nos respectueux remerciements.*

*Aux nos enseignants, pour la qualité d'enseignement, les connaissances et la rigueur, soyez assuré (e) de notre plus grand respect et de notre gratitude.*

*Nous tenons à remercier particulièrement les doctorantes **Riad, Baichi, Saidani** et docteur **Ferradji** pour leurs conseils et leurs aides durant la réalisation de notre travail.*

*Egalement, nous tenons à remercier spécialement docteur **Eddouaouda**, madame **Khalouia**, et madame **Rahem**, qui ont répondu favorablement aux questions quotidiennes dont nous les accablions.*

*Nos derniers remerciements vont au Docteur **MOUSLI Asma** qui a tout fait pour nous aider, qui nous a soutenu et surtout supporté dans tout ce que nous avons entrepris.*

# *Dédicace*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que : je dédie cette mémoire de magistère à :*

## **A MA TRES CHERE MERE : MOUCER FATMA**

*Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.*

*Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours.*

*Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes cotés pour mes consoler quand il fallait.*

*En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon profond estime.*

*Puisse dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur afin que je puisse te combler à mon tour.*

## **A MON TRES CHER PERE : RADJA MUSTAPHA**

*Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme.*

*En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières.*

*Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous de vos efforts.*

*En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves.*

*Puisse dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.*

## **A MES TRES CHERS FRERES : ABED HAMIDE – H'CENE – AMER**

*Je vous exprime à travers ce travaille mes sentiments de fraternité et d'amour. Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

## **A MA PETITE SŒUR INES**

*Une sœur comme on ne peut trouver nulle part ailleurs, puisse Allah te protège, garder et renforces notre fraternité.*

*Je te souhaite tout le bonheur du monde.*

## **A TOUS MES ONCLES ET TANTES**

### **FAMILLE RADJA**

**HOCIN** et sa femme **FADILA**

**DJAMAL** et sa femme **SAFIA**

**NADIA** et son mari **HAMIDE**

**YOUSEF** et sa femme **DALILA**

**WANASSE** et sa femme **SARA**

**MALIKA** et son mari **NACER**

### **FAMILLE MOUCER**

**SAID** et sa femme **RACHIDA**

**AMER** et sa femme **HAYET**

**KARIM** et sa femme **SARAH**

**MALIKA** et son mari **AISSA**

**SALIHA** et son mari **SAMIR**

## **A MES ADORABLES COUSINS ET COUSINES**

*Je vous dédie tout en vous souhaitant une longue vie pleine de réussite, de santé et de bonheur*

*A MA CHERE BINOME CHAIMA : qui était toujours à mes côtés et n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager. Jamais des simples mots ne me permettront de t'exprimer mes remerciements ma très chère amie.*

**A TOUS MES AMIS**

**MAROUA- AMINA- IHESSAN- SARA- BOUCHERA**

*je considère comme sœurs. Je vous remercie de votre patience, vous m'avez aidé toujours à avancer, merci d'être toujours près de moi.*

**OTHEMAN**

*Merci d'être toujours à mes côtés. Que Dieu nous garde toujours unies.*

**ABED RAHMAN**

*Merci d'être toujours à mes côtés et de m'encourager.*

*En fin à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou à un autre et qui ont participé à faire de moi celle que je suis aujourd'hui.*



**...RADJA SIHEM...**

## *Dédicace :*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que*

*Je dédie ce travail:*

*A MA TRÈS CHÈRE MÈRE,*

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.*

*A mon fiançais Kamel, mes sœurs Asma, F/Z et son mari Mourad, ils m'ont chaleureusement supporté, encouragé et me donnent l'amour et de la vivacité tout au long de mon parcours.*

*A toute ma famille et surtout ma chère grande mère,*

*A toutes mes amies Sona, Bicha, Sara et Manel pour tous les moments que nous avons partagés durant ces années des plus difficiles aux meilleurs, en espérant pouvoir en partager encore tant d'autres.*

*A tous Mes camarades qui ont partagé avec moi la joie et le malheur du laboratoire vert que je souhaite plus de succès.*

*Et enfin, et en particulier à ma copine Sihem mon binôme pour ton sourire qui fait ma joie dans les moments heureux et qui me donne le courage de continuer dans les moments difficiles.*

*Merci d'être toujours à mes côtés. Que Dieu nous garde toujours unies.*

*A tous ceux qui j'aime et qui m'aiment  
Que Dieu vous réserve bonne santé, bonheur et longue vie*

*Merci !*

*...Chaïma MOUSLÉ...*



## المخلص:

تهتم هذه الدراسة باكتشاف السلالات البكتيرية المعزولة حديثاً للنظم الحيوية الجزائرية. و على وجه الخصوص سلالة من جنس العصوية, حيث يكمن الهدف الأساسي في محاولة إنتاج المواد الفعالة الحيوية و تطبيقاتها في التكنولوجيا الحيوية في العديد من المجالات.

تعتبر السلالة البكتيرية S13 هي سلالة بحرية متوسطة الحجم المعزولة من الطحالب البنية البحرية Zonariatoureforii من مجمع السياحي "القرن الذهبي" في تيارزة. علاوة على ذلك، أظهرت هذه السلالة قدرتها على استخدام زيت الزيتون كمصدر وحيد للكربون لإنتاج جزيء حيوي "biosurfactant" يبلغ عائدته 1.13 غ/لتر.

تبين التحليلات الطيفية للـ FTIR أن المستحضر الحيوي ينتمي إلى فئة glycolipides ، ويتميز هذا الجزيء الحيوي بخصائص خافضة للتوتر السطحي مثيرة للاهتمام مثل انخفاض كبير في توتر السطح ( $29\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). هذا الأخير مستقر في مجال واسع من الملوحة (0 غ/لتر - 300 غ/لتر)، الحموضة ودرجة الحرارة. بالإضافة إلى ذلك، يحتوي هذا المفاعل الحيوي على نشاط تآزري مضاد للنمو، ومضاد للأكسدة بنسبة 91 ٪ ويتميز بنشاط فعال ضد الميكروبات و بعض الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض. كما تجدر الإشارة إلى أن تقييم السمية النباتية للعوامل الحيوية التي تمت دراستها على حبوب القمح ، الذي لم يظهر أي تأثيرات سامة بتركيزات تتراوح من 0.3 غ/لتر إلى 0.6 غ/لتر. برهنت نتائج اختبار الغسيل المتحصل عليها عن طريق استخدام هذا الأخير الفعالية الكبيرة للـ biosurfactant مقارنة مع نظيره الاصطناعي المسوق .

تشير جميع الدراسات إلى الأهمية البالغة للسلالة البحرية S13 و عاملها الحيوي في مجال التكنولوجيا الحيوية لمختلف التطبيقات, التي نذكر منها المعالجة البيولوجية للمياه الملوثة بالبترول و مشتقاته و كذا الرواسب البحرية ، إضافة إلى معالجة التربة و تطبيقات أخرى في العديد من المجالات كمستحضرات التجميل ، الطب ، الزراعة والأغذية الزراعية ، إلخ...

**الكلمات المفتاحية:** السلالة البكتيرية - العوامل الحيوية - الإنتاج - التوصيف - نشاط مضادات الميكروبات - نشاط مضادات الأكسدة - الفعالية السمية.

**Abstract:**

This study focuses on a contribution to the exploration of newly isolated bacterial strains of Algerian biotopes. Among these, a strain of the genus *Bacillus*. Our investigation lies primarily in biosurfactant production trials and their biotechnological applications in several fields.

The bacterial strain S13 is one of the mesophile souche marine isolated from *Zonariatoureforii* brown seaweed at the "Golden Horn" tourist complex in Tipaza. Moreover, this strain has shown its ability to use aerobic olive oil as the sole source of carbon and energy to produce a biomolecule biosurfactant type with a yield of the order of 1.13 g / L. Spectrometric analyzes by FTIR show that the biosurfactant belongs to the glycolipids, this biomolecule is characterized by interesting surface-active properties such as a significant reduction of the surface tension (29 m N.m<sup>-1</sup>). It is stable in a wide range of salinity (0g / L - 300g / L), pH and temperature. In addition, this biosurfactant has a synergetic anti-growing activity, antioxidant of the order of 91% and has an interesting antimicrobial activity against certain pathogenic microorganisms. The washing performance is tested by the use of the latter, the results obtained show the effectiveness of this biosurfactant compared to its synthetic counterpart trade.

It should be noted that the evaluation of the phytotoxicity of biosurfactant studied on wheat grains, showed the absence of toxic effects in concentrations ranging from 0.3 g / L to 0.6 g / L.

All of the promising results indicate that the S13 marine strain and its biosurfactant remain of technological interest for various types of applications, such as the bioremediation of hydrocarbon contaminated waters and marine sediments, soil remediation as well as other applications in several fields, in particular, cosmetics, medicine, agriculture and the food and wine field.

**Key words:** Bacterial strain - Biosurfactant - Production - Characterization - Antimicrobial activity - Antioxidant activity - Toxic potency.

**Résumé :**

Cette présente étude porte sur une contribution à l'exploration des souches bactériennes nouvellement isolées de biotopes algériens. Parmi celles-ci, une souche du genre *Bacillus*. Notre investigation réside en premier lieu sur des essais de production de biosurfactants et leurs applications biotechnologiques en plusieurs domaines.

La souche bactérienne S13 est une souche marine mésophile isolée de l'algue brune *Zonariatoureforii* au complexe touristique "Golden Horn" à Tipaza. Par ailleurs, cette souche a montré sa capacité d'utiliser l'huile d'olive en aérobiose comme la seule source de carbone et d'énergie pour produire une biomolécule de type biosurfactant avec un rendement de l'ordre de 1,13 g/L. Les analyses spectrométriques par FTIR montrent que le biosurfactant appartient aux glycolipides, cette biomolécule est caractérisée par des propriétés tensioactives intéressantes tels qu'une importante réduction de la tension de surface (29 m N.m<sup>-1</sup>). Elle est stable dans une large gamme de salinité (0g/L - 300g/L), de pH et de température. De plus, ce biosurfactant possède une activité anti-croissante synergétique, antioxydante de l'ordre de 91% ainsi, il présente une activité antimicrobienne intéressante contre certains microorganismes pathogènes. La performance de lavage est testée par l'utilisation de ce dernier, les résultats obtenus montrent l'efficacité de ce biosurfactant par rapport à son homologue synthétique du commerce.

A noter que l'évaluation de la phytotoxicité de biosurfactant étudié sur les grains de blé, a montré l'absence des effets toxiques dans les concentrations allant de 0,3 g/L et 0,6 g/L.

L'ensemble des résultats prometteurs, indiquent que la souche marine S13 et son biosurfactant demeurent d'intérêts biotechnologiques pour divers types d'applications, tels que la bioremédiation des eaux et des sédiments marins contaminés par des hydrocarbures, la dépollution des sols ainsi que d'autres applications dans plusieurs domaines, notamment, la cosmétique, la médecine, l'agriculture et le domaine agroalimentaire.

**Mots clés :** Souche bactérienne –biosurfactant – production – caractérisation - activité antimicrobienne - activité antioxydant - pouvoir toxique.

## Liste des figures

<u>Figures</u>	<u>Page</u>
<b>Figure 1.1</b> : Structure schématique d'un surfactant.	3
<b>Figure1.2</b> : Classification des surfactants selon la nature des groupements.	5
<b>Figure 1.3</b> : Exemple des surfactant anionique.	6
<b>Figure 1.4</b> : Formule de la molécule de dodecyl sulfate de sodium (SDS).	6
<b>Figure 1.5</b> : Exemple des surfactant cationique.	7
<b>Figure1.6</b> : Exemple des surfactant zwitterioniques.	8
<b>Figure 1.7</b> : Exemple des surfactants non ioniques.	8
<b>Figure 1.8</b> : Exemple de surfactants naturels à base de polyols.	9
<b>Figure 1.9</b> : Structures chimiques de certains biosurfactants courants.	15
<b>Figure 1.10</b> : Structure d'un rhamnolipide.	16
<b>Figure1.11</b> : Structures de sophorolipides sous forme acide.	17
<b>Figure 1.12</b> : Structure chimique de base de la C15-surfactine-O-méthyl ester.	18
<b>Figure 1.13</b> : Structure de certains lipopeptides produits par B.subtilis.	20
<b>Figure 1.14</b> : structure du radical libre du DPPH et DPPH non radicalaire.	32
<b>Figure. 1.15</b> : Graphe montrant la relation dose/ mortalité.	38
<b>Figure. 1.16</b> : Graphe montrant la relation dose/ effet sur papier log-probit.	39
<b>Figure 2.1</b> : Localisation du biotope utilisé pour l'isolement de la bactérie à partir d'une algue brune marine « Corne d'Or sur la carte de Google ».	43
<b>Figure 2.2</b> : Repiquage de la souche S13.	44
<b>Figure 2.3</b> : La préculture de la souche S13.	46
<b>Figure 2.4</b> : La production de biosurfactants par la souche S13 dans le milieu MM.	47
<b>Figure 2.5</b> : Extraction par l'hexane.	47
<b>Figure 2.6</b> : Récupération de biosurfactants par extraction l'acétate d'éthyle.	48
<b>Figure 2.7</b> : Technique de déplacement du pétrole.	49
<b>Figure 2.8</b> : Test d'émulsification E24.	50

<b>Figure 2.9 :</b> Les différentes taches utilisées pour le test de performances de lavage de biosurfactants par rapport au détergent commercial.	54
<b>Figure. 3.1 :</b> la cinétique de la production du biosurfactant.	56
<b>Figure.3.2 :</b> Histogramme du pouvoir émulsifiant du biosurfactants sur différentes phases huileuses.	57
<b>Figure.3.3 :</b> l'effet de la température sur le biosurfactant.	58
<b>Figure 3.4 :</b> Effet de la variation de pH sur la stabilité chimique de biosurfactant.	59
<b>Figure.3.5 :</b> Effet de la salinité sur les propriétés chimiques de biosurfactant.	59
<b>Figure.3.6 :</b> Détermination de la CMC de biosurfactant de la souche s13.	62
<b>Figure. 3.7 :</b> spectre FTIR de biosurfactant produit par la souche S13 d'ou l'huile d'olive source de carbone.	64
<b>Fig.3.8 :</b> utilisation de biosurfactant comme étant un émulsifiant dans la préparation d'une vinaigrette traditionnelle.	66

## Liste des tableaux

<u>Tableaux</u>	<u>Page</u>
<b>Tableau 1.1</b> : Types de surfactants selon leur structure.	4
<b>Tableau 1.2</b> : Les propriétés de surfactant.	10
<b>Tableau 1.3</b> : Applications des tensio-actifs dans l'industrie.	12
<b>Tableau 1.4</b> : Récapitulatif des différents types de surfactant et leurs utilisations.	13
<b>Tableau 1.5</b> : Principales classes de biosurfactants et de microorganismes producteurs respectifs.	21
<b>Tableau 1.6</b> : Les microorganismes marines et les quelque types de biosurfactants.	24
<b>Tableau 1.7</b> : Les types major de biosurfactant produit par des microorganismes.	25
<b>Tableau 1.8</b> : Les propriétés d'un tensioactif en fonction de sa valeur HLB.	29
<b>Tableau 1.9</b> : Différents domaines d'application des biosurfactants.	35
<b>Tableau 1.10</b> : les différents essais toxicologiques.	40
<b>Tableau 2.1</b> : Le matériel de laboratoire.	41
<b>Tableau 2.2</b> : Composition du milieu LB.	45
<b>Tableau 2.3</b> : Composition du milieu MM.	45
<b>Tableau 3.1</b> : la production de biosurfactant par la souche S13.	55
<b>Tableau 3.2</b> : le suivit de la production du biosurfactants en fonction du diamètre de DDP dans le temps.	55
<b>Tableau 3.3</b> : les résultats de l'activité antimicrobienne de biosurfactant contre sept souches ATCC.	60
<b>Tableau 3.4</b> : Effet de la souche S13 sur la croissance des bactéries hydrocarbonoclastes.	61
<b>Tableau 3.5</b> : pourcentage de l'activité antioxydante de biosurfactant.	63
<b>Tableau 3.6</b> : les DO et la teneur en protéine correspondante de biosurfactant et le surnageant.	65
<b>Tableau 3.7</b> : Résultats du test de la phytotoxicité de biosurfactant.	66

**Tableau 3.8** : détermination de l'efficacité de biosurfactant vis-à-vis le détergent commercial.

## Liste des abréviations

**A** : âgé.

**ABTS•** : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique.

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger.

**ARNt** : Acide ribonucléique de transfert.

***B. subtilis*** : *Bacillus subtilis*.

**C/N** : Carbone / Azote.

**C/P** : Carbone/ Phosphore.

**°C** : Degré Celsius.

**µl** : Microlitre.

**cm** : Centimètre.

**CMB** : La Concentration Minimale Bactéricide.

**CMC** : Concentration micellaire critique.

**CMI** : concentration minimale inhibitrice.

**Da** : dalton.

**DDP** : Diamètre du déplacement du pétrole brut.

**DJA** : la dose journalière admissible.

**DMM** : dose mortelle minimale.

**DM50** : dose mortelle de 50.

**DL50** : dose létale 50.

**DPPH** : 1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl.

**DPPH•** : diphenylpicrylhydrazyle.

**E<sub>24</sub>** : Indice d'émulsion.

**F** : femelle.

**FTIR** : Infra Rouge Transformé de Fourier.

**FRAP**: Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter.

**g** : Gramme.

**h** : Heure.

**HLB** : Balance Hydrophile – Lipophile.

**L** : Litre.

**J** : jeune.

**LB** : Milieu Luria Bertani.

**LME** : lipides mannosylerythrioles.

**M** : mâle.

**MH** : Muller-Hinton.

**min** : Minute.

**mL** : Millilitre.

**MM** : Milieu Minimum.

**NOEL** : No Observed Effect Level.

**NRPS** : Non Ribosomal Peptides Synthétase.

**ORAC** : Oxygen Radical Absorbance Capacity.

**pH** : Potentiel Hydrogène.

**p/v** : Poids / volume.

***P.aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*.

**RL** : rhamnolipides.

**SDS** : Sodium dodecyl sulfate.

**t** : temps.

**tr/min** : Tour/minute.

**TRAP** : Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter.

**TS** : Tension de surface.

**UV** : Ultra-Violet.

**v/v** : Volume / volume.

## TABLE DES MATAIRES

REMERCIEMENTS

RESUME

LISTES DES FIGURES

LISTES DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE ..... 1

---

## PARTIE THEORIQUE

---

### CHAPITRE 1:SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1.1 SURFACTANTS (TENSIOACTIFS).....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Définition.....	3
1.1.2 Classification des surfactants.....	5
1.1.3 Propriétés des surfactants.....	9
1.1.4 Applications des surfactants.....	10
<b>1.2 BIOSURFACTANTS.....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Définition.....	14
1.2.2 Classification des biosurfactants.....	14
1.2.3 Microorganismes producteurs de biosurfactants.....	24
1.2.4 Propriétés du biosurfactants.....	26
1.2.4.1 Activité antimicrobienne d'un biosurfactants contre les différentes bactéries.....	26
1.2.4.2 Pouvoir émulsifiant.....	28
1.2.4.3 Balance Hydrophile-Lipophile.....	28
1.2.4.4 La concentration micellaire critique.....	29
1.2.4.5 Activité l'interface et à la surface.....	30

1.2.4.6 Activité antioxydant.....	30
1.2.5 Production d'un biosurfactant.....	32
1.2.6 Avantage des biosurfactants .....	33
1.2.7 Extraction de biosurfactants.....	34
1.2.8 Application de biosurfactants .....	35
<b>1.3 Toxicité de biosurfactants .....</b>	<b>36</b>
Conclusion .....	41

---

PARTIE EXPERIMENTALE

---

**CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES**

2.1 Matérielles.....	41
2.1.1 Appareillage.....	41
2.2 Origine de la souche bactérienne .....	42
2.3 Repiquage et conservation de la souche .....	44
2.3.1 Repiquage de la souche.....	44
2.3.2 Conservation de la souche .....	44
2.4 Milieu de culture .....	44
2.4.1 Milieu LB liquide.....	44
2.4.2 Milieu LB solide .....	45
2.4.3 Milieu MH .....	45
2.4.4 Milieu MM.....	45
2.5 Production de biosurfactants.....	46
2.6 Extraction de biosurfactants.....	47
2.7 Techniques employées pour estimer la production de biosurfactants .....	48
2.7.1 Test de déplacement de pétrole (DDP) .....	48
2.7.2 Tension de surface (TS) .....	49
2.7.3 Indice d'émulsification (E24) .....	49
2.8 Caractérisation structurale de biosurfactants .....	50
2.8.1 Dosage de protéine.....	50
2.8.2 Analyse par FTIR.....	51
2.9 Propriétés physico-chimique de biosurfactants .....	51

2.9.1 Détermination de concentration micellaire critique.....	51
2.9.2 Activité antioxydant.....	51
2.10 Etude de stabilité de biosurfactants.....	51
2.10.1 Stabilité thermique .....	51
2.10.2 Stabilité chimique .....	52
2.10.2.1 Effet de PH.....	52
2.10.2.2 Effet de salinité .....	52
2.11 Activité antimicrobienne.....	52
2. 12 Croissance synergie et/ou anatagoniste .....	52
2.13 Pytotoxicité .....	53
2. 14 Tests de performance de lavage .....	54

### **CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION**

3.1 La production du biosurfactants.....	55
3.2 Extraction et purification du biosurfactants .....	56
3.3 Caractérisation physico-chimique et antimicrobienne de biosurfactants.....	56
3.3.1 Activité émulsifiante .....	56
3.3.2 La stabilité thermique .....	57
3.3.3 La stabilité chimique.....	58
3.3.3.1 Effet de PH.....	58
3.3.3.2 Effet de salinité .....	59
3.3.4 Activité biologique.....	60
3.3.4.1 L'activité antimicrobienne .....	60
3.3.4.2 Activité anti-croissance.....	61
3.3.4.3 Activité antioxydant.....	61
3.3.5 La concentration micellaire critique .....	62
3.4 Caractérisation biochimique et structurale de biosurfactants .....	63
3.4.1 Taux de protéine .....	63
3.4.2 Caractérisation structurale FTIR.....	63
3.5 La phytotoxicité du biosurfactants .....	64

3.6 Application industrielle.....	65
3.6.1 Test de performance de lavage .....	65
3.6.2 Test de pouvoir émulsifiant .....	66
Conclusion .....	67
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>69</b>

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **ANNEXES**

## **APPENDICES**

## INTRODUCTION GENERALE :

Dans le contexte d'un développement durable, les ressources biologiques, renouvelables, sont marquées par leur caractère biodégradable et moins toxique, ce qui les rend plus intéressantes que les produits dérivés du pétrole, ressource épuisable. En particulier, la demande en molécules amphiphiles biosourcées augmente de plus en plus dans le but de substituer les tensioactifs pétrochimiques qui sont actuellement utilisés massivement en formulation, comme détergents, émulsifiants, dispersants, moussants, etc. Par ailleurs, ces molécules amphiphiles biosourcées sont intéressantes car elles peuvent offrir une grande diversité de structures, développées grâce à une disponibilité importante et variée des matières premières d'origine naturelle [1].

Les considérations environnementales liées à un marché en plein essor, incitent aujourd'hui à se détourner de la pétrochimie pour s'orienter vers l'utilisation de matières renouvelables et la production de tensioactifs non toxiques et biodégradables, conçues pour répondre à des besoins spécifiques, en remplacement ou complément des matières premières d'origine pétrolière, dans les produits formulés. [1,2].

Les surfactants sont des composés amphipathiques avec des fractions hydrophiles et hydrophobes ayant la capacité de réduire la tension superficielle et interfaciale entre les fluides. Selon leurs origines, ils peuvent être classés en tensioactif chimique ou biosurfactant [3, 4,6].

Les biosurfactants sont des métabolites primaires et/ou secondaires produits par une variété de microorganismes dont les plus connus sont des bactéries de genre *Bacillus*, *Pseudomonas*, des levures de genre *Candida* et des champignons filamenteux. Ils sont classés par rapport à leur composition chimique en : Glycolipides, Lipolipides, Phosphorolipides, Acide gras, lipide neutre et biosurfactants polymériques, ainsi qu'à leur origine microbienne [5-7].

Au cours des dernières décennies, les biosurfactants ont pris la part de lion des recherches scientifiques récentes en raison de leurs avantages par rapport à leurs homologues synthétiques, notamment une meilleure compatibilité environnementale, la production à partir de substrats de déchets renouvelables, le maintien de l'activité dans des conditions environnementales difficiles, une toxicité faible ou nulle. Ces propriétés permettent de les utiliser pour de nombreuses applications environnementales, alimentaires, pharmaceutiques, médicales, de nettoyage et autres applications industrielles [6].

Ce travail de master s'est intégré dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules de l'université Blida 1. Il s'est intéressé plus spécifiquement d'une part à la production et la caractérisation d'un biosurfactant par une souche marine isolée de littoral de la région de Tipaza, ouest d'Algérie, et d'autre part à la détermination de son pouvoir toxique, antioxydant, anti-croissant et son activité antimicrobienne en vue d'une application industrielle appropriée.

La souche choisie a un intérêt majeur sur le plan industriel ainsi que la recherche scientifique par ce qu'elle présente une production de nombreuses molécules bioactives tel que les biosurfactants.

Nos objectifs de travail viseront à établir :

- La production, la purification et la caractérisation du biosurfactant produit par une souche mésophile.
- La recherche de leurs propriétés adéquates comme agents antioxydant, antimicrobien, nettoyant et dispersant ainsi que leur caractère non toxique.

Le premier chapitre, en l'occurrence la synthèse bibliographique, est structuré en trois grands volets importants et dresse un état des connaissances sur :

- Surfactant : classification, propriétés et application ;
- Biosurfactant : classification, production, les facteurs affectant leur production,
- propriétés physico-chimiques et biologiques, application et toxicité.

Le deuxième chapitre présente la partie expérimentale, qui jette la lumière sur :

- l'origine et la conservation de la souche bactérienne.
- Les méthodes de production et d'analyse utilisées pour la caractérisation du biosurfactant.

Le troisième chapitre est dédié aux résultats obtenus ainsi que les discussions en relation.

En conclusion, nous clôturons notre travail par une synthèse dont laquelle nous résumons les principaux résultats et nous ouvrons les horizons pour les futures recherches.

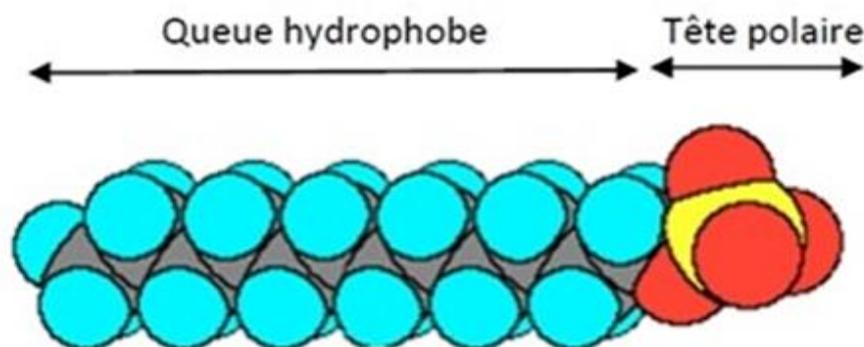
## CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1 SURFACTANTS (TENSIOACTIFS)

#### 1.1.1 Définition :

Un agent de surface ou tensioactif ou surfactant est une substance capable de modifier la tension superficielle entre deux surfaces. Les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles composées de deux domaines de polarités différentes [8] : Figure 1.1

- l'un hydrophile et polaire (affinité pour l'eau).
- un autre hydrophobe et apolaire (affinité pour les lipides).



**Figure 1.1 : Structure schématique d'un surfactant.**

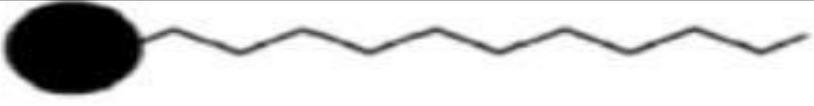
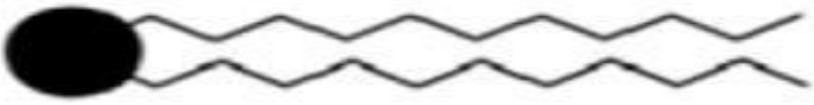
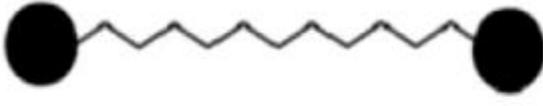
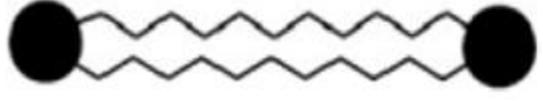
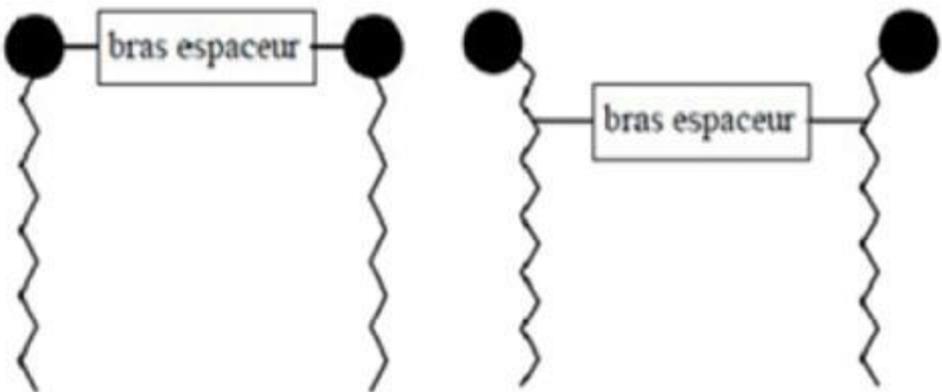
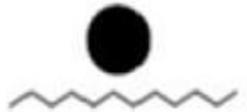
Leur structure particulière permet aux agents de surface de se concentrer :

- Aux interfaces liquides-liquides à cause de l'amphiphile qui les caractérise. Chaque groupement se dirige vers le liquide pour lequel il a le plus d'affinité [9].
- Aux interfaces liquide-gaz et liquide-solide, le liquide repoussant vers l'extérieur des groupements qui ont une affinité opposée [9].

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types de tensioactifs chimiques : Les cationiques qui possèdent une charge positive ; les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ; les non ioniques, sans charge et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents (anionique et cationique). Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre. La portion hydrophobe, influe sur la chimie du surfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification [10].

On peut diviser les tensioactifs, appelés aussi surfactants, en plusieurs catégories en fonction de leur structure (nombre et disposition des pôles hydrophiles et hydrophobes au sein de la molécule). La structure la plus courante nommée surfactant monocaténaire est celle comportant une tête hydrophile et une chaîne hydrophobe. On rencontre des surfactants possédant plusieurs chaînes hydrophobes greffées sur la même tête hydrophile (surfactant bicaténaires et tricaténaires), mais aussi plusieurs têtes hydrophiles reliées à une ou plusieurs chaînes hydrophobes appelés surfactants bolaformes ou géminés (Tableau 1.1) [11].

**Tableau 1.1 : Types de surfactants selon leur structure.[11]**

Structure du surfactant	Nom
	Monocaténaire
	Bicaténaire
	Tricaténaire
	Bolaforme simple
	Bolaforme double chaîne
	Géminés
 <p><i>tête polaire, hydrophile</i> <i>chaîne apolaire, hydrophobe</i></p>	Légende

### 1.1.2. Classification des surfactants :

On peut classer les surfactants selon différents critères, notamment en fonction de la nature de leurs têtes polaires (hydrophile), de leurs chaînes hydrophobes ou bien encore en fonction de leurs structures générales [12].

#### a) Les surfactants hydrophiles (tête polaires) :

Il existe quatre grandes classes de surfactant : les anioniques, les cationiques et les amphotères (zwitterionique) et les non ioniques, comme le montre la Figure 1.2.

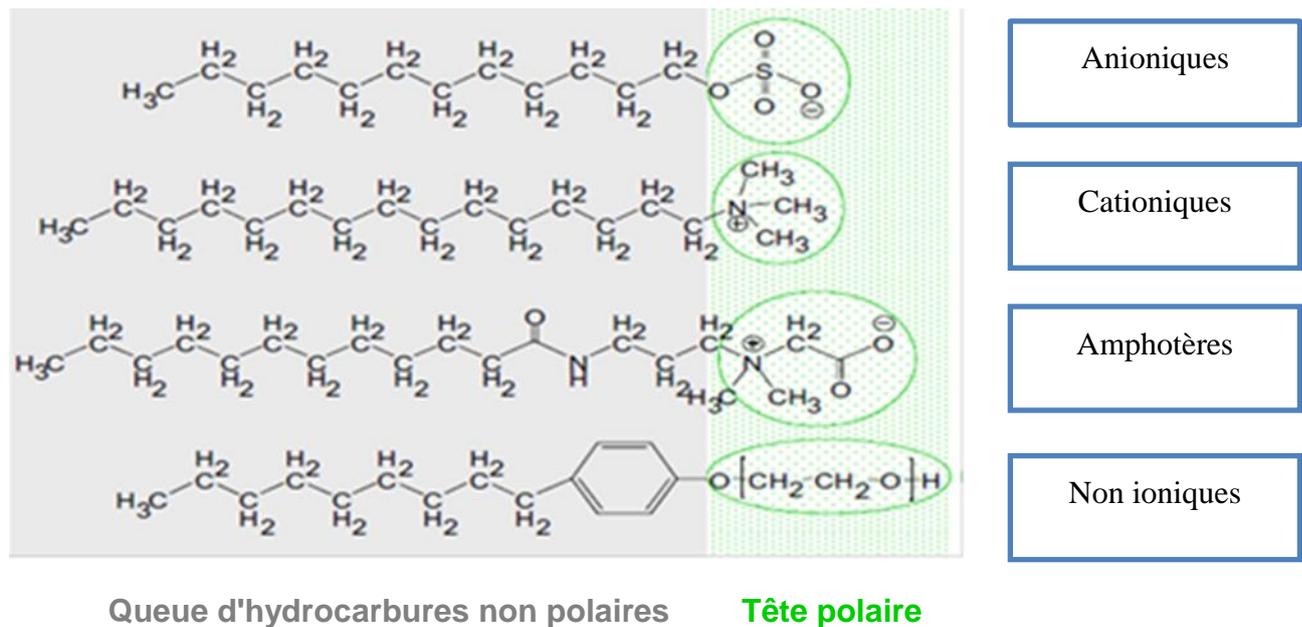


Figure 1.2: Classification des surfactants selon la nature des groupements

- **Surfactant anioniques :**

En milieu aqueux, ces surfactants se dissocient pour donner des ions amphiphiles chargés négativement, ils sont historiquement les premiers surfactants utilisés sous la forme de savons [12,13].

A ce type appartiennent les détergents synthétiques comme les alkyl benzène sulfonâtes, les sels de sodium d'acides gras, les agents moussants comme le lauryl sulfate, les humectant du type sulfosuccinate, et les dispersants du type lignosulfonate, etc.... [14].

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) est un tensioactif anionique, sa molécule est constitué d'une chaîne aliphatique hydrocarbonée avec 12 à 18 atomes de carbone ( $\text{C}_{12-18}$ ), et d'une tête polaire formée d'un groupement sulfate [14].

La structure du SDS est représentée sur la Figure 1.3 et 1.4. Ce surfactant est généralement utilisé pour augmenter la durée de vie des mousses ou comme détergent, ce qui explique sa présence dans de nombreux produits cosmétiques tels que les shampoings et les dentifrices ainsi que dans la plupart des détergents à vaisselle et à lessive [14].

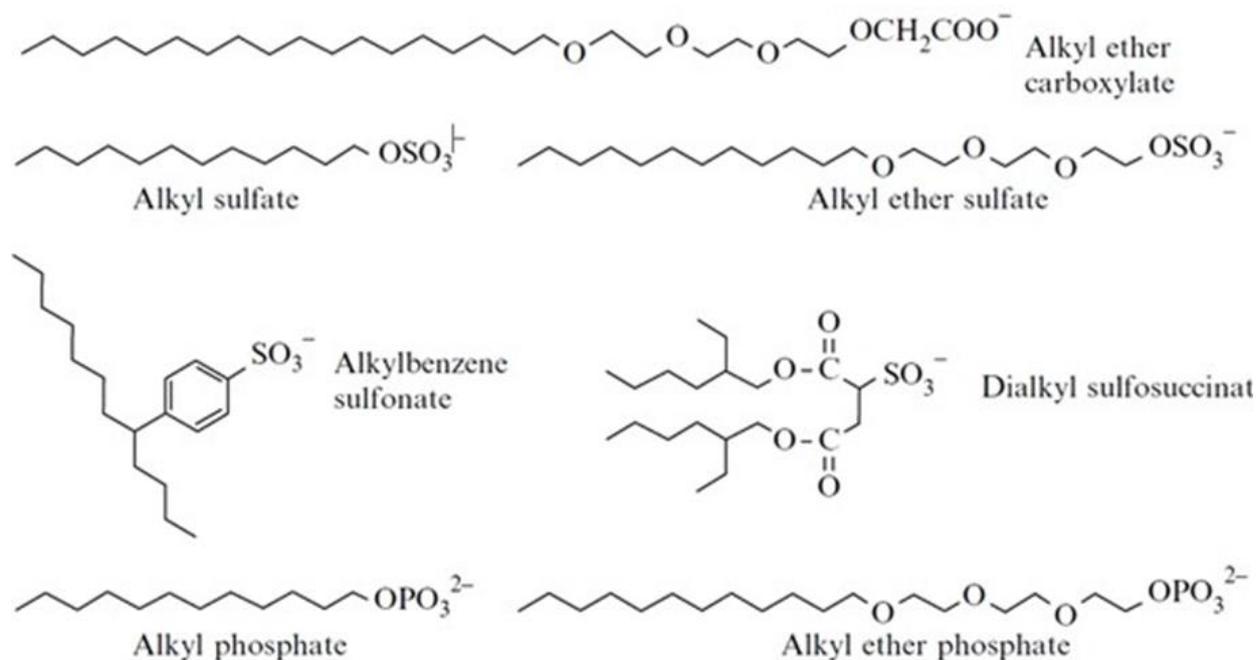
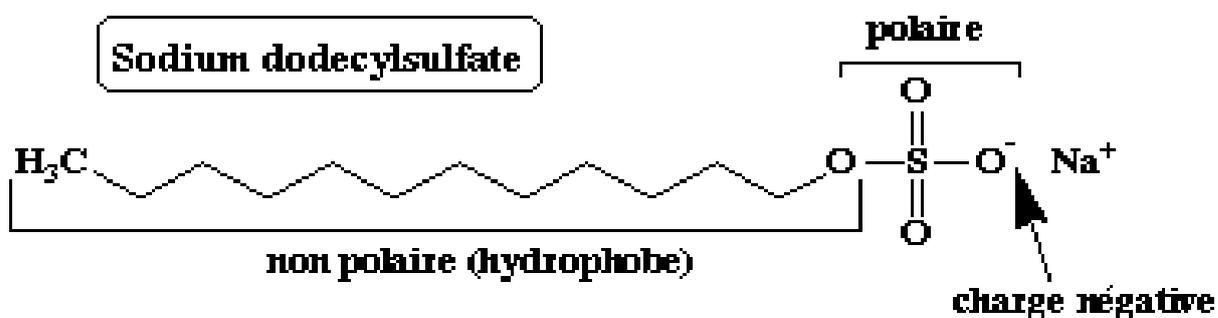


Figure 1.3 : Exemple d'un surfactant anionique.



*E. Jaspard (2006)*

Figure 1.4 : Formule de la molécule du dodecyl sulfate de sodium (SDS)

- **Surfactant cationique :**

Dans ce cas, la tête polaire est chargée positivement, les composés azotés de types sel d'ammonium quaternaire ( $R-N^+(CH_3)_3, X^-$ ) triméthylés ou des sels de pyridinium (Figure 1.5) constituent la classe la plus importante. Ces molécules ne sont ni bons détergents ni bons moussants. Par contre, ils possèdent deux propriétés tout à fait exceptionnelles. D'une part, leur charge positive leur permet de s'adsorber très facilement sur des substrats chargés

négativement comme le sont la plupart des substrats naturels à pH neutre, et d'autre part, ce sont également de bons dispersants des particules solides [15].

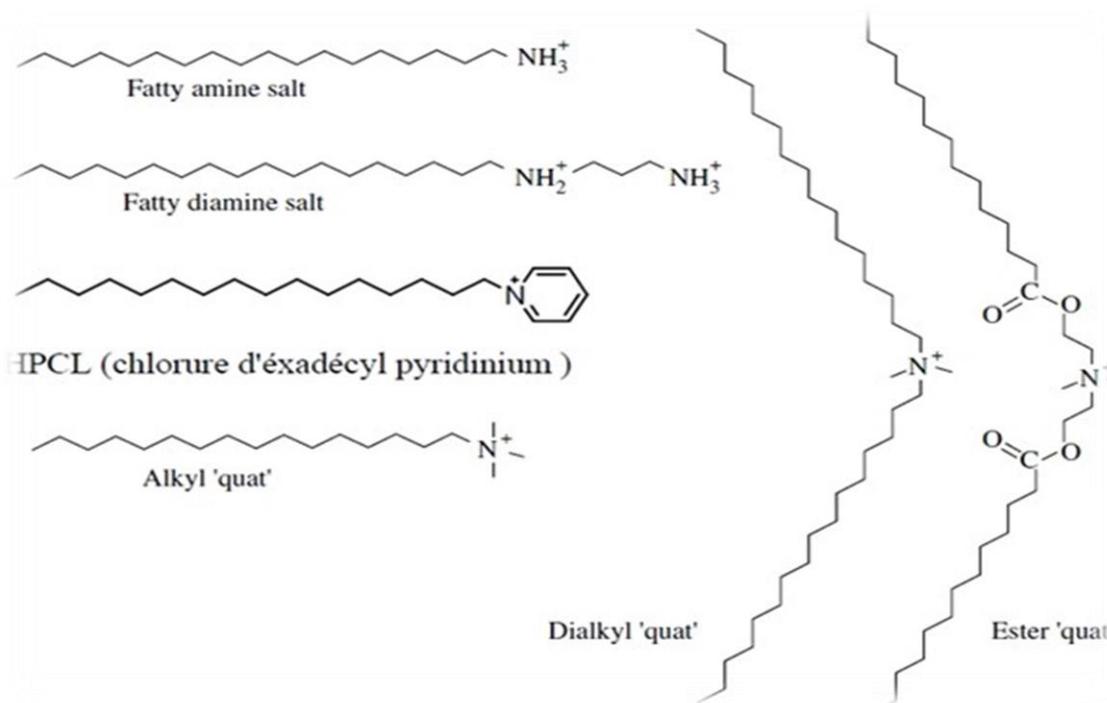


Figure 1.5 : Exemple des surfactant cationique.

- **Surfactants amphotères (zwitterioniques) :**

Les surfactant amphotères ont une tête polaire constituée à la fois d'une charge positive et négative (Figure 1.6). Selon les conditions dans lesquelles ils sont présents, ces surfactants peuvent devenir cationiques, anioniques ou électriquement neutres, comme les aminoacides, les bétaïnes ou les phospholipides. Dans la plupart des cas, le pH est celui qui détermine le caractère dominant, du fait qu'il favorise l'une des dissociations possibles : anionique à pH alcalin et cationique à pH acide. Près de leur point isoélectrique, ils sont réellement amphotères, c'est-à-dire, qu'ils possèdent les deux charges à la fois et présentent souvent un minimum d'activité superficielle [16,17].

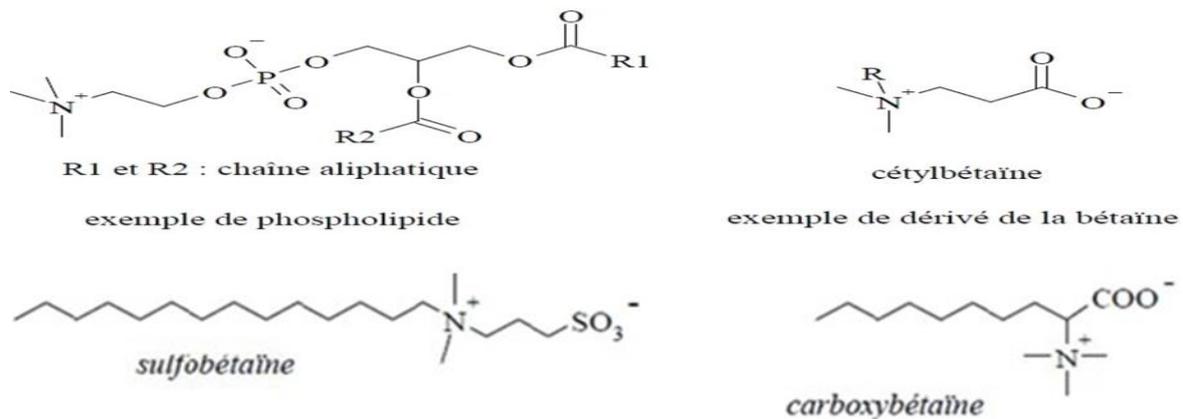


Figure 1.6 : Exemple des surfactants amphotères

- **Les surfactants non ioniques :**

Ce type de surfactant ne s'ionise pas en solution aqueuse, la tête polaire n'est pas changée mais possède un dipolaire non nul [18].

Les composés de surfactant non ioniques sont le plus souvent polyfonctionnels, par exemples, polyéthers (surfactants polyéthoxylés) ou polyols. Les polyéthers ont typiquement un groupe polaire constitué de 4 à 10 unités d'oxyde d'éthylène. Les surfactants à base de polyols les plus courants sont les esters désorbitane, les alkyl glucosides et les polyglycérols esters. Les tensioactifs non ioniques, les plus utilisés dans les industries alimentaires et pharmaceutiques sont les esters de sorbitane, aussi appelés Span et Tween (Figure 1.7) [19].

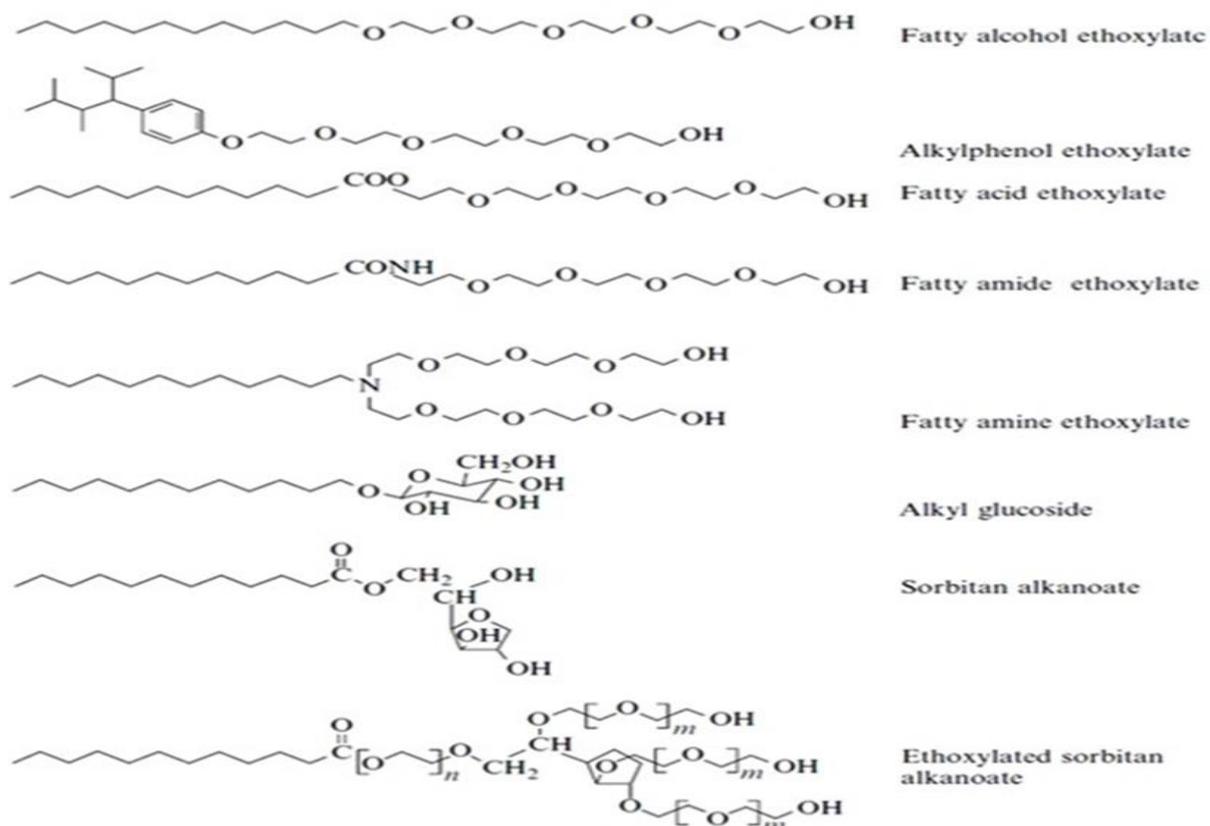


Figure 1.7 : Exemple des surfactants non ioniques

### a) Surfactants hydrophobes :

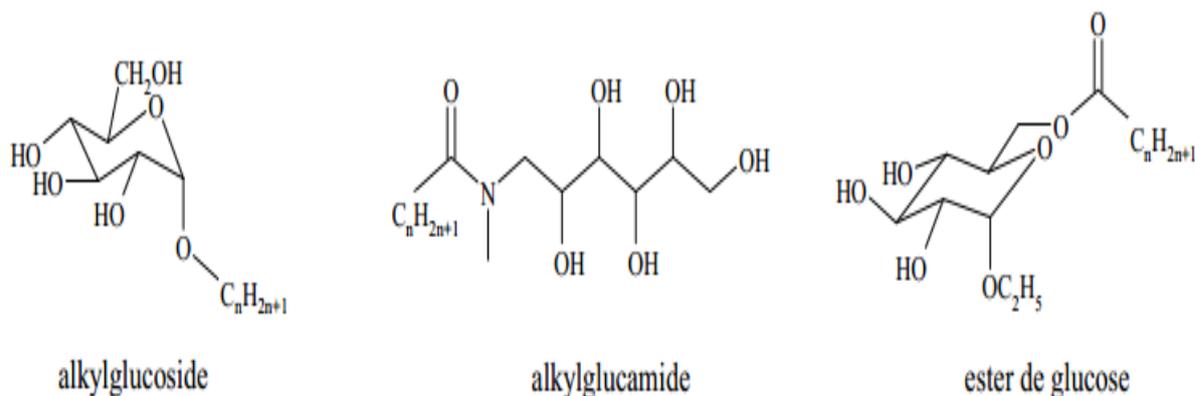
La partie hydrophobe d'un tensioactif est souvent constituée d'une chaîne hydrocarbonée, mais cette chaîne peut également être siliconée ou fluorocarbonée [20].

### b) Les surfactants naturelles :

Un surfactant naturel est issu de ressources naturelles (cette source peut être d'origine animale, végétale ou microbienne). Les surfactants naturelles doivent être obtenus par des procédés de séparation tels que l'extraction, la précipitation ou la distillation qui n'introduisent pas de pollution. Pour les surfactants naturels aucun procédé de synthèse organique ne doit être réalisé. En réalité, il y a très peu de surfactants qui remplissent ces conditions .

Généralement les termes de surfactant naturel ou biosurfactant sont donc souvent utilisés dans un sens plus large. En effet, les surfactants synthétisés à partir de matière première naturel sont généralement qualifiés de naturels.

Les principaux tensioactifs naturels commercialisés sont soit dérivés de polyols comme les alkylpolyglucosides (APG), les sucroesters et les alkylglucamides (Figure 1.8); soit dérivés d'acides aminés. Les surfactants dérivés de polyol sont non ioniques, contrairement aux dérivés d'acides aminés[21].



**Figure 1.8 : Exemple de surfactants naturels à base de polyols.**

### 1.1.3 Propriétés des surfactants :

Deux propriétés essentielles des tensioactifs qui permettent de comprendre les phénomènes observés et qui déterminent leurs domaines d'application sont [17] :

- 1) l'adsorption aux interfaces qui provoque une diminution des tensions interfaciales. Cette propriété est responsable des phénomènes de mouillage, de dispersion, de détergence et d'émulsification.
- 2) l'auto-association en solution (ex : micellisation) qui gouverne les propriétés de solubilisation et de micro-émulsification.

D'autres propriétés des surfactants sont résumés dans le tableau 1.2.

**Tableau 1.2 : Les propriétés de surfactants.**

Propriétés fondamentales	Propriétés pratiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Superficielles :</b> Présents à faibles doses dans l'eau, les tensioactifs sont adsorbés positivement à l'interface eau/air et abaissent fortement la tension de surface [11].</li> <li>➤ <b>Micellaires :</b> La concentration minimale à partir de laquelle le surfactant s'auto-associé sous forme de micelles est appelée la concentration micellaire critique (CMC), la valeur de la CMC est une caractéristique du tensioactif, elle dépend de la nature chimique du tensioactif (longueur de la chaîne lipophile, nature de la tête polaire) mais également de facteurs externes tels que la concentration en électrolytes ou la température [11,8].</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Le mouillage :</b> Il favorise l'étalement d'un liquide sur une surface lisse et augmente la vitesse de pénétration dans les substances poreuses [20].</li> <li>➤ <b>Le moussage :</b> La mousse est un film dans lequel le tensioactif est adsorbé aux deux interfaces eau/air formant une double couche [11].</li> <li>➤ <b>La dispersion :</b> Il augmente la stabilité des suspensions de petites particules solides dans un liquide en évitant leur agrégation [20].</li> <li>➤ <b>L'émulsion :</b> Il permet de disperser et de maintenir en suspension deux liquides non miscibles [20].</li> <li>➤ <b>La solubilisation :</b> Les solutions d'agents de surface, au-delà de leur CMC, ont la propriété d'augmenter la solubilité apparente des composés pas ou peu solubles dans l'eau, soit en incluant dans la micelle des molécules de produits, soit en formant des micelles mixtes avec le produit à solubiliser [20].</li> </ul>

#### 1.1.4 Applications des surfactants :

Les domaines d'application des tensioactifs sont multiples. Ils jouent le rôle soit de matière première de base pour la formulation de produits détergents, cosmétiques et autres, soit de produits auxiliaires dans les procédés de fabrication de l'industrie textile, des métaux, du cuir, du pétrole, etc.... Principalement trois grands secteurs d'activités, à savoir, les secteurs de la détergence, de la cosmétique et des usages industriels sont distingués [22].

- **Détergence :**

Les surfactants entrent dans la formulation de tous les détergents, ils représentent en moyenne 20 % de leur composition. Le surfactant est adapté à l'usage et à l'aspect souhaité pour le détergent, il peut se présenter sous forme de poudre ou de liquide [22]. Il faut distinguer la détergence ménagère et la détergence professionnelle. Cette dernière concerne spécifiquement les industries et les institutions (écoles, hôpitaux,..... etc.). L'industrie agroalimentaire très préoccupée par les problèmes d'hygiène et de désinfection, représente le plus gros marché. La détergence ménagère regroupe plusieurs grandes classes de produits : Les lessives, les adoucissants, les produits vaisselle et d'entretien [23].

- **Cosmétique :**

Il faut distinguer deux grands domaines d'application : La cosmétique rincée et la cosmétique blanche. La cosmétique rincée englobe les produits d'hygiène levants tels que les shampooings, gels douches et dentifrices. Dans ce domaine la propriété détergente du tensioactif est recherchée. La cosmétique blanche concerne les produits de beauté en général, c'est-à-dire, les crèmes, les laits, les maquillages et autres produits de soins. Les surfactants sont principalement utilisés pour générer des émulsions, leur pouvoir adoucissant est également fortement sollicité [23].

- **Pharmaceutique :**

La pharmacie utilise un grand nombre de surfactants. Ils entrent dans les formulations de principes actifs dans les pommades, sirops et autres. Les liposomes en tant que vésicules phospholipidiques bi lamellaires, sont ainsi un cas particulier d'émulsion d'eau dans l'huile d'où la solution aqueuse de principe actif est emprisonnée dans deux parois hydrophobes formant des microgouttelettes dispersées dans l'huile. Ils ont aussi des applications dans le domaine médical [22].

- **Industrielle :**

De nombreux domaines sont concernés : Les industries des additifs alimentaires, des céramiques, du cuir, des matières plastiques, métallurgique, minière, du papier, des peintures, du pétrole, routière, textile, etc. Les produits phytosanitaires et les engrais sont également de gros consommateurs de tensioactifs.

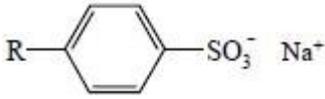
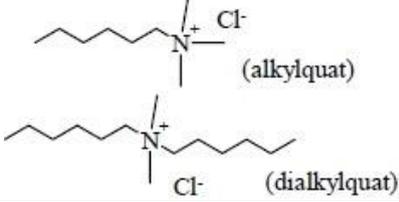
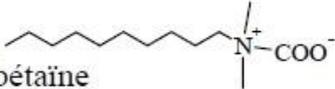
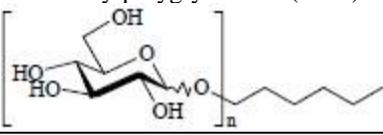
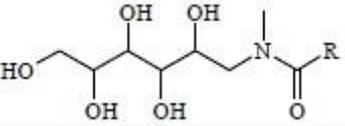
Le tableau 1.3 rapporte quelques exemples d'utilisation technique dans les industries :

**Tableau 1.3. Applications des tensioactifs dans l'industrie [23].**

Type d'activité	Mode d'utilisation des surfactants
Cuir	Propriétés mouillantes et détergentes pour la préparation des peaux au tannage.
Matière plastique	Dispersion de PVC. Caractère antistatique.
Métallurgie	Nettoyage et dégraissage des métaux. Inhibiteurs de corrosion.
Peintures	Stabilisation des formulations. Mouillage de pigments. Ajout d'un caractère hydrophobe aux peintures, antirouille.
Textile	Lubrification des fibres. Lavage et teinture des fibres traitées.
Phyosanitaire et engrais	Maintien du conditionnement sous formes de granulés et empêche l'agglomération des substrats.

Ainsi, une classification de l'utilisation des surfactants est répertoriée dans le tableau 1.4.

**Tableau 1.4 : Récapitulatif des différents types de surfactant et leurs utilisations [24].**

<i>Famille de surfactant</i>	<i>Principaux caractères</i>	<i>Utilisation</i>
<b>ANIONIQUE</b>		
savons $R-COO^- Na^+$ alkylsulfate $R-O-SO_3^- Na^+$	- les plus courants - peu onéreux - n'irritent pas la peau - bonne biodégradabilité	Détergent agent moussant (shampooing, dentifrice), humectant et détergent (liquide vaisselle)
alkylbenzène sulfonate linéaire(LAS) 		agent émulsifiant, dispersant et détergent
<b>CATIONIQUE</b>		
ammonium quaternaire 	charge positive qui leur permet de s'adsorber sur des substrats chargés négativement	agent antistatique et adoucissant (produits de rinçage linge et cheveux)  bactéricide (désinfectants chirurgicaux, antiseptiques)
<b>ZWITTERIONIQUE</b>		
alkylbétaine  Alkylsulfobétaine dérivés d'acides aminés	peu agressifs pour les tissus vivants  compatibles avec toutes les autres classes de tensioactifs	adoucissant pour textile et cheveux  additif inhibiteur de corrosion
<b>NON IONIQUE</b>		
alcoolséthoxylés $R-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ alkylphénolséthoxylés	Peu biodégradables	détergent (6 à 10 OE) dispersant, humectant et émulsifiant (liquide vaisselle et linge) ( $n > 10$ OE)
alkylpolyglycosides (APG) 	- très bas niveau de toxicité  - pas sensible au pH	C8-C10 : agent moussant dans l'agrochimie  C12-C16 : co-tensioactif en détergence soins corporels
Alkylglucamides 	- non irritant  - bonne synergie avec les autres tensioactifs	formulation pour shampooing et gel douche
esters de glycérol esters d'hexitols		agent émulsifiant dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique

## 1.2 Biosurfactants :

Les surfactants d'origine chimique présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, les scientifiques se sont intéressés aux surfactants produits par des organismes vivants, spécialement les microorganismes, appelés biosurfactants [25].

### 1.2.1 Définition d'un biosurfactants :

Biosurfactants sont des composés structurellement divers, principalement produits par un groupe diversifié de microorganismes tels que les bactéries, les champignons et les levures, extracellulaires ou faisant partie de la membrane cellulaire. Le biosurfactants peut être de diverses compositions chimiques telles que les glycolipides, les acides gras, les lipopeptides et les lipoprotéines, les phospholipides et les lipides neutres [26].

Les biosurfactants sont des métabolites primaires ou secondaires microbiens qui semblent jouer un rôle chaque fois qu'un microorganisme rencontre une interface. Les biosurfactants jouent un rôle important dans la motilité, les interactions entre cellules (formation de biofilm, maintien et maturation, détection du quorum, amensalisme et pouvoir pathogène) et la différenciation cellulaire, l'accès au substrat (par contact interracial direct et pseudo-solubilisation des substrats), ainsi que pour éviter les éléments toxiques dans le milieu environnant [27].

La plupart des biosurfactants sont anioniques ou non ioniques et le fragment hydrophobe est basé sur des acides gras à longue chaîne ou leurs dérivés, tandis que la partie hydrophile peut être un glucide, un acide aminé, un phosphate ou un peptide cyclique. Les bactéries constituent le groupe prédominant d'organismes produisant des tensioactifs [27].

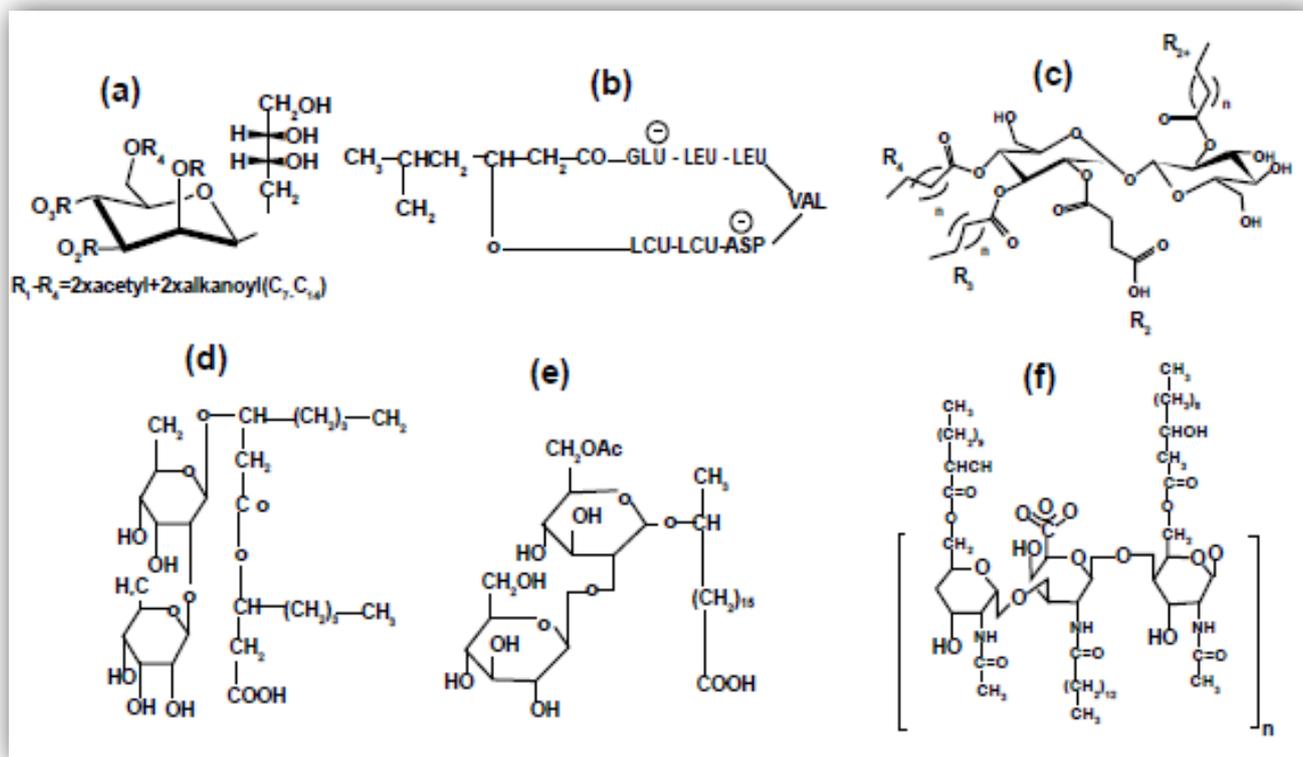
Un biosurfactant possède des caractéristiques souhaitables telles qu'une sélectivité élevée, une biodégradabilité, toxicité faible, acceptabilité écologique et activité précise aux températures extrêmes, salinité et pH [26].

### 1.2.2 Classification de biosurfactants :

Les biosurfactants sont principalement classés en fonction de leur composition chimique, structure et leur origine microbienne. Les principales classes de biosurfactants sont des glycolipides, des phospholipides, des biosurfactants polymères et lipopeptides (surfactine) [7].

### ▪ Les Glycolipides :

Ce sont des glucides liés à des acides aliphatiques à longue chaîne ou à des acides hydroxyaliphatiques par un groupe ester. Les biosurfactants sont principalement des glycolipides, les plus connus sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides. Les sources et les propriétés des différents glycolipides ont été discutées ci-dessous [28]:



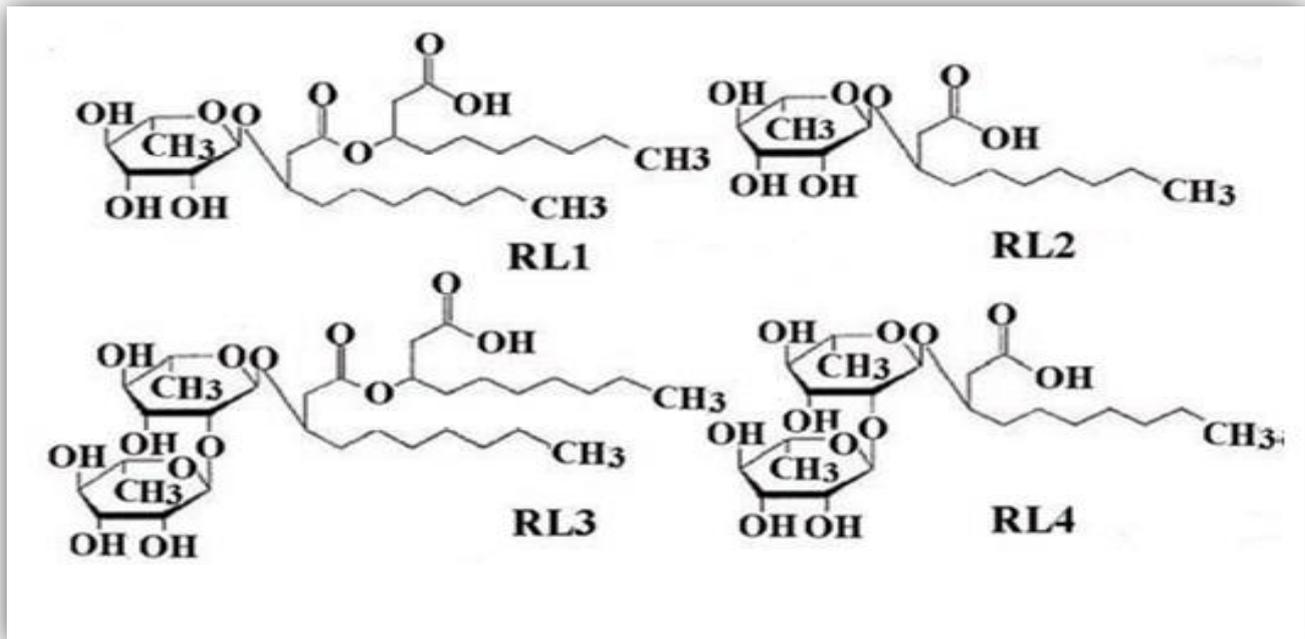
**Figure 1.9 :** Structures chimiques de certains biosurfactants courants (a) lipide de mannosylérythritol, (b) surfactine, (c) lipide de tréhalose, (d) sophorolipide, (e) rhamnolipide et (f) émulsif [07].

### • Les rhamnolipides :

Ce sont des molécules amphiphiles qui possèdent d'excellentes propriétés tensioactives et qui ont été exhaustivement étudiés depuis leur découverte. Ils sont produits principalement par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Les rhamnolipides (RL) appartiennent à la classe des molécules de faible masse moléculaire. Les principaux rhamnolipides: mono-rhamno-di-lipidique congénère et di-rhamno-di-lipidique-congénère, consistent en une ou deux unités de L-rhamnose et deux unités d'acide β-hydroxydécanoïque, tandis que les congénères rhamno-mono-lipidiques et les congénères di-rhamno-mono-lipidiques, constitués d'un ou deux L-rhamnose et d'une unité d'acide β-hydroxydécanoïque, ne sont biosynthétisés que dans certaines conditions de culture. Les rhamnolipides sont des métabolites secondaires et, par conséquent, leur production coïncide avec le début de la phase stationnaire de la croissance microbienne. La production de rhamnolipides semble possible à partir de la plupart des sources de carbone supportant la croissance bactérienne.

Néanmoins, les huiles d'origine végétale, telles que le soja, le maïs, le canola et les olives, offrent la productivité la plus élevée (Fig.1.10).

Les rapports C/N et C/P élevés favorisent la production de rhamnolipides, tandis que les concentrations élevées de cations divalents, en particulier le fer, sont inhibitrices. La production de rhamnolipides est inhibée par la présence de  $\text{NH}_4^+$ , de glutamine, d'asparagine et d'arginine en tant que source d'azote et favorisée par  $\text{NO}_3^-$ , le glutamate et l'aspartate [08,29].

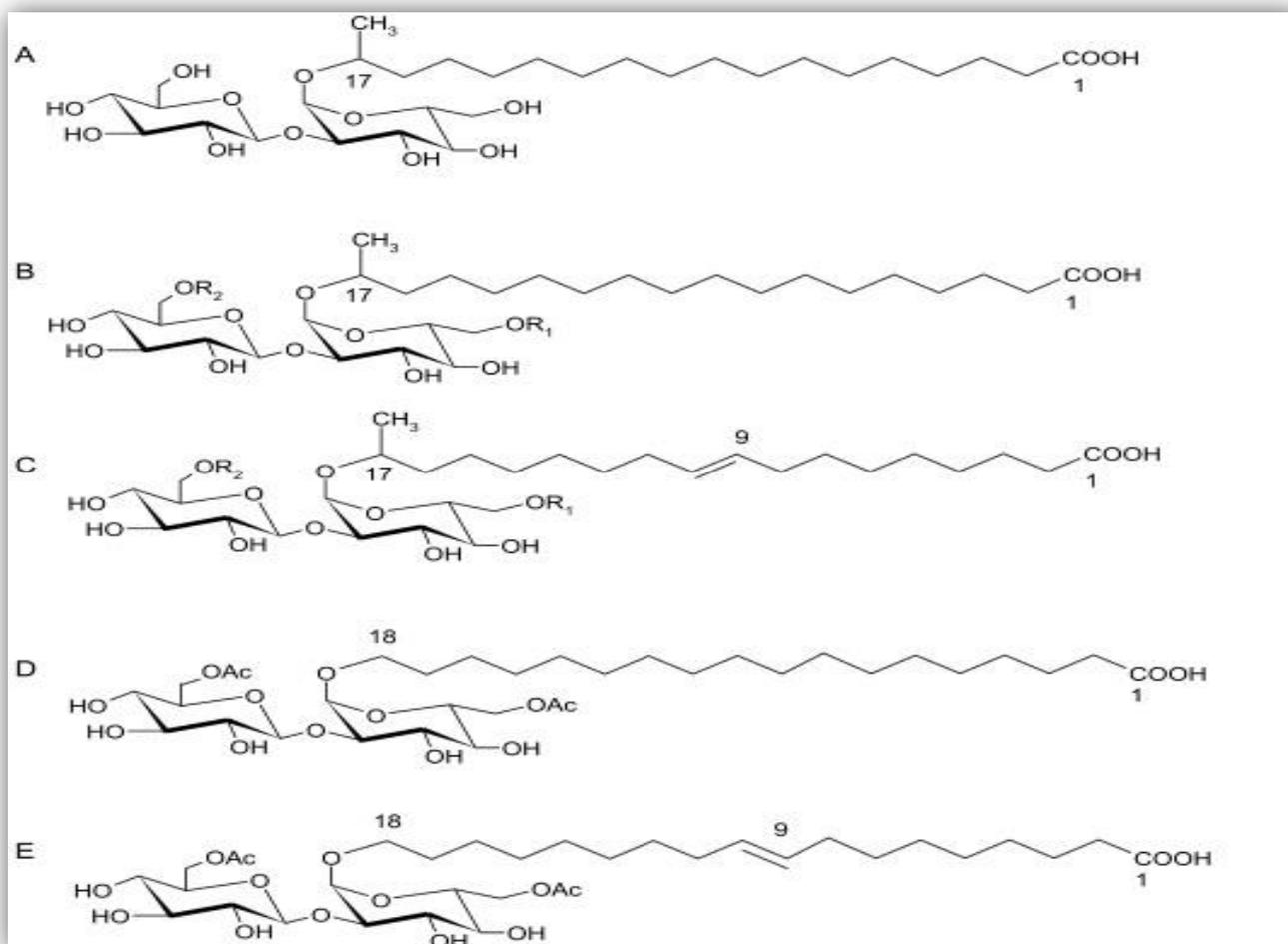


**Figure 1.10 :** Structure d'un rhamnolipide : RL1 (mono-rhamno-di-lipidique congénère), RL2(mono-rhamno-mono-lipidique congénère), RL3 (di-rhamno-di-lipidique congénère) et RL4 (di-rhamno-mono-lipidique congénère)[29].

- **Les sophorolipides :**

Les sophorolipides sont des composés tensioactifs principalement produits par des levures, telle que *Candida bombicol*, *Centrolenepetrophilum*. [30,31]. Ils consistent en un disaccharide formé par le mannose et l'érythritol, qui est acylé au niveau de la fraction mannose avec des acides gras de différentes longueurs [27].

En tant que surfactant, les sophorolipides sont des molécules amphiphiles interagissant avec la limite de phase dans des systèmes hétérogènes. Ils se composent d'une queue d'acide gras hydrophobe de 16 ou 18 atomes de carbone et d'une tête glucidique hydrophile. La sophorose est un glucose disaccharide avec une liaison  $\beta$ -1,2 inhabituelle et peut, dans le cas des sophorolipides, être acétylé aux positions 6' et / ou 6". Un acide gras hydroxylé terminal ou sub-terminal est lié de manière  $\beta$ -glycosidique à la molécule de sophorose. L'extrémité carboxylique de cet acide gras est soit libre (forme ouverte ou acide), soit estérifiée intérieurement en 4" ou, dans de rares cas, en position 6' ou 6" (forme lactonique) (Fig.1.11).



**Figure 1.11** : Structures de sophorolipides sous forme acide: (A) sophorolipides désacétylés, (B, C) sophorolipides majeurs de *Starmarella bombicola* et (D, E) sophorolipides majeurs de *Candida batistae* [32].

L'hydroxy-acide gras lui-même compte généralement 16 ou 18 atomes de carbone et peut avoir au moins une ou plusieurs liaisons non saturées [31].

Des sophorolipides ont récemment été découverts dans lesquels la sophorose est liée au carbone w du groupe acyle et se présente principalement sous une forme non lactone, anionique [32].

Les sophorolipides sont hautement biodégradables et présentent des toxicités aiguës et chroniques plus de dix fois moins que les surfactants classiques. De plus, les sophorolipides peuvent être produits avec des rendements élevés en culture de bioréacteur (> 400 g/L) et contrairement aux biosurfactants rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa*, les sophorolipides sont produits par des levures non pathogènes [33].

- **Les lipides mannosylerythrioles (LME) et les lipides à tréhalose :**

Les lipides mannosylerythrioles (LME), qui sont des glycolipides de levures, sont produits par *Pseudozyma antarctica* après croissance sur des huiles végétales, comme l'huile de soja.

Plusieurs types structuraux de biosurfactants lipidiques de tréhalose microbiens ont été rapportés. Le tréhalose disaccharidique lié en C-6 aux acides mycoliques est associé à la plupart des espèces de *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Corynebacterium*. Les acides mycoliques sont des acides gras hydroxylés à longue chaîne. Les tréhalolipides de différents organismes diffèrent par la taille et la structure de l'acide mycolique, le nombre d'atomes de carbone et le degré d'insaturation. Ces biomolécules purifiées sont caractérisées par une diminution de la tension de surface de l'eau ultra pure à 25 mN/m [8,28, 34].

- **Lipopeptides :**

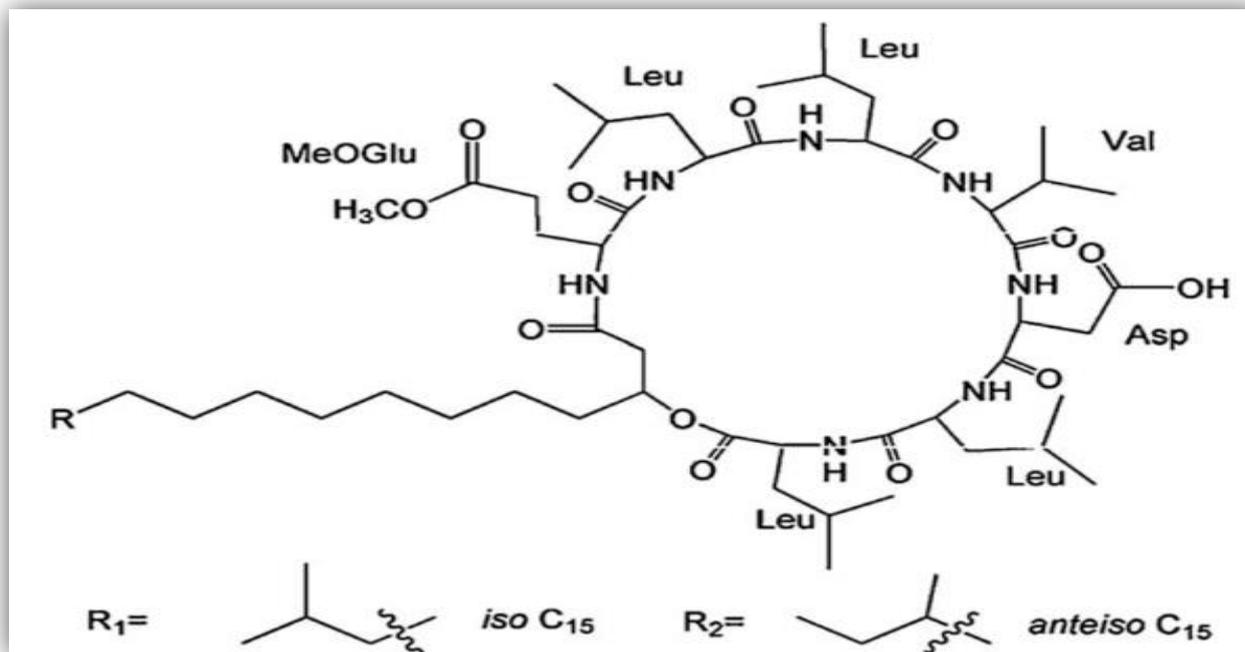
Les lipopeptides sont des molécules amphiphiles composés d'un cycle peptidique lié à une chaîne d'acide gras. Elles sont synthétisées par une voie indépendante du ribosome, par des enzymes de masse élevée ( $5 \times 10^6$  Da) appelés synthétases ou « Non Ribosomal Peptides Synthétase (NRPS) ». Elles représentent à la fois la matrice et jouent un rôle comparable à celui de l'ARNm dans la voie classique, mais aussi dans la machinerie biosynthétique, une fonction réalisée par les ARNt et les ribosomes au sein de la synthèse protéique classique.

Selon la topographie de la chaîne peptidique, les lipopeptides se trouvent en deux formes : Linéaires ou bien cycliques. Les lipopeptides cycliques sont produits par de nombreuses espèces à Gram positif, telles que *Bacillus*, *Lactobacillus* et *Streptomyces* et Certaines espèces à Gram négatif, y compris *Pseudomonas* et *Serratia* [8].

- **Les surfactines :**

La surfactine est le biosurfactant le plus puissant par rapport à sa propre capacité de réduire la tension interfaciale hexadécane/eau de 43 à 1 mN.m<sup>-1</sup> et la tension superficielle de l'eau de 72 à 27 mN.m<sup>-1</sup> avec une concentration micellaire critique (CMC) de 10<sup>-5</sup> M.

La surfactine est composée d'une chaîne peptidique formée de sept  $\alpha$ -aminoacides liés à un acide gras hydroxylé par une liaison lactone pour former un lipopeptide cyclique. La séquence typique des acides aminés dans le noyau peptidique est la suivante: L-Glu1-L-Leu2-D-Leu3-L-Val4-L-Asp5-D-Leu6-L-Leu7. Les surfactines contiennent une variété d'analogues structurels due à la différence dans la séquence d'acides aminés et le nombre d'atomes de carbone dans les acides gras ce qu'il influe sur les propriétés de cette dernière [35]. (Fig.1.12)



**Figure 1.12 :** Structure chimique de base de la C15-surfactine-O-méthyl ester [35].

- **Les lichénysines :**

Les lichénysines sont des classes de lipopeptides antimicrobiens produits par *Bacillus licheniformis*. La lichenysine A est un surfactant puissant et porte une activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries à Gram positif et à Gram négatif, bien qu'elle ne soit pas aussi importante que celle observée pour la surfactine [36].

- **Les iturines :**

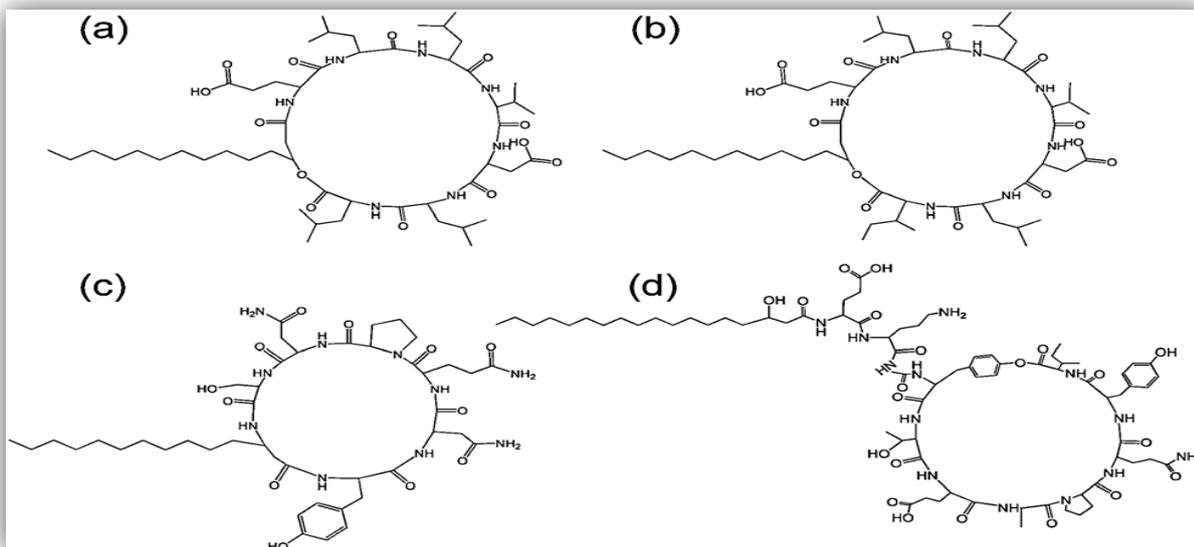
Les iturines, des lipopeptides produit par le genre *Bacillus*, ont été largement étudiés pour leur activité antibactérienne ou antifongique efficace. Ils possèdent un squelette heptapeptidique connecté à une chaîne d'acides gras en C13 à C17, qui présentent une forte fongitoxicité *in vitro* par la formation de pores conducteurs d'ions sur les membranes fongiques. Ils présentent une hétérogénéité structurelle au niveau des résidus d'acides aminés ainsi que dans leur longueur et leur ramification de la chaîne d'acides gras. Certains exemples classiques de ces composés amphiphiles comprennent les iturines A, C, D et E, les bacillomycines D, F et L, la bacillopeptine et la mycosubtiline, qui sont tous disposés dans une séquence de configuration LDDLLDL [37].

- **Fengycines :**

La fengycine est un complexe antifongique lipopeptidique produit par plusieurs souches de *Bacillus subtilis*. Les fengycines (Plipastatines A et B) constituent la troisième famille des lipopeptides. Elles contiennent une chaîne peptidique de 10 acides aminés avec un cycle lactone et une chaîne d'acide gras  $\beta$ -hydroxyle (C14 à C18), qui peut être saturée ou insaturée. Ce lipopeptide est connu pour développer une activité antifongique contre les champignons filamenteux et pour avoir une activité

hémolytique 40 fois inférieure à celle de la surfactine, un autre lipopeptide produit par *B. subtilis*. Comme la plupart des peptides antimicrobiens naturels, la fengycine agit probablement en rendant la membrane plasmique de la cellule cible plus perméable. [38, 39,40]

La figure ci-dessous regroupe les quatre classes de lipopeptides produites par *B.subtilis*:



**Figure 1.13** : Structure de certains lipopeptides produits par *B.subtilis*. (a) Surfactine (b) lichénysine A, (c) iturine A, (d) fengycine / plipastatine A[36].

- **Acides gras, phospholipides et lipides neutres :**

Quelques microorganismes et levures créent d'énormes quantités de graisses insaturées et de tensioactifs phospholipidiques au cours du développement sur les n-alcanes. Dans *Acinetobacterspp.* des vésicules riches en 1-N, phosphatidyléthanolamine, forment des émulsions optiquement limpides à plus petite échelle d'alcanes dans de l'eau. Ces biosurfactants sont basiques pour les applications thérapeutiques [41].

- **Biosurfactants polymères :**

Emulsan, lipomanan, alasan, liposan et d'autres complexes protéiques polysaccharidiques sont les biosurfactants polymères les mieux étudiés. Emulsan est un émulsifiant pour les hydrocarbures dans l'eau à des concentrations aussi faibles que 0,001% à 0,01%. Liposan est un émulsifiant extracellulaire hydrosoluble synthétisé par *C. lipolytica*. Il est composé à 83% de glucides et à 17% de protéine avec la partie glucidique est un hétéropolysaccharide constitué de glucose, de galactose, de galactosamine et d'acide galactonique [42].

- ***Biosurfactants particulières :***

Les biosurfactants particulières divisent les vésicules de la membrane extracellulaire pour former une microémulsion qui exerce une influence sur l'absorption d'alcanes dans les cellules microbiennes. *Acinetobacter* spp. a des vésicules de diamètre de 20 à 50 nm et une densité de flottabilité de 1,158 m<sup>3</sup> / cm composée de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharides [43].

Le tableau suivant regroupe les principales classes et les microorganismes producteurs respectifs.

**Tableau 1.5 : Principales classes de biosurfactants et de microorganismes producteurs respectifs [43].**

Classe de biosurfactant					
Glycolipides	lipopeptides	Phospholipides	Acide gras	Bs polymériques	Bs particuliers
<b>Microorganismes producteurs</b>					
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Arthrobacterparaffineus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobactercalcoaceticus</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Acinetobactersp.</i>				
<i>Candida lipolytica</i>		<i>Aspergillus</i>	<i>Capnocytophaga sp.</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Cyanobacteria</i>
<i>Candida utilis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>				
<i>Halomonaseurihalina</i>		<i>Corynebacterium lepus</i>	<i>Corynebacterium insidibasseosum</i>	<i>Candida lipolytica</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>
<i>Mycobacterium thermoautotrophium</i>	<i>Bacillus pumilus</i>			<i>Candida utilis</i>	
<i>Sphingomonaspaucimobilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Corynebacterium lepus</i>		
<i>Acinetobactersp.</i>				<i>Halomonaseurihalina</i>	
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Candida lipolytica</i>		<i>Nocardiaerythropolis</i>		
<i>Bacillus pumilus</i>				<i>Mycobacteriumthermoautotrophium</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Gluconobactercerinus</i>		<i>Penicilliumspiculisporum</i>		
<i>Candida lipolytica</i>					
<i>Gluconobactercerinus</i>			<i>Talaramycestrachyspermus</i>	<i>Sphingomonaspaucimobilis</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>				
<i>Serratiamarcescens</i>					
<i>Streptomyces sioyaensis</i>	<i>Serratiamarcescens</i>				
<i>Thiobacillusthiooxidans</i>					
<i>Arthrobacterparaffineus</i>	<i>Streptomycessioyaensis</i>				
<i>Capnocytophaga sp.</i>					
<i>Corynebacterium insidibasseosum</i>	<i>Thiobacillusthiooxidans</i>				
<i>Corynebacterium lepus</i>					
<i>Nocardiaerythropolis</i>					
<i>Penicilliumspiculisporum</i>					
<i>Talaramycestrachyspermus</i>					
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>					
<i>Cyanobacteria</i>					
<i>Pseudomonas marginalis</i>					
<i>Acinetobacter sp.</i>					
<i>Aspergillus</i>					
<i>Corynebacterium lepus</i>					
<i>Alcanivoraxborkumensis</i>					

*Arthrobacterparaffineus*  
*Arthrobacter sp.*  
*Candida antartica*  
*Candida apicola*  
*Candida batistae*  
*Candida bogoriensis*  
*Candida bombycola*  
*Candida ishiwadae*  
*Candida lipolytica*  
*Lactobacillus fermentum*  
*Nocardiasp.*  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*Pseudomonas sp.*  
*Rhodococcuserythropilis*  
*Rhodotorulaglutinus*  
*Rhodotorulagraminus*  
*Serratiamarcescens*  
*Tsukamurellasp.*

### 1.2.3 Microorganismes producteurs le biosurfactants :

La source de carbone et d'énergie sont indispensables pour la croissance des microorganismes. Pour faciliter la diffusion intracellulaire et la production des différentes substances, les microorganismes combinent la source de carbone et les substrats insolubles. Ils sont capables de produire des biosurfactants avec des structures moléculaires et des activités de surface différentes [43].

La littérature décrit les bactéries de genre *Pseudomonas* et *Bacillus* comme étant les le genre les plus producteurs de biosurfactants. Elles sont isolées généralement des sols contaminés par les HC, de l'huile, ou des déversements accidentels. *Candida bombicola* et *Candida lipolytica* sont parmi les levures les plus étudiées pour la production de biosurfactants. L'utilisation de levures, telles que *Yarrowialipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyceslactis*, présente un avantage essentiel réside dans leurs statistiques de type «généralement considéré comme sûr » (GRAS : generally regarded as safe), qui permettent leur utilisation dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques [43,44].

Le tableau ci-dessous donne des exemples sur les microorganismes marines et les quelque types de biosurfactants [45]:

**Tableau 1.6 : Les microorganismes marines et les quelque types de biosurfactants.**

Biosurfactant	Microorganismes
Glycolipides	<i>Alcanivoraxborkumensis</i>
	<i>Alcaligenessp.</i>
	<i>Arthrobactersp.</i>
Lipoproteines	<i>Myroidessp.</i> SM1
Phospholipides et acides gras	<i>Myroidessp.</i> SM1
Bs polymeric	<i>Yarrowialipolytica</i>
	<i>Pseudomonas</i>
Bs particulières	Variété de bactéries

Le tableau 1.7 représente quelque exemple de biosurfactant produit par des différents microorganismes [01] :

**Tableau 1.7 : Les types majeurs de biosurfactant produits par des microorganismes.**

Microorganismes	Biosurfactants
<i>Pseudomonas sp.</i>	lipides d'ornithine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rhamnolipids
<i>Pseudomonas chloromphis</i>	Rhamnolipids
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptide
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Viscosine
<i>Pseudomonas marginalis</i> , <i>Pseudomonas maltophilia</i>	Vésicules et fimbriae
<i>Pseudomonas nautical</i>	Protéines, carbohydrates, et lipides
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Surfactine / iturin
<i>Bacillus licheniformis</i>	Peptide lipids Lichenysine
<i>Bacillus licheniformis JF-2</i>	Lipopeptides
<i>Bacillus licheniformis 86</i>	Lipopeptides
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactine iturin Subtilisine Lichenysin
<i>Acinetobacter sp.</i>	Phospholipids
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Emulsan
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Alasan

## 1.2.4 Propriétés du biosurfactant

### 1.2.4.1 Activité antimicrobienne :

Le terme antimicrobien fait référence à un ensemble de composés qui ont la capacité d'éliminer ou de réduire la prolifération de microorganisme. Les microorganismes visés par un antimicrobien peuvent être des bactéries, des virus, des mycètes ou des parasites [46].

Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de la substance testée et selon sa nature du contact avec le germe. La majorité de chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon. Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients [47].

- **Méthodes d'évaluation de l'efficacité des antimicrobiens alimentaires :**

- ✓ *Méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme) :*

Parmi les tests finaux, le test de diffusion sur gélose a probablement été le plus largement utilisé à travers l'histoire. Il a souvent été appelé test du disque; cependant, cela la terminologie est probablement trop étroite. Il existe de nombreuses variantes de la méthode de test, y compris l'utilisation du cylindre, du puits, de la plaque de fossé et des recouvrements d'agar. Autres variations tels que le revêtement superposé peut être utilisé pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de bactériocines.

Dans les variantes les plus courantes de l'analyse, le composé antimicrobien est appliqué sur une plaque de gélose à l'aide d'un disque de papier filtre imprégné ou placé dans un puits. Le composé diffuse à travers la gélose, créant un gradient de concentration. La concentration est inversement proportionnelle à la distance du disque ou de la zone. L'inhibition, qui est la mesure de l'activité, est indiquée par une zone sans croissance autour du disque ou du puits. La taille de la zone dépend des vitesses de diffusion et de croissance cellulaire.

Les résultats de la méthode de diffusion sur gélose sont généralement quantitatifs. Les microorganismes sont généralement appelés sensibles, intermédiaires ou résistants, en fonction du diamètre de la zone d'inhibition. Des résultats quantitatifs sont possibles avec un haut degré de standardisation, mais de meilleures méthodes sont disponibles. Une des exigences de l'essai est que toutes les souches utilisées doivent croître rapidement et uniformément, sinon une répétabilité faible, voire nulle, ne sera atteinte. Le test doit également être approprié pour le composé et le microorganisme à tester.

Par exemple, le test de diffusion sur gélose ne peut pas être utilisé pour un antimicrobien hautement hydrophobe, car le composé ne diffusera pas et aucune inhibition ne pourra être détectée. Cette méthode ne doit pas non plus être utilisée pour les microorganismes anaérobies [28].

✓ **Méthode de microdilution :**

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques ou d'huiles essentielles selon une progression géométrique de raison 2. En milieu liquide, l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes ou en microplaques contenant l'agent antimicrobien. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration de produit et où aucune croissance n'est visible [49].

En milieu solide, l'agent antimicrobien est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches à étudier (un inoculateur à têtes multiples, appareil de Steers, permet d'ensemencer de 20 à 30 souches différentes par boîte). Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration l'agent antimicrobien. Rios, Recio et Villar, ont réalisé une synthèse des méthodes expérimentales employées pour étudier l'activité des extraits de plante et des huiles essentielles. Ils ont proposé l'utilisation des méthodes de diffusion pour étudier les composés polaires de petite ou moyenne taille moléculaire et pour la détermination du spectre d'activité antimicrobienne. La méthode de dilution a été recommandée pour étudier les substances polaires et non polaires aussi bien que tous les types des extraits complexes. En conclusion, la méthode de dilution en phase liquide constitue la meilleure manière d'établir le vrai pouvoir d'un composé pur, toutefois la solubilité reste une condition requise évidente [49].

➤ **La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :**

L'OMS définit la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) comme la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée. La concentration minimale inhibitrice divise les bactéries en trois catégories : sensible, intermédiaire et résistante. Cette valeur peut être déterminée par un certain nombre de méthodes d'essai standard ; les plus couramment utilisées sont les méthodes de dilution et de diffusion sur gélose [49].

➤ **La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) :**

La CMB est celle en antibiotique laissant 0,01 % de survivants par rapport à l'inoculum de départ (après 18-24 h à 37 °C). Une revue des CMI et des CMB pour 4 variétés de Thym portant sur 14 souches bactériennes (dont *Staphylococcus aureus*) a montré que les valeurs des CMI sont identiques aux CMB. Ceci indique que les huiles essentielles testées sont bactéricides [49].

### 1.2.4.2 Le pouvoir émulsifiant

Récemment, le potentiel des biosurfactants a été reconnu et exploré. Les biosurfactants sont des molécules amphipathiques comportant à la fois des fractions hydrophiles et hydrophobes. Ces composés réduisent la tension superficielle en s'accumulant à l'interface des fluides non miscibles, ce qui augmente la surface spécifique des composés insolubles, ce qui entraîne une biodisponibilité accrue et une biodégradation ultérieure des hydrocarbures[50].

Et par définition, le pouvoir émulsifiant est la capacité de rendre une solution composée de deux liquides au plus non miscibles dispersés l'un dans l'autre stable par des additifs tels que les biosurfactants. Ce dernier peut émulsifier ou déstabiliser la solution précédente. Sachant que la phase dispersée sous forme de gouttelettes dont le diamètre dépasse 0.1 mm en générale appelée «phase interne » ou « discontinue », et la phase dispersante « phase externe » ou continue [25].

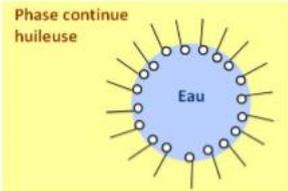
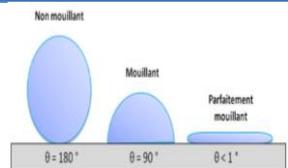
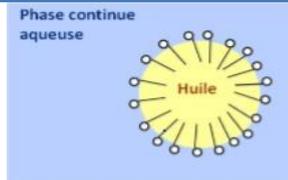
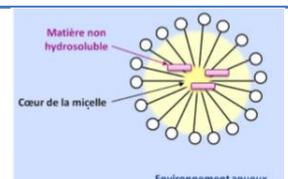
### 1.2.4.3 Balance Hydrophile – Lipophile (HLB)

La HLB est une valeur empirique qui représente la polarité globale des molécules amphiphiles. Elle est liée à la solubilité du tensioactif ne tenant pas en compte les autres variables de formulation physico-chimique (température, pression, nature des principaux constituants et des additifs) susceptibles d'influer sur le système. Elle s'étend sur une échelle de 0 à 20, avec les valeurs basses associées à la lipophilie et les valeurs hautes associées à l'hydrophilie. La HLB est l'expression directe de l'équilibre hydrophile/lipophile, qui conditionne les propriétés et donc les applications des tensioactifs. Elle est calculée par l'expression suivante [2,25] :

$$\text{Valeur de HLB} = \frac{\text{la masse moléculaire de la partie hydrophile}}{\text{la masse moléculaire de la molécule}} \times 20$$

Le tableau ci-dessous donne les propriétés d'un tensioactif en fonction de sa valeur HLB [2].

Tableau 1.8 : Les propriétés d'un tensioactif en fonction de sa valeur HLB.

Propriété du tensioactif	Schéma explicatif	Valeurs de HLB	Solubilité
<b>Antimoussant</b>		1,5 – 3	<i>Liphophile</i>
<b>Emulsifiant eau dans huile</b>		3 – 6	
<b>Mouillant</b>		7 – 9	
<b>Emulsifiant huile dans eau</b>		8 – 18	<i>Hydrophile</i>
<b>Détergent</b>		13 – 15	
<b>Peptisant – solubilisant</b>		15 - 18	

#### 1.2.4.4. La concentration micellaire critique

Quand un surfactant est ajouté à des concentrations croissantes dans les systèmes air / eau ou huile / eau, on observe une réduction de la tension superficielle jusqu'à un niveau critique au-dessus duquel les molécules amphiphiles s'associent facilement pour former des structures supramoléculaires telles que des micelles, des bicouches et des vésicules. Cette valeur est appelée concentration micellaire critique (CMC). La CMC est définie par la solubilité d'un surfactant dans une phase aqueuse et est couramment utilisée pour mesurer l'efficacité d'un surfactant. Le bouillon de culture microbienne ou les biosurfactants sont dilués plusieurs fois, la tension superficielle est mesurée pour chaque dilution et la CMC est calculée à partir de cette valeur [04].

Autrement dit la CMC est la concentration au-dessus de laquelle l'interface est saturée et une partie des molécules de tensioactif se rassemblent sous forme d'agrégats appelés micelles. Au-delà, la tension de surface n'est plus modifiée, même à des concentrations nettement supérieures à la CMC.

Elle peut être influencée par plusieurs facteurs [2] :

- **La structure** du surfactant (ou biosurfactant) qui joue sur la balance de polarité et par conséquent sur la CMC et la polarité de ce dernier.
- **La nature du contre-ion** : Plus la charge et la polarisabilité sont élevées, et plus le rayon hydraté est petit, plus la liaison ionique créée est forte. Le tensioactif devient alors moins polaire, et les répulsions électrostatiques entre tensioactifs sont minimisées. La micelle ionique tend alors vers un caractère plus « non-ionique » et la CMC est abaissée.
- **La présence d'additifs** perturbe la valeur de la CMC. La présence d'impuretés ou de sous-produits organiques résultant de la synthèse de tensioactifs peut modifier significativement la valeur de la CMC par rapport à celle d'un surfactant sous forme pure.
- **La température** qui est un facteur clé de la solubilisation et la micellisation des surfactant. Et donc, l'augmentation de la température provoque une diminution de la CMC jusqu'à atteindre sa valeur minimum puis augmentation [2].

#### 1.2.4.5 Activité à l'interface et à la surface

Le surfactant aide à réduire la tension superficielle et la tension interfaciale. Les biosurfactants produits par *B. subtilis* et *P.aeruginosa* peuvent réduire la tension la tension superficielle de l'eau à  $25 \text{ mN m}^{-1}$  et à  $26 \text{ mN m}^{-1}$  respectivement et la tension interfaciale eau / hexadécane à valeur inférieure à  $1 \text{ mN m}^{-1}$ . En général, les biosurfactants sont plus efficaces et leur CMC est environ plusieurs fois inférieure à celle des surfactants chimiques [28,37].

#### 1.2.4.6 Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\bullet$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2^\bullet$ ).

Il existe de nombreuses méthodes pour l'évaluation *in vivo* et *in vitro* de cette dernière par piégeage de radicaux libres :

- Les méthodes de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) sont utilisées pour piéger les peroxydes  $\text{ROO}^\bullet$ .

- La méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) utile pour les ions ferriques.
- les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphénylpicrylhydrazyle).

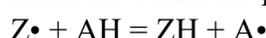
Le test au radical libre DPPH• est recommandé pour des composés contenant les fonctions SH<sup>-</sup>, NH<sup>-</sup> et OH<sup>-</sup>. Le test s'effectue à température ambiante, pour éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Il est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles en provenance de thé vert, des jus de fruits et de raisins, pépins et pulpes très riches en composés phénoliques [51].

➤ **Principe de la méthode utilisant le radical DPPH :**

La molécule de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle; DPPH:1) est caractérisée comme un radical libre stable du fait de la délocalisation de l'électron de réserve sur la molécule dans son ensemble, de sorte que les molécules ne se transforment pas de monomères en dimères, comme ce serait le cas avec la plupart des autres radicaux libres. La délocalisation donne également lieu à la couleur violet foncé, caractérisée par une bande d'absorption dans une solution d'éthanol centrée autour de 520 nm.

Quand une solution de DPPH est mélangée avec celle d'une substance pouvant donner un atome d'hydrogène, cela donne la forme réduite avec la perte de cette couleur violette (bien qu'on puisse supposer une couleur jaune pâle résiduelle du groupe picryl encore présent).

Représentant le radical DPPH par Z• et la molécule donneuse par AH, la réaction primaire est :



D'où ZH est la forme réduite et A• est le radical libre produit dans cette première étape. Ce dernier radical subira ensuite d'autres réactions qui contrôlent la stœchiométrie globale, c'est-à-dire, le nombre de molécules de DPPH réduites (décolorées) d'une molécule du réducteur.

La réaction est donc destinée à établir le lien avec les réactions se déroulant dans un système oxydant, tel que l'autoxydation d'un lipide ou d'une autre substance non saturée; la molécule de DPPH (Z•) est donc destinée à représenter les radicaux libres formés dans le système dont l'activité doit être supprimée par la substance AH [52].

La figure 1.14 présente structure du radical libre du DPPH et DPPH non radicalaire.

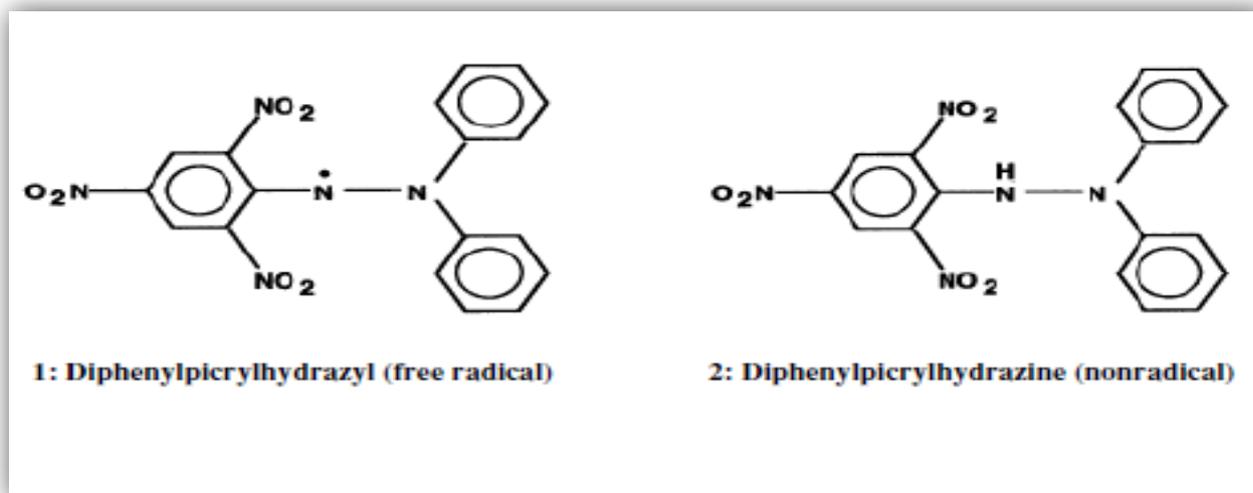


Figure 1.14 : structure du radical libre du DPPH et DPPH non radicalaire.

### 1.2.5 Production d'un biosurfactant

Les biosurfactants sont, produits par une variété de microorganismes telle que les bactéries ; les champignons et les levures, extracellulaires ou faisant partie de la membrane cellulaire. En utilisant des différentes sources de carbone, on citera notamment les hydrocarbures, les glucides, et les huiles végétales.

Pour réduire les coûts de production, d'autres sources de carbone, telles que les effluents d'olives, le lactosérum de fromagerie, l'eau de farine de manioc, les huiles végétales usées, les mélasses, qui sont des déchets industriels, peuvent également être utilisées pour la production de biosurfactants [53].

#### ▪ Facteurs influant sur la production de biosurfactants

La composition et l'activité émulsifiante du biosurfactant ne dépend pas uniquement de la souche productrice mais aussi des conditions de culture, ainsi, la nature de la source de carbone, la source d'azote ainsi que la Ratio C:N, limitations nutritionnelles, paramètres chimiques et physiques tels que la température, l'aération, les cations divalents et l'influence du pH. Ces conditions et paramètres n'influent pas non seulement sur la quantité de biosurfactant produite mais aussi sur le type de polymère produit [7].

#### ✓ Sources de carbone:

La qualité et la quantité de biosurfactant produit est affectée et influencée par la nature du substrat de carbone. Le diesel, le pétrole brut, le glucose, le saccharose, le glycérol ont été rapportés d'être une bonne source de substrat de carbone pour la production de biosurfactant. Un rendement très faible a été constaté lorsque seul le glucose ou de l'huile végétale était utilisé pour la production

d'un biosurfactant par *T. bombicola*, mais que le rendement a été augmenté à 70 g/L en présence des deux sources de carbone [7,54].

✓ **Sources d'azote:**

L'azote est un élément essentiel à la croissance microbienne. L'urée peptone, extrait de levure, sulfate d'ammonium, nitrate d'ammonium, nitrate de sodium, extrait de viande et extraits de malt ont été utilisés comme source d'azote pour la production. Bien que l'extrait de la levure est la source d'azote la plus utilisée, son utilisation en ce qui concerne la concentration est dépendante de l'organisme et du milieu de culture. Les sels d'ammonium et l'urée sont les sources d'azote préférées pour la production de biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus* alors que les nitrates favorisent la production maximale de tensioactifs chez *P. aeruginosa* [7].

✓ **Facteurs environnementaux:**

Ils sont extrêmement importants dans le rendement et les caractéristiques du biosurfactant produit. Pour l'obtention de grandes quantités de biosurfactants, il est toujours nécessaire d'optimiser le bioprocédé car le produit peut être affecté par les changements de température, pH, vitesse d'aération ou d'agitation. La plupart des productions de biosurfactants sont aurait été effectuée dans une plage de température de 25 à 300 °C. L'effet du pH sur le biosurfactant produit (par quelle souche le nom de la souche n'est pas mentionné (voire l'article biosurfactants : production and application ci-jointe)) a été étudié et donc une meilleure production s'est produite lorsque le pH est d'ordre de 8,0 (le pH naturel de l'eau de mer) [7].

✓ **Aération et agitation:**

L'aération et l'agitation jouent un rôle important dans la production de biosurfactants en facilitant le transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase aqueuse. Il peut aussi être lié à la fonction physiologique de l'émulsifiant microbien, il a été suggéré que la production d'agents bioémulsifiants peut améliorer la solubilisation de substrats insolubles dans l'eau et facilitent par conséquent le transport des nutriments vers les microorganismes [7].

✓ **Concentration en sel:**

La concentration en sels influence la production de biosurfactants, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectent pas certains biosurfactants, bien qu'il soit observé une légère diminution sur les concentrations micellaires critiques [25].

## 1.2.6 Avantages des biosurfactants

Les biosurfactants présentent de nombreux avantages par rapport à leurs contreparties chimiquement synthétisées, certains d'entre eux sont:[7].

- ✓ **Biodégradabilité:** Les agents de surface biologiques se dégradent facilement par les microorganismes.
- ✓ **Faible toxicité:** le biosurfactant présente une faible toxicité à celle du tensioactif d'origine chimique. Il a également été signalé que les biosurfactants a montré une CE 50 plus basse (concentration efficace pour diminuer de 50% de la population) que les dispersants synthétiques [4].
- ✓ **Disponibilité des matières premières:** des biosurfactants peuvent être produits à partir de matières premières de très bon marché disponibles en grande quantité. La source de carbone peut provenir des hydrocarbures, des glucides et / ou lipides, pouvant être utilisés séparément ou en combinaison avec chaque autre.
- ✓ **Facteurs physiques:** de nombreux biosurfactants ne sont pas affectés par les facteurs environnementaux tels que la température, le pH et la force ionique tolérances.
- ✓ **Surface et activité d'interface:** une bonne surfactant peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 75 à 35 mN / m et la tension interfaciale eau / hexadécane de 40 à 1mN / M. La Surfactine possède la capacité de réduire la tension superficielle de l'eau à 25 m N / M et la tension interfaciale eau / hexadécane à <1 mN / M.
- ✓ **Autres avantages:** la biocompatibilité et la digestibilité qui permet leur application dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et en tant que additifs alimentaires fonctionnels [7].

### 1.2.7 Extraction de biosurfactants

Pour extraire le biosurfactants du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer la biomasse (cellules bactériennes) de ce milieu (par centrifugation par exemple).

La récupération des biosurfactants dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules). Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, ou des techniques reposant sur la précipitation du biosurfactants. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices [57,58].

Il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le biosurfactants par un mélange des solvants (chloroforme/méthanol). Généralement, l'acidification permet une précipitation du biosurfactants. Suite à cette précipitation, une étape de centrifugation et de lavage sont nécessaires pour récupérer et purifier le biosurfactant [58].

### 1.2.8 Application des biosurfactants

Les biosurfactants ont une meilleure compatibilité avec l'environnement et possèdent de nombreux avantages par rapport aux surfactants chimiques, tels que la biodégradabilité, la faible toxicité, plus sélectifs, la stabilité thermique et chimique élevée, etc... [59].

Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les surfactants biologiques sont largement utilisés dans de nombreux domaines tels que la production alimentaire, l'agriculture, la chimie, l'industrie pharmaceutique (la lutte contre de nombreuses maladies, agents thérapeutiques conduisant à une réduction d'un grand nombre d'infections sans l'utilisation de produits chimiques de synthèse et de médicaments), la cosmétique (les crèmes antirides, crèmes hydratantes, et les cosmétiques de nettoyages) et les applications environnementales, tels que la biorestauration des polluants, la récupération améliorée du pétrole, la lubrification, la détergence, la solubilisation et la dispersion [03]. (Tableau 1.9).

Le tableau ci-dessous englobe les principaux domaines d'application des biosurfactants.

**Tableau 1.9 : Différents domaines d'application des biosurfactants [3,60].**

Domaine	Utilisation
<b>Environnement</b>	Bioremédiation : -opérateur de nettoyage des déversements d'hydrocarbures. - assainissement et rinçage de sol. - solubilisation des huiles.
<b>Pétrole</b>	- récupération améliorée du pétrole.
<b>Exploitation minière</b>	- opération de nettoyage des métaux lourds. - élimination des ions métalliques des solutions aqueuses, du sol et des sédiments.
<b>Aliments</b>	- solubilisation des huiles aromatique. - Amélioration de la texture des produits à base de matière grasse.
<b>Médicaments</b>	- Agent antiadhésifs. - Antifongiques. - Antibactériens. - Antiviraux. - Anticancéreux.
<b>Cosmétique</b>	- Nettoyant. - Préparation des crèmes hydratants dermatologiquement compatibles. - Les crèmes antirides.
<b>Chimies</b>	- Détergent domestique et industriel. - Peinture : dispersant, émulsifiant. - Textile : agent de mouillage.

### 1.3 Toxicité d'un biosurfactant :

Le biosurfactant est une biomolécule issue d'un groupe diversifié des microorganismes dont le pouvoir toxique est faible ou inexistante complètement.

Humberto et al. [60], Luna et al [61], Haba et al. [62] et d'autres ont évalué la toxicité des différents biosurfactants par des méthodes normalisées tel que le test de germination de blé et les bioessais d'*Artémia* et ils ont montré que le rhamnolipide produit par *P.aeruginosa*, le glycolipide issu de *Candida sphaeric* UCP 0995 et le biosurfactant produit par *Gordonia* sp. sont des biosurfactants non toxiques [60, 61, 62].

Deepansh Sharma et al. ont comparé dans leur étude le glycolipide produit par *L.helveticus*MRTL91 avec le surfactant SDS. Ils ont trouvé que le biosurfactant est moins toxique à sa concentration en CMC par rapport au SDS synthétisé chimiquement [63].

#### 1.3.1. L'évaluation de la toxicité :

La toxicité d'une substance peut être définie comme sa capacité de produire des effets nocifs à un organisme vivant. Elle varie selon la dose, la fréquence, la durée d'exposition, et le temps d'apparition des signes cliniques [64].

Toute substance destinée à être mise sur le marché que ce soit un médicament ou un produit chimique doit subir trois types d'essais de toxicité pour évaluer sa nocivité.

On distingue cliniquement trois formes essentielles de toxicité : la toxicité aiguë, la toxicité à court terme ou subaiguë ou encore subchronique et la toxicité à long terme ou chronique.

Les études de la toxicité expérimentale doivent être effectuées selon des protocoles bien établis et réalisées dans des conditions de bonnes pratiques de laboratoire. L'évaluation expérimentale de la toxicité globale d'une substance permet de déterminer :

- La dose maximale tolérée.
- Les organes, tissus et cellules cibles.
- Les fonctions physiologiques altérées,
- Les risques d'altération génétique et cancérogénèse,
- Les risques de malformation congénitale.

Cette évaluation permet l'appréciation du bénéfice attendu par rapport aux risques encourus [64].

#### ❖ Toxicité aiguë :

La toxicité aiguë est une forme de toxicité qui résulte d'une exposition de courte durée suite à une absorption rapide du toxique par dose unique ou multiple ne dépassant pas 24 heures. Les manifestations cliniques se développent rapidement en général, la mort ou la guérison survient sans retard [64].

La détermination de la toxicité permet l'évaluation qualitative et quantitative des phénomènes toxiques et de leur apparition dans le temps suite à l'administration d'une dose unique d'une substance physiologiquement active, cette détermination permet de connaître le niveau des doses pouvant entraîner la mort de l'animal de laboratoire ainsi que les symptômes d'intoxication aiguë. L'essai de la toxicité aiguë est la première étude toxicologique à effectuer pour une molécule dont on ignore la nature de sa toxicité, généralement on détermine deux grands paramètres, la DMM (dose mortelle minimale) et DM50 (dose mortelle 50) ou DL50 (dose létale 50) [65].

**1- Détermination de la DMM :** C'est la dose minimale de substance capable de tuer un animal par administration intraveineuse lente, la mort de l'animal est appréciée par arrêt cardiaque. Cette dose permet à l'expérimentateur de choisir les doses utilisées pour déterminer la DM50(DL50) et DM100 (DL100)[65].

**2- Détermination de la DM50 ou DL50 :** La DL50 correspond à la dose capable de tuer dans des conditions déterminées la moitié des animaux mis en expérience d'une même espèce animale [65].

- ✓ La sélection de l'espèce se fait généralement sur les rats et les souris des deux sexes, jeunes et âgés, à cause de leurs différences de sensibilité et par fois une espèce autre qu'un rongeur lorsque le schéma métabolique de ces dernières est différent de celui de l'homme.
- ✓ La substance à tester doit être administrer par deux voies, l'une est identique à celle de l'exposition de l'homme et l'autre assurant une biodisponibilité totale et que sa dose doit être comprise entre 1,2 et 1,5 comme un rapport de deux doses successives pour une gamme de six doses ou plus.
- ✓ Les lots sont constitués de 10 animaux identiques sur les plans : espèce, souche ou origine, sexe, âge et poids. Chaque lot recevra une dose de la substance à tester. Après administration les animaux sont mis en observation durant 14 jours. En cas d'apparition des signes de toxicité, la durée sera indéterminée.
- ✓ L'heure de la mort, le nombre de morts et les symptômes doivent être notés. Des examens macroscopiques doivent être faits sur tous les animaux morts et au moins quelques survivants [66].

- **Calcul de la DL50 :**

1) **Méthode de Karber et Behrens :** Il s'agit d'une méthode d'approximation par calcul rapproché, la DL50 est donnée comme suit[66] :

$$DL50 = DL100 - a * b/n$$

Avec : DL50 : la dose létale 50.

**DL100 :** la dose létale 100.

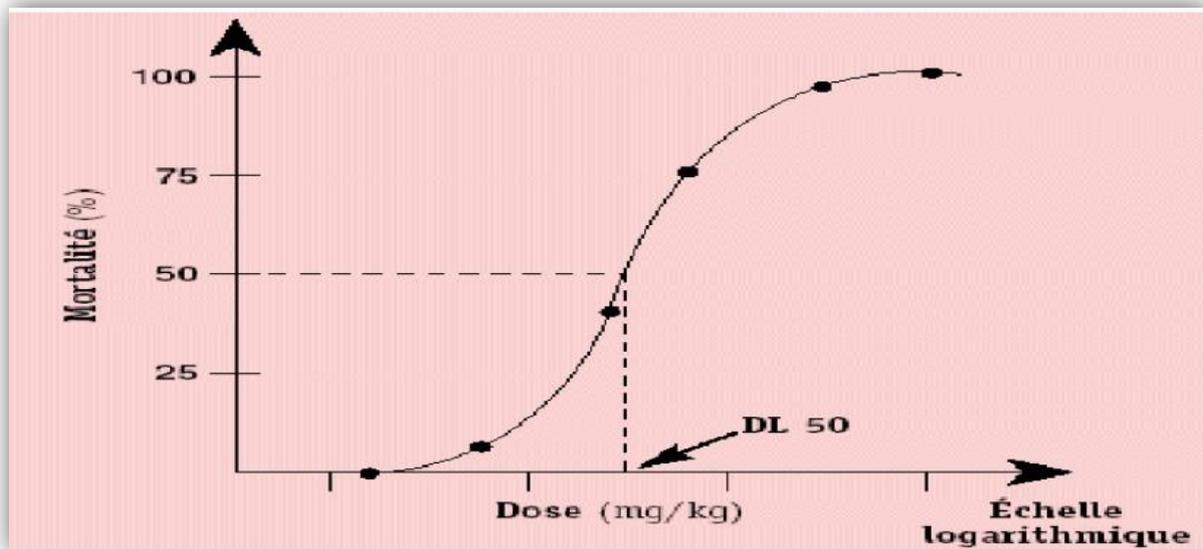
**a :** différence entre deux doses successives.

**b :** moyenne de mort entre deux doses successives

**n :** nombre moyen d'animaux par lot.

2) **Méthodes de Miller et Tainter** : C'est une méthode graphique qui consiste à porter sur le papier semi log les pourcentages de mortalité en fonction du logarithme décimal des doses utilisés [66].

Le graphe ci-dessous montre la relation dose/ effet sur l'échelle semi-logarithmique [66].



**Figure. 1.15 : Graphe montrant la relation dose/ mortalité.**

Pour le rendre linéaire, il faut porter sur le papier log-probit le pourcentage de mortalité en fonction du log de la dose. Comme les produits des pourcentages 0 et 100% tendent l'infini, ceux-ci sont remplacés par des valeurs corrigés [66].

- **Correction de 0%** :

$$Y_0 = 50 / n.$$

- **Correction de 100%** :

$$Y_{100} = (100n - 50) / n.$$

Avec n est le nombre d'animaux des lots qui ont donné 0 et 100% de mortalité.

Le graphe ci-dessous montre la relation dose/ effet sur papier log-probit[66].

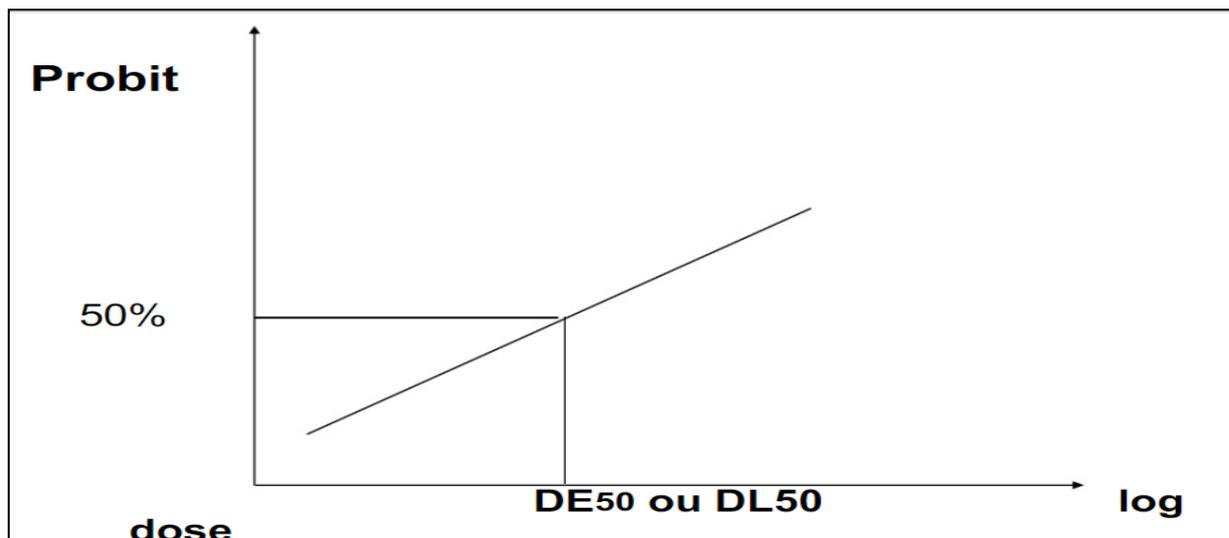


Figure. 1.16 : Graphe montrant la relation dose/ mortalité.

- L'écart type de la DL50 :  $S = (DL\ 84 - DL\ 16)/2$ .
- L'écart à la moyenne :  $\delta = \frac{2S}{\sqrt{2n}}$ . (n' le nombre total d'animaux dans les lots ayant des pourcentages de mortalité entre 07% et 93%).

Le résultat de est exprimé comme suit :

$$DL50 = DL50\ graphique \pm \delta$$

- ❖ **La toxicité par administration répétée** : Ce genre de test est destiné à l'évaluation de la toxicité due à l'accumulation des substances dans le cas des expositions répétées à des faibles doses (dose non toxique).

L'étude de la toxicité par administration répétée permet :

- D'estimer des informations sur les effets toxiques potentiels après l'exposition répétée.
- De connaître les organes cibles ;
- De la mise en évidence d'effets réversibles et irréversibles ;
- L'existence ou non de phénomènes cumulatifs et d'effets tardifs [66].

#### 1- La toxicité à court terme (subaiguë):

L'étude de la toxicité subaiguë permet de connaître la dose sans effet observé de la substance testé chez l'animal. L'évaluation des résultats doit prendre en considération la mortalité, la présence ou l'absence des anomalies comportementales et biologiques ainsi que l'identification des organes cibles et leurs lésions [66].

## 2- La toxicité chronique :

La toxicité chronique regroupe l'ensemble des effets délétères qui touchent un organisme vivant suite à une exposition ou à une administration répétée d'un toxique à des doses multiples non létales. Ces doses, individuellement, sont insuffisantes pour provoquer un effet immédiat. L'exposition doit être répétée sur une longue période pour causer des effets néfastes. L'apparition de ces effets est souvent insidieuse de manifestation brutale sans aucun symptôme alarmant, elle peut être réversible ou irréversible.

L'évaluation de la toxicité chronique consiste à une mise en évidence des altérations fonctionnelles et/ou morphologiques suite à l'administration répétée d'une substance seule ou en association et à établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la posologie. Cette évaluation a pour buts de (d'):

- Estimer la dose sans effets toxiques pour l'espèce animale étudiée (NOEL : No Observed Effect Level).
- Déterminer la dose journalière admissible (DJA).
- Déterminer les effets toxiques et les organes cibles après une exposition répétée.
- Déterminer si les effets sont réversibles ou irréversibles.
- Définir le mécanisme d'action de la substance et d'éventuelles interactions avec d'autres substances chimiques [67].

Le tableau ci-dessous résume les formes de toxicité et les protocoles de les suivre [67].

**Tableau 1.10 : Les différents essais toxicologiques.**

Type d'essai	Fréquence d'administration	Durée d'exposition	Espèces animales	sexe	âge	Nombre/lot	Dose(s)
<b>Toxicité aiguë</b>	unique	< 24 h	Souris rat	M+F	A/J	≥ 10	01
<b>Toxicité subaiguë</b>	répétée	≤ 1 mois	Rat	M+F	A/J	10-30	03
			chien			04-08	03
<b>Toxicité subchronique</b>	répétée	de 1 à 3 mois	Rat	M+F	A/J	40-100	03
			chien			04-08	03
			singe			04-08	03
<b>Toxicité chronique</b>	répétée	> 3 mois	Rat/	M+F	A/J	40-100	03
			chien			04-08	03
			singe			04-08	03

### 1.3.2. Exemple de l'utilisation d'*Artemia nauplii* pour les tests de toxicité :

En raison de la facilité avec laquelle ils éclosent à partir de kystes secs et de leur disponibilité toute l'année, les nauplii de la crevette à la saumure *Artemia salinas* ont les organismes d'essai les plus pratiques pour les études de toxicité. Les essais biologiques mentionnés dans la littérature ont

toutefois principalement été effectués avec des larves dont on ignore ni le stade exact de l'instar ni l'origine géographique. L'incubation des kystes doit toujours être effectuée dans des conditions de température rigoureusement contrôlées, car le début de l'éclosion et la durée de la période d'éclosion dépendent de la température. De plus, les expériences ne devraient être menées qu'avec des populations de nauplii du même stade de développement, car il a été démontré que les deuxième et troisième stades sont significativement plus sensibles aux toxiques que les larves de premier stade. Il a été démontré que la sensibilité aux produits chimiques variait d'une souche *Artemia* à une autre [68].

### **Conclusion :**

À l'ère de l'industrialisation mondiale, l'exploration des ressources naturelles a été une source d'expérimentation pour la science et les technologies de pointe, donnant lieu à la fabrication de produits à valeur globale élevée sur le marché mondial, tels que les biosurfactants.

Les biosurfactants sont des molécules microbiennes qui se caractérisent par leur amphipathie en raison d'une grande variété de structures chimiques dans leurs molécules qui impliquent des groupes hydrophobes et hydrophiles, ce qui leur permet de jouer un rôle clé dans l'émulsification, la formation de mousse, la détergence et la dispersion, qualités recherchées dans différentes industries. La production de biosurfactants est considérée comme l'une des technologies clés du développement du 21<sup>ème</sup> siècle. En plus d'exercer un impact positif fort sur les principaux problèmes mondiaux, la production de biosurfactants revêt une importance considérable pour l'implantation de processus industriels durables, tels que l'utilisation de ressources renouvelables et de produits «verts».

La biodégradabilité et la faible toxicité ont conduit à l'intensification des études scientifiques sur un large éventail d'applications industrielles pour les biosurfactants dans le domaine de la bioremédiation ainsi que dans les industries du pétrole, de l'agroalimentaire, de la santé, de la chimie, de l'agriculture et de la cosmétique [43].

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

### 2. Matériel et méthodes :

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie et de biochimie, département de Génie des procédés, Faculté de la technologie. En collaboration avec laboratoire de chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules, Université de Blida 1.

L'objectif principal de ce travail est de produire et caractériser une nouvelle biomolécule à partir d'une souche bactérienne marine mésophile et de déterminer son pouvoir toxique et antioxydant, et son activité antimicrobienne.

#### 2.1 Matériels :

##### 2.1.1 Appareillage :

Le matériel de laboratoire utilisé au cours de notre étude est le suivant : **Tableau 2.1**

<b>appareil</b>	<b>Autoclave</b>	<b>Etuve</b>	<b>Shaker Wise Cube</b>	<b>Vortex</b>	<b>Tensiomètre</b>
<b>Photo</b>					
<b>Type</b>	<b>AESCULAP</b>	<b>mLw TS100</b>	<b>Fuzzy Control System</b>	<b>DLAB</b>	<b>GIBERTINI</b>
<b>Appareil</b>	<b>pH mètre</b>	<b>Centrifugeuse</b>	<b>Réfrigérateur</b>	<b>Ultra turrax</b>	<b>Rotavapeur R II</b>
<b>Photo</b>					
<b>Type</b>	<b>inoLab</b>	<b>SIGMA 2 – 6E</b>	<b>Condor</b>	<b>IKA T25</b>	<b>BUCHI</b>
<b>Appareil</b>	<b>Balance</b>	<b>Agitateur</b>	<b>Incubateur</b>	<b>Spectrophotomètres UV / Visible</b>	<b>Bec benzène</b>

Photo					
Type	ACCULAB	IKA RH	memmert	METACH	
Appareil	Chauffe ballon	Thermocouple	Thermo scientifique		
Photo					
Type	BioCote	BioCote	NICOLFT j S 10		

## 2.2 Origine de la souche bactérienne S13 :

La souche bactérienne (codée S13) utilisée dans cette étude est une souche mésophile, isolée récemment à partir d'algue *Zonaria tourefoirii* sur les côtes méditerranéennes algériennes, au niveau du complexe touristique « Corne d'Or » à Tipaza (Figure 2.1).

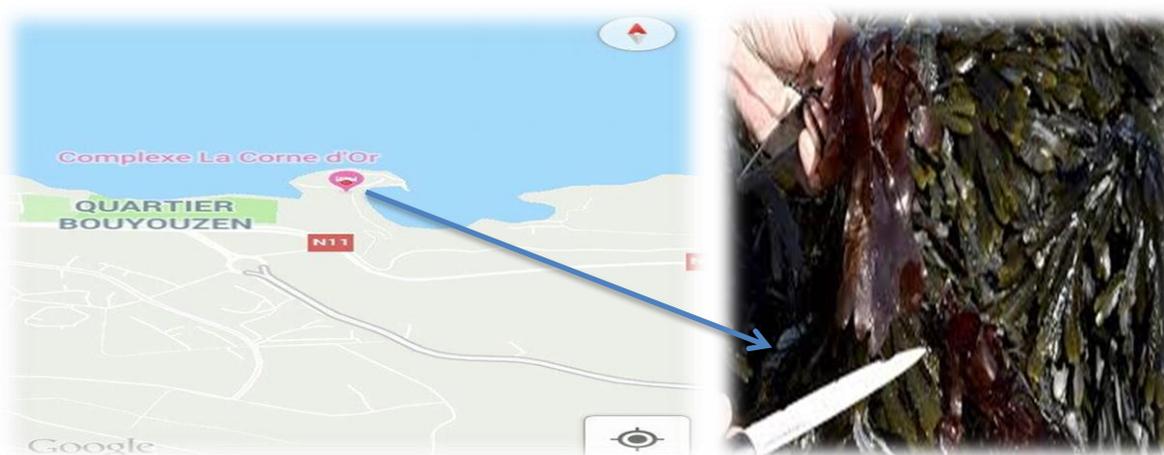


Figure 2.1 : Localisation du biotope utilisé pour l'isolement de la bactérie à partir d'une algue brune marine « Corne d'Or sur la carte de Google ».

## 2.3 Repiquage et conservation de la souche :

### 2.3.1 Repiquage de la souche :

Le repiquage se fait par ensemencement en stries croisées sur milieu LB gélosé, stérilisé à l'autoclave (120 °C/20 min), puis incubé à 30 °C pendant 24 h (Figure 2.2).

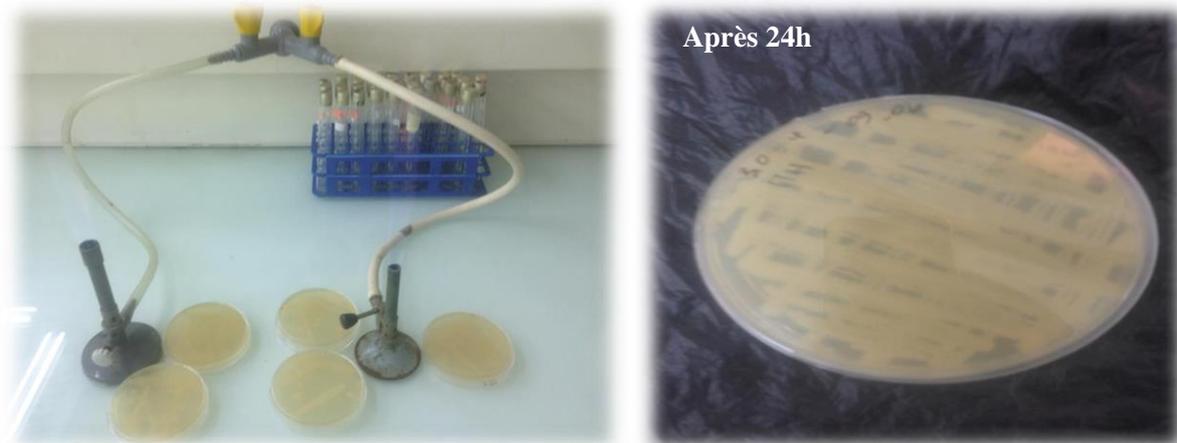


Figure 2.2 : Repiquage de la souche S13.

- **Repiquage dans un milieu liquide :** repiquer ce qui est prélevé à l'intérieur de la boucle.
- **Repiquage sur milieu solide :** repiquer en déplaçant en zigzag l'aiguille sur la surface de l'agar, du fond du tube vers l'ouverture, en prenant soin de ne pas érafler la gélose.

### 2.3.2 Conservation de la souche :

• **Conservation de courte durée :** Les souches pures ont été repiquées sur milieu riche LB solide et conservées à +4 °C pour les prochaines manipulations. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, la réactivation doit se faire tous les mois [69].

• **Conservation de longue durée :** A partir d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance, les souches sont conservées dans du bouillon LB en présence de 25% de glycérol à -40 °C [70].

## 2.4 Milieu de culture :

Tous les milieux préparés dans le but de la réalisation de cette étude sont autoclavés à 120 °C pendant 20 min afin de garantir leur stérilisation totale.

### 2.4.1 Milieu Luria Bertani (LB) liquide :

Le milieu Luria Bertani (LB) est utilisé pour la préculture des souches bactériennes. Sa composition est donnée dans le Tableau 2.2.

**Tableau 2.2 : Composition du milieu LB.**

Composition	Quantité (g/L)
<b>Extrait de levure</b>	05
<b>NaCl</b>	05
<b>Peptone</b>	10

#### 2.4.2 Milieu LB solide :

Il est obtenu après l'addition de 18 g d'agar / L de milieu LB liquide. Il est souvent utilisé pour la conservation des souches bactériennes.

#### 2.4.3 Muller-Hinton(MH) :

- 300g d'infusion de viande, 17.5 g d'hydrolysate de caséine, 1.5 g d'amidon, 17 g d'agar sont les composés du milieu MH.

Pour préparer 1L d'une solution du MH déshydraté, il nous faut 38g du MH en poudre mélangée avec 1000 mL eau distillée. Mettre la solution en agitation couplée avec un chauffage jusqu'à la solubilisation totale de la poudre. Puis stérilisé à l'autoclave.

#### 2.4.4 Milieu Minimum (MM) :

C'est un milieu qui comporte les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance de la bactérie S13. Sa composition est donnée comme suit :

**Tableau 2.3 : Composition du milieu MM.**

Composition	Quantité (g)
<b>NaCl</b>	10
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	0,40
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,30
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,30
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0,33
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,05
<b>Extrait de levure</b>	01

Ce dernier milieu doit être préparé et autoclavé dans un laps de temps ne dépassant pas les 24 h avant son utilisation.

## 2.5 Production de biosurfactant

- *Préparation de la préculture :*

La souche est cultivée dans un erlenmeyer de 1000 mL contenant 200 mL de milieu LB. Ce dernier est incubé à 30 °C sous une agitation de 150 tr /min pendant 18 h (Figure 2.3).



**Figure 2.3 : La préculture de la souche S13 obtenue après incubation sous agitation pendant 24h.**

- *Préparation de milieu de production :*

L'huile d'olive est utilisée comme une source de carbone et d'énergie pour la production de biosurfactants. La raison de l'utilisation d'huile d'olive dans la production de biosurfactants est de stimuler le pouvoir de la bactérie productrice par la disponibilité de la substance hydrophobe.

La production s'effectue dans des erlenmeyers remplis avec le MM jusqu'à 1/5 de son volume total qui ont déjà stérilisés auparavant en utilisant l'autoclave à 120 °C / 20 min après l'ajustement du pH à 7,2, additionnée de 2 mL (1%, v/v) comme source de carbone, 2% à 5% en volume de la préculture et 1% (v/v) d'une solution stérile d'oligoéléments. Ils sont en suite incubés à 30 °C sous agitation 150 tr/min pendant 48 h (Figure 2.4).

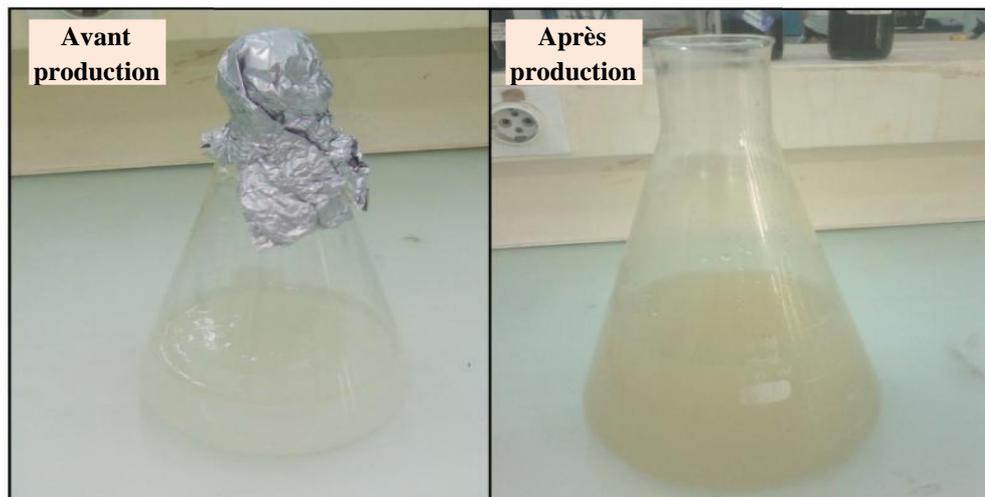


Figure 2.4 : La production de biosurfactant par la souche S13 dans le milieu MM.

## 2.6 Extraction de biosurfactant :

Après 48h d'incubation et lorsque le biosurfactant atteint son seuil d'activité dans le milieu de culture (vérifié par le test de DDP), on passe à la centrifugation de ce dernier à 4000 tr /min pendant 20 min.

L'extraction du biosurfactants par solvant : Elle passe par deux étapes successives :

- 1- La récupération de la phase hydrophobe : en utilisant 50 mL d'hexane / 200 mL du milieu comme un solvant pour enlever l'huile d'olive (Figure 2.5).



Figure 2.5 : Extraction par l'Hexane.

- 2- L'extraction proprement dite du biosurfactant : dans le but de récupérer les composés hydrophiles en utilisant des volumes égaux de l'acétate d'éthyle et du surnageant suivant le rapport v/v dans des ampoules à décanté (Figure 2.6).



**Figure 2.6 : Récupération de biosurfactants par extraction l'acétate d'éthyle.**

La phase organique obtenue doit passer par une 2<sup>ème</sup> décantation afin de concentrer le biosurfactants et récupérer le maximum de solvant pour le réutiliser ou bien par l'évaporateur rotatif (rota-vapeur), par la suite vient l'étape du séchage de la petite fraction obtenue pour arriver en fin à la biomolécule brute.

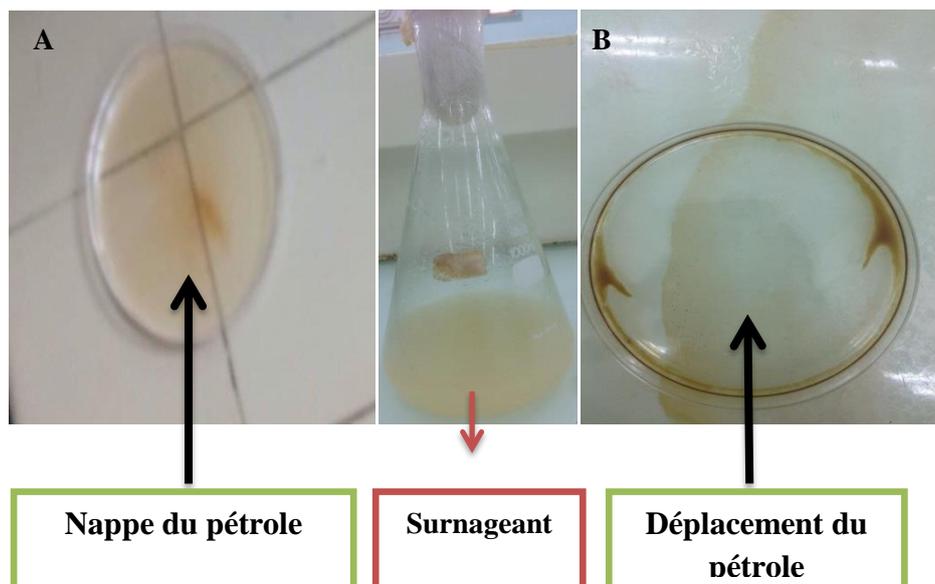
## **2.7 Techniques de mesure employées pour estimer la production de biosurfactant**

La production de biosurfactants a été suivie par la mesure de diamètre de déplacement de pétrole (DDP) et la réduction de la tension de surface (TS). D'autre technique complémentaire (indice d'émulsification, E24) a été employée pour la confirmation de la production.

### **2.7.1 Test de déplacement de pétrole (DDP) :**

C'est un test quantitatif de détection du taux de production du biosurfactants. Pour cet essai, 20  $\mu$ L de pétrole brut est ajoutée à la surface de 40 mL d'eau distillée dans une boîte de Pétri pour former une mince couche d'huile [71].

Ensuite 10  $\mu$ L de la culture sont placés doucement au milieu de la couche d'huile. Si le biosurfactant est présent dans le surnagent, l'huile est déplacée, et le diamètre (en cm) de la surface, un halo clair et visible (zone de compensation) est mesuré après 30 secondes. Plus le diamètre est grand, plus la production de biosurfactant est importante (Figure 2.7) [72].



**Figure 2.7 : Technique de déplacement du pétrole. (A) : Etape 1: couche huileuse du pétrole. (B) : Etape 2: effet de l'ajout d'un biosurfactants sur la couche de pétrole (formation d'halo clair).**

### 2.7.2 Tension de surface (TS) :

Un volume d'environ 20 mL du surnageant est nécessaire pour la mesure de la tension de surface. La mesure a été réalisée par la méthode de lame de Wilhelmy à l'aide d'un tensiomètre, les lectures ont été effectuées pour chaque échantillon. L'unité de la tension de surface est le  $\text{mN.m}^{-1}$  [73].

### 2.7.3 Indice d'émulsion ( $E_{24}$ ) :

L'indice d'émulsion permet de vérifier la capacité de la souche à émulsionner une phase hydrophobe dans une phase hydrophile.

Le test consiste à mélanger 4 mL de surnageant de biosurfactants avec 4 mL de liquide hydrophobe dans des tubes. Les tubes sont ensuite mixés à l'aide d'un vortex pendant 2 min. Après l'homogénéisation des deux phases, les tubes sont laissés au repos pendant 24 h à température ambiante (Figure 2.8).

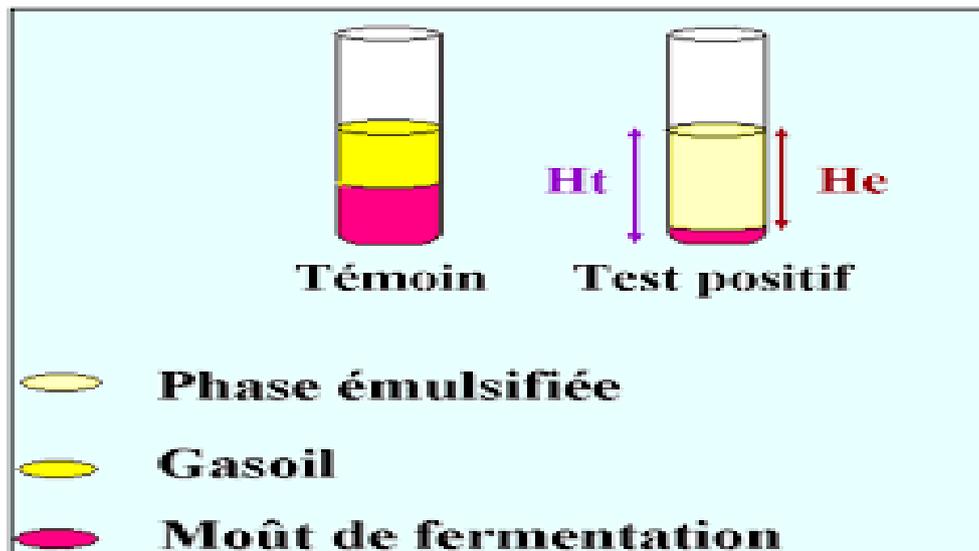


Figure 2.8 : Test d'émulsification E<sub>24</sub>.

On mesure par la suite la hauteur de l'émulsion et on calcule l'E<sub>24</sub> selon la relation décrite ci-dessous [74]:

H<sub>e</sub> : hauteur d'émulsion.

$$E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100$$

H<sub>t</sub> : hauteur total.

## 2.8 Caractérisation structurale de biosurfactant

### 2.8.1 Dosage de protéine :

Le dosage de protéine est basé sur la réaction de Biuret. La réaction du Biuret met en évidence les liaisons peptidiques. Il s'agit de mesurer l'absorbance du complexe coloré (violet) formé entre les ions Cu<sup>2+</sup> du sulfate de cuivre du réactif de Biuret et la liaison peptidique de la protéine étudiée. Plus les liaisons sont nombreuses, plus l'absorbance est grande. C'est une méthode simple et moyennement rapide dont la sensibilité est faible c'est-à-dire un seuil de 100 µg [75, 76].

Le dosage est réalisé en mélangeant 04 mL du réactif de biuret [20 mL de CuSO<sub>4</sub> (0,5%) + 20 mL de NaOH (10%)] avec 1 mL de la solution à tester et 2 mL de NaCl (0,9%), le mélange est laissé à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 min, la densité optique est mesurée à 540 nm contre un blanc qui ne contient pas la substance à tester.

Une courbe d'étalonnage obtenue par le tracé de la densité optique en fonction des concentrations préparées d'une protéine de référence (gélatine), est nécessaire pour calculer les taux des protéines dans notre solution de biosurfactants (annexe I).

### 2.8.2 Analyse par FTIR :

Les absorptions dans l'infrarouge permettent de déterminer la présence des groupements et des fonctions au sein d'une substance inconnue, à l'aide de tables des corrélations [77].

Les spectres infrarouges ont été obtenus en utilisant un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, NicoIFT i S10). Une petite fraction de biosurfactants a été disposée sur la plaque de l'appareil FTIR. Les mesures d'absorption optique ont été effectuées dans les domaines moyen-IR dont les longueurs d'onde sont comprises entre 500 et 4000.

## 2.9 Propriétés physicochimique de biosurfactant

### 2.9.1 Détermination de concentration micellaire critique :

Comme étant un paramètre essentiel dans notre étude, La concentration micellaire critique joue un rôle important lors de l'évaluation de l'activité des biosurfactants. La CMC est déterminée par une série de dilution de surnageant en fonction de la tension de surface ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). La plus faible valeur de la tension de surface correspond à la CMC, au-delà, il y aura une saturation du milieu par les micelles et donc une stabilité de valeur de la TS [25].

### 2.9.2 Activité Antioxydante :

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl) en utilisant des différentes concentrations de la substance à tester. La solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 2.4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol, 100  $\mu\text{L}$  de surnageant ainsi que le contrôle positif sont ajoutés à 2 mL de la solution de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm [78]. L'activité antioxydante a été estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antioxydant} = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}}$$

## 2.10 Etude de stabilité de biosurfactant

L'étude de la stabilité de biosurfactant brut a été réalisée sur le surnageant dont les paramètres étudiés sont : température, pH et salinité. Le contrôle s'effectue après 24 h par la mesure de la TS suivant les méthodes décrites par Eddouaouda [25].

### 2.10.1 Stabilité thermique :

Le surnageant a été incubé à différentes températures (4, 25, 37, 45, 55, 77, 100 et 121 °C) pendant 2 h. Les mesures de la TS ont été prises après 24 h de repos à température ambiante.

### 2.10.2 Stabilité chimique :

#### 2.10.2.1 Effet du pH :

Le pH du surnageant a été ajusté à différentes valeurs (2 à 12) en utilisant des solutions de HCl(1M) ou de NaOH (1M). Après 24 h, nous avons mesuré de la tension superficielle..

#### 2.10.2.2 Effet de salinité :

Le surnageant a été soumis à différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) : 0, 10, 30, 60, 100, 150, 200, 250 et 300 (g/L) (p/v). Les solutions sont laissées à la température ambiante pendant 24 h avant de mesurer la TS.

## 2.11 Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de biosurfactant a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé cité par Meddour et al. [79].

Sept souches de référence ATCC, provenant du laboratoire de recherche sur la CHIMIE DES Substances Naturelles et de Biomolécule (université Blida 1).

Sont testées : Donner le numéro ATCC de chaque souche ?

*Agrobacterium tumefaciens*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *EF*, *Salmonella enterica* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui ont servi par la suite à préparer l'inoculum en les trempant dans des tubes de solution d'eau distillée stérile.

Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, on a trempé un écouvillon dans la suspension pour étaler la surface entière déjà remplie par la gélose Mueller Hinton à trois reprises. Après chaque application, on a tourné la boîte de 60° environ en vue d'assurer une distribution homogène de l'inoculum. Enfin, on a écouvillonné tout autour du bord de la surface de la gélose.

Des disques de papier Wattman stériles (6 mm de diamètre) sont imprégnés de concentration 100 g/L de biosurfactant solubilisé dans de l'eau distillée stérile et appliqués, à l'aide d'une pince, sur la surface du milieu MH. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24 h à 37 °C.

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle [79].

### 2.12 Croissance synergie et/ou antagoniste :

Dans des boites de Pétri stériles nous avons écoulé le milieu LB solide déjà préparé et stérilisé, après refroidissement à l'air libre pendant quelques minutes nous avonsensemencé

la souche S13 en tête de boîte pour mettre les souches restantes perpendiculairement à celle-ci en montant du bas vers le haut de façon à ne pas toucher la S13 formant ainsi un T. Sachant que les bactéries hydrocarbonoclastes testées sont les suivantes : NIJ-3'R-K2E, toutes les étapes sont effectuées sur une paillasse propre et devant un bec benzène afin de garantir un endroit bien stérile et d'éviter toute sorte de contamination.

### 2.13 La phytotoxicité :

La phytotoxicité du biosurfactant a été évaluée de manière statique. Le test est basé sur la germination des graines et l'élongation des racines de blé en suivant les méthodes décrites par Tiquia et al. [80].

Des solutions de biosurfactant extrait ont été préparées avec de l'eau distillée. À des concentrations de (0,3, 0,6, et 1,5 g/L). La toxicité a été déterminée dans des boîtes de Pétri stériles (1 cm × 10 cm) contenant du papier filtre Wattman. Les graines ont été prétraitées avec une solution de NaCl. Dix graines étaient inoculées dans chaque boîte de Pétri contenant 5 mL de la solution à examiner à 27 °C.

Les mêmes étapes ont été établies avec une solution de SDS concentrée à 1 g/L et 10g/L comme témoins négatifs (pas de croissance).

Après cinq jours d'incubation dans l'obscurité, la germination des graines, l'allongement des racines ( $\geq 5$  mm) et l'indice de germination (facteur de germination des graines et allongement relatif des racines) ont été déterminés comme suit:

$$\text{Germination relative des graines (\%)} = \left( \frac{\text{nombre de graines germées dans extrait}}{\text{nombre de graines germées dans le témoin}} \right) \times 100.$$

$$\text{Longueur de racine relative (\%)} = \left( \frac{\text{longueur de racine moyenne dans l'extrait}}{\text{moyenne longueur de la racine dans le contrôle}} \right) \times 100.$$

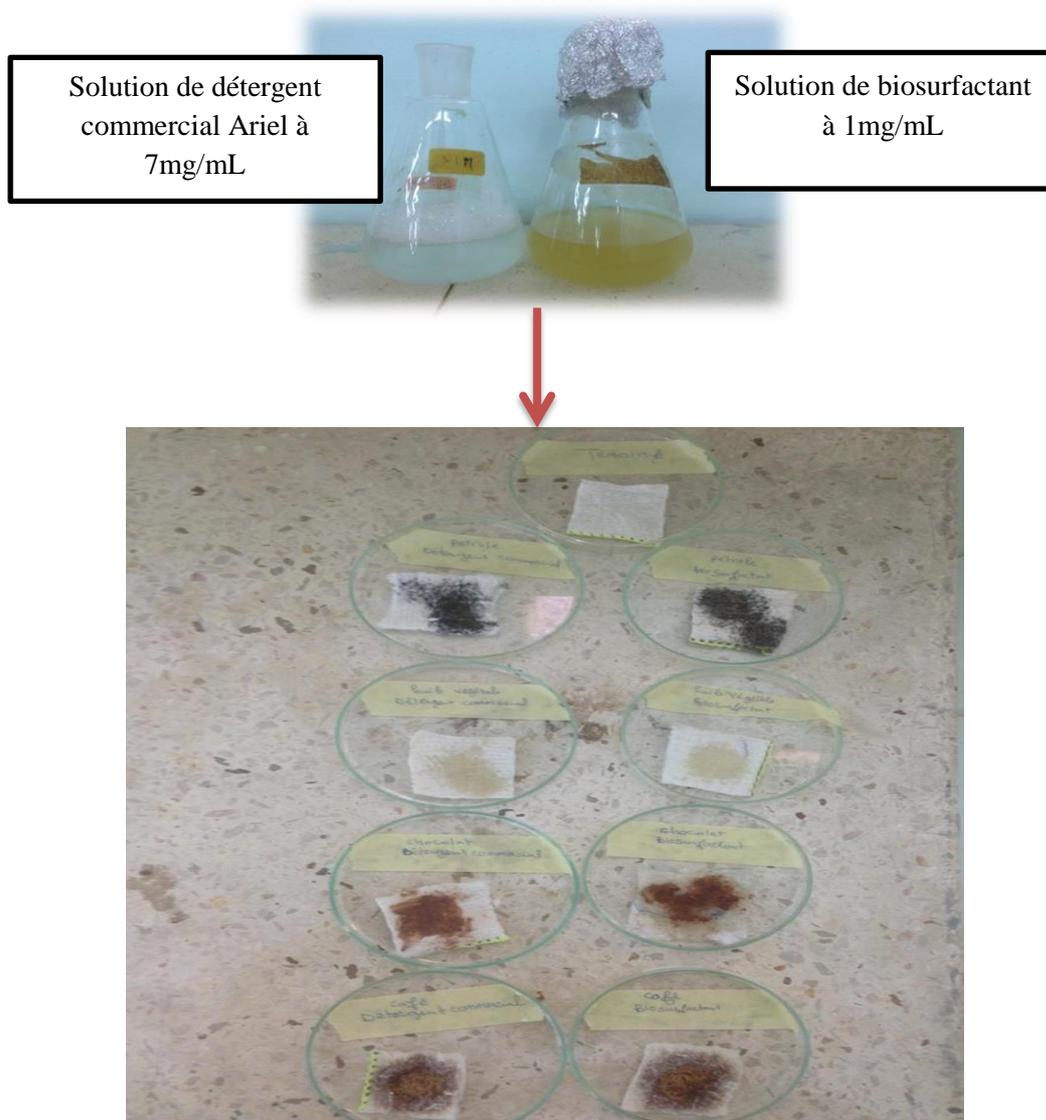
$$\text{Indice de germination} = \left[ \left( \frac{\text{\% de germination relative des graines}}{\text{\% la longueur de racine relative}} \right) \right] / 100\%.$$

## 2.14 Tests de performance de lavage

Des pièces du tissu en coton ( $4 \times 4$  cm) portant des taches de huile végétale, pétrole, chocolat et café, ont été traitées durant 30 min à  $40^\circ\text{C}$  sous différentes conditions:

1. 100 mL d'eau de robinet + solution de détergent commercial Ariel à 7 mg/mL.
2. 100 mL d'eau de robinet + solution de biosurfactant à 1 mg/mL.

Les pièces de tissus sont par la suite rincées à l'eau distillée, puis séchées afin d'être évaluées visuellement suite à une simple comparaison avec un contrôle (coton non traité).



**Figure 2.9 : Les différentes taches utilisées pour le test de performances de lavage de biosurfactants par rapport au détergent commercial.**



## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1 La production de biosurfactant

La production de la biomolécule tensioactive par la souche *Bacillus amyloliquefaciens*S13a été étudiée dans un milieu minimum contenant 1% (v/v) d'une source de carbone (l'huile d'olive) à 30°C sous une agitation; après 48h d'incubation nous avons remarqué un trouble et une formation d'une mousse à la surface du milieu ce qui est présenté dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 3.1 : La production de biosurfactant par la souche *Bacillus amyloliquefaciens* S13.**

Temps de production (h)	0	48
Apparence du milieu de culture		

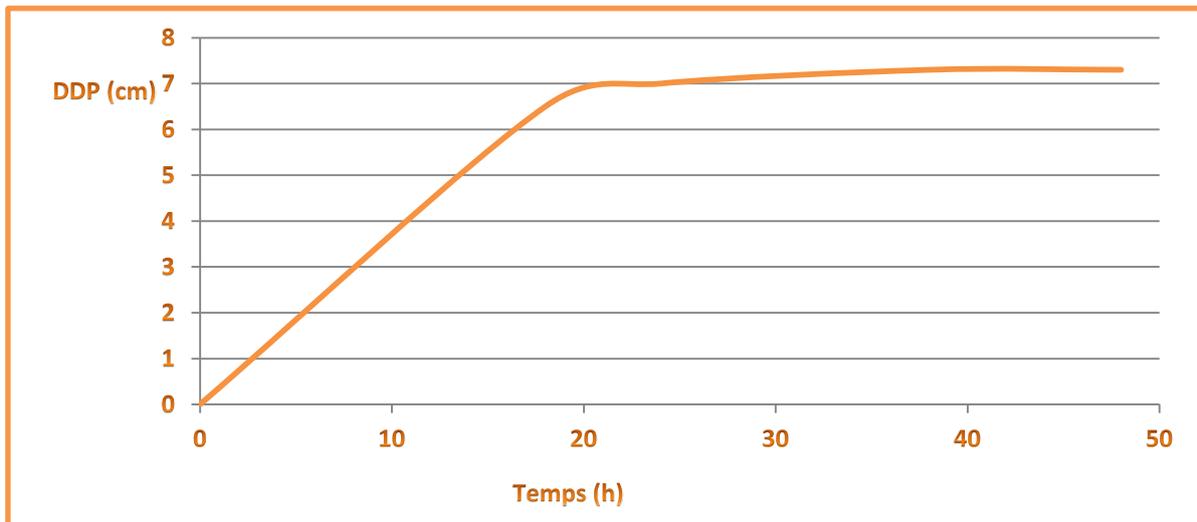
Le test du déplacement d'huile (DDP) est un test qualitatif qui nous a permis de confirmer les résultats déjà remarqués visuellement ceci est éclairci dans le tableau et le graphe suivants.

**Tableau 3.2 : Suivit de production du biosurfactant en fonction du temps.**

Temps(h)	18	24	38	48
DDP (cm)	6.5	7	7.3	7.3
Photos de la zone claire				

Pour mieux appréhender les différentes phases de la cinétique de production, la figure 3.1 révèle que l'activité atteint sa phase stationnaire à partir de 38h d'incubation. Plus le temps d'incubation s'approche de 48h plus le diamètre de déplacement d'huile s'agrandit ce qui se traduit par la réduction de la tension de surface jusqu'à  $29\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ .

D'après Hentati [8], le test de déplacement d'huile est un test utilisé également pour montrer la sécrétion de biosurfactants par les souches étudiées, les résultats obtenus sont en concordance avec ceux de la tension de surface. Dans le cas de la souche FLU5 de *Bacillus stratosphericus*, la formation d'un halo est remarquable pour les cultures contenant l'huile d'olive (8,7 cm), l'huile de maïs (8,7 cm), l'huile de friture résiduelle (8,5 cm) et sur le bouillon nutritif (NB) (7,2 cm), ce ci se traduit par une valeur de TS entre 13 et  $20\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ .



Dans le cas de PYR2 de *Bacillus licheniformis*, la formation d'un halo est remarquable sur le bouillon nutritif (BN), avec un diamètre de l'ordre de 8,7 cm.

**Figure. 3.1 : Cinétique de production du biosurfactant par la souche S13 en milieu minimum.**

## 3.2 Extraction et purification du biosurfactant

Deux solvants ont été utilisés pour la récupération du biosurfactant. En effet, l'extraction par dichlorométhane nous a donné une bonne quantité (rendement 0.1g/ 250mL) du biosurfactant alors que le déplacement de pétrole était d'un diamètre faible (2cm). Et donc le dichlorométhane a extrait le biosurfactant avec une concentration très diluée ce qui explique l'halo de 2 cm.

D'autre côté, l'utilisation de l'acétate d'éthyle nous a permis de récupérer un rendement en masse de 1,13 g/L et 7cm du diamètre de DDP. En revanche, la capacité productrice de biosurfactant par la souche *Staphylococcus haemolyticus* est étudiée par M. Eddouaouda, les résultats obtenus montrent clairement que la plus grande réduction de la tension de surface ( $25,8 \text{ mN.m}^{-1}$ ) est obtenue après deux jours d'incubation et le diamètre de la surface halo étaient de 8 cm après la séparation par l'extraction à l'acétate d'éthyle donne un rendement en biosurfactant de  $2,1 \text{ g.l}^{-1}$ .

Et par conclusion, le solvant le plus efficace pour récupérer le biosurfactant avec sa forme concentrée est l'acétate d'éthyle.

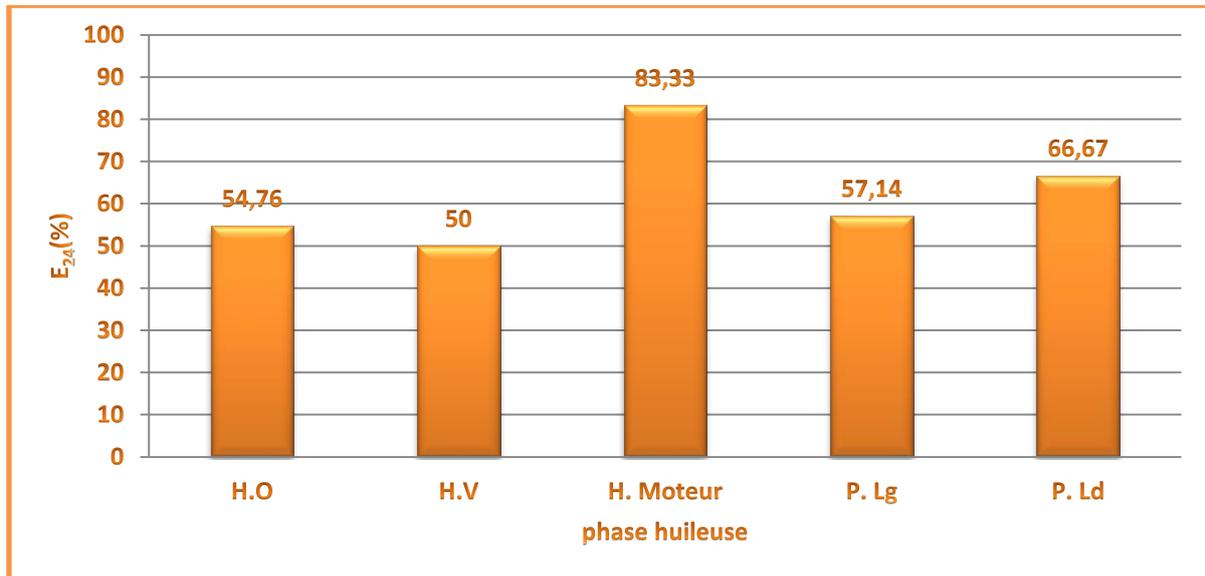
## 3.3 Caractérisation physicochimique et antimicrobienne du biosurfactant

### 3.3.1 Activité émulsifiante $E_{24}$ :

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3.2.

Nous avons enregistré des valeurs excédant 50% pour toutes les phases huileuses étudiées. Le biosurfactant produit par la souche S13 possède un pouvoir émulsifiant modéré entre 50 et 57% avec l'huile d'olive, huile végétale, pétrole léger et le gazole. Nous remarquons ainsi un

maximum d'émulsification atteignant 66,67% avec le pétrole et 83,33% avec l'huile de moteur.



**Figure 3.2 : Pouvoir émulsifiant du biosurfactant sur différentes phases huileuses. HO : l'huile d'olive, HV : l'huile végétale, H.Moteur : l'huile de moteur, P.Lg : pétrole liéé et P.Ld : pétrole lourd.**

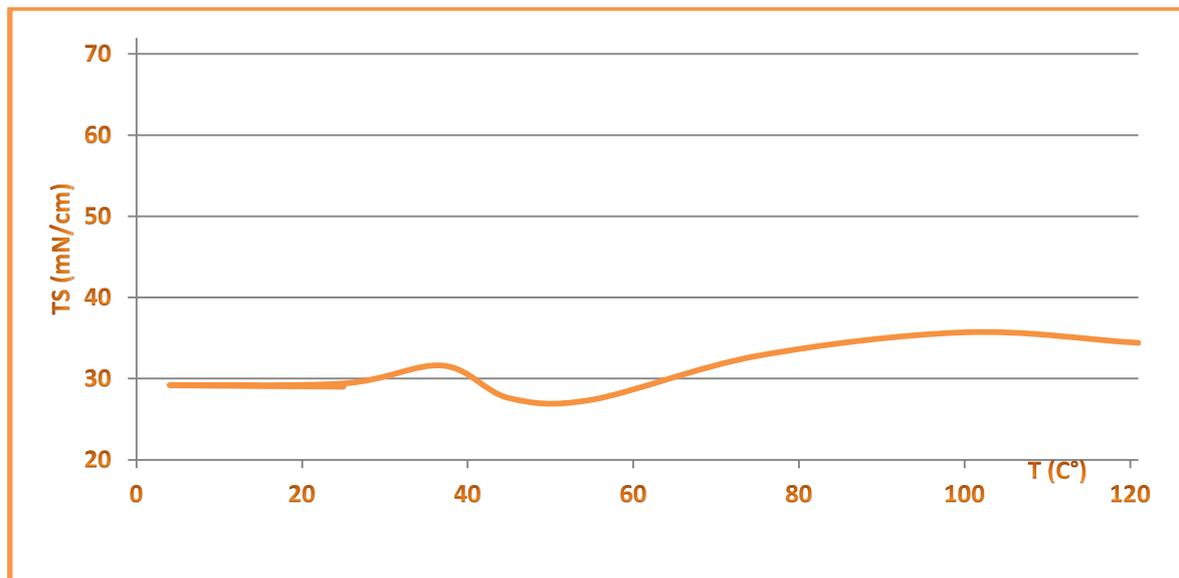
Luna et al. [61] et Thavasi et al. [81] ont montré que les biosurfactants produits par *B. megaterium*, *C. kutscheri*, *P. aeruginosa* (glycolipide, glycolipopetide et lipopeptide respectivement) et le glycolipide issu de *C. sphaerica*UCP0995 ont un pouvoir émulsifiant stable et important dans les différentes conditions environnementales ce qui confirme l'applicabilité de ces derniers contre la pollution des hydrocarbures [33,81].

Ce qui nous amène à conclure que le biosurfactant produit par la souche S13 présente un grand intérêt dans le domaine environnemental comme la dépollution des sols contaminés par les hydrocarbures, mis à part sa capacité de chasser les polluants hydrophobiques mettant la main donc sur le domaine de l'industrie [61, 25].

La stabilité des biosurfactants à appliquer dans diverses zones industrielles dépend de sa stabilité contre les conditions extrêmes ou variables de la température, la salinité et le pH [06].

### 3.3.2 Stabilité thermique :

Les résultats obtenus (figure 3.3) montrent que la température comprise entre 4 et 55°C n'a aucune influence de déstabiliser le surnageant et donc sur le biosurfactant cela est vérifié par une stabilité de TS autour de 29 mN.m<sup>-1</sup>. Par contre, la température supérieure ou égale à 75°C affecte ce dernier par l'augmentation de la valeur de la tension de surface jusqu'au 35,7 mN.m<sup>-1</sup>. Pour cette raison ce biosurfactant est pratiquement stable dans une gamme allant jusqu'à 55°C.



**Figure.3.3 : Effet de la température sur la stabilité de biosurfactant issu de la souche S13.**

Desai et Banat disent que la température cause une altération sur la composition de biosurfactant produit par *A. paraffineus* et *Pseudomonas* sp. DSM-2874. Alors que le biosurfactant produit par la souche thermophile *Bacillus* sp. ne subit aucun changement dans les propriétés comme la diminution de la tension de surface, tension interfaciale et même son activité d'émulsification après autoclavage à 120 °C pendant 15 min [4].

D'autre part, Inerney et al. reportent que lichenysin issu de *Bacillus licheniformis* possède une résistance contre une température supérieure à 50°C, ainsi que le biosurfactant produit par *Arthrobacteprotophormiae* garde sa stabilité dans une gamme de température entre 30 et 100°C [37].

### 3.3.3 Stabilité chimique :

#### 3.3.3.1 Effet du pH :

L'étude de l'impact de la variation du pH nous a permis d'estimer les résultats présentés sur la figure 3.4.

Des valeurs de tension de surface supérieures à 34 mN/m ont été notées pour un pH fortement acide ou fortement basique (2,4 et 12) ce qui s'est traduit par une précipitation remarquable visuellement avec la formation d'une couche huileuse à la surface du tube et par conséquent la perte totale de l'activité de biosurfactant. Cette précipitation obtenue est estimée comme une phase souhaitée avant l'extraction par solvant car elle permet d'économiser le solvant en agglomérant le biosurfactant au fond.

Allons d'un pH = 7 jusqu'au pH = 10 une perte presque négligeable de la tension de surface de l'ordre de 2 m N/m est notée. En effet, le pH n'a pas altéré les propriétés de biosurfactant dans cette gamme du pH.

En comparant les résultats obtenus avec ceux trouvées par Eddouaouda [25] et Luna et al. [61], le biosurfactant étudié a une résistance remarquable dans un intervalle de pH entre 6 et 10. Donc, ce type de biosurfactant est demandé en agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

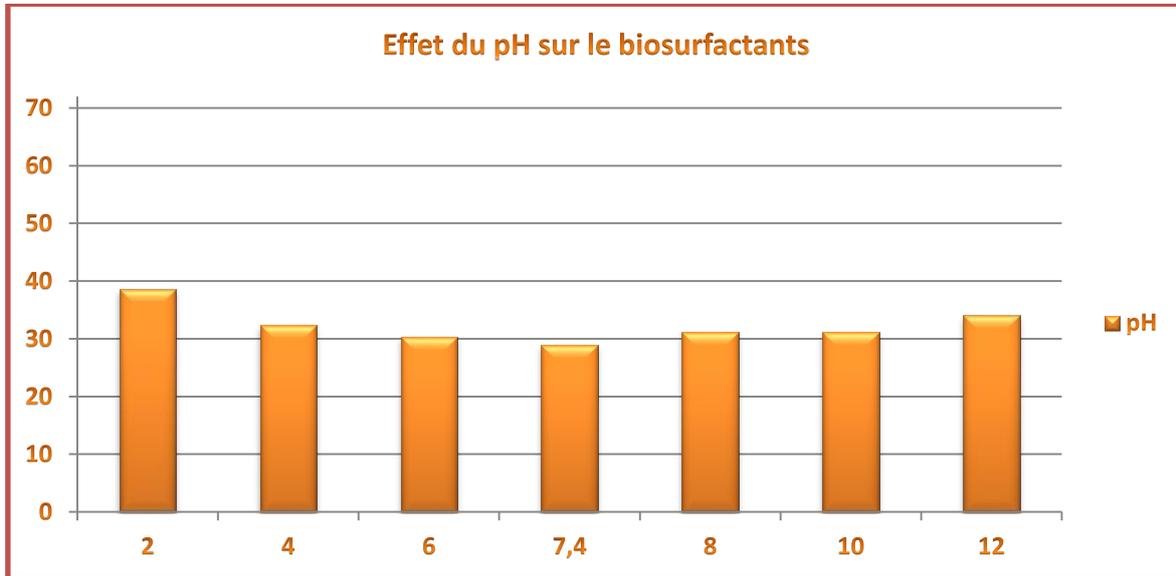
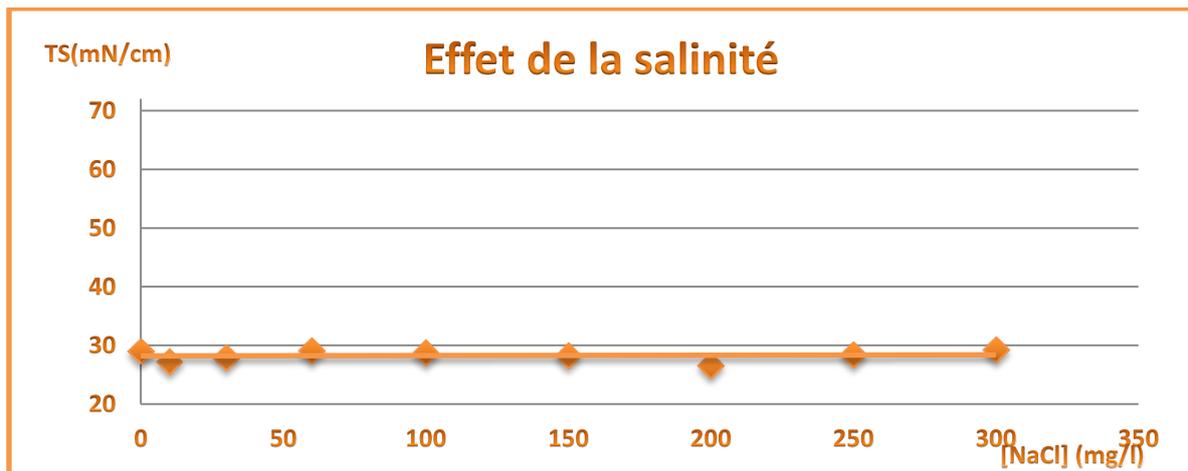


Figure 3.4 : Effet de la variation de pH sur la stabilité chimique de biosurfactant.

### 3.3.3.2 Effet de la salinité :

L'activité de biosurfactant est évaluée par la mesure de la tension de surface lors du changement de la concentration en sel, ce qui indique une stabilité parfaite sur une large plage de concentration (entre 0 et 300 g/L) en NaCl traduite par l'efficacité de ce dernier en présence d'ions monovalents  $\text{Na}^+$ .

La TS atteindra son seuil à  $[\text{NaCl}] = 300 \text{ g/L}$  avec une valeur de 29,3 mN/m et une valeur minimale de 26,6 mN/m à 200 g/L. Par conséquent, le Bs de la S13 est totalement indépendant de la salinité. (Figure. 3.5)



**Figure 3.5 : Effet de la salinité sur les propriétés chimiques de biosurfactant.**

D'après les résultats discutés précédemment, le biosurfactant produit par la souche S13 a un intérêt environnemental comme la dépollution d'eau de mer et la bioremédiation ainsi que l'habilité d'être applicable dans différents secteurs industriels [61,3,4].

### 3.3.4 Activité biologique :

#### 3.3.4.1 L'activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne de biosurfactant de la souche S13 a été testée sur des souches bactériennes Gram –, Gram + et une levure. Les résultats du tableau 3.3 indiquent que cette biomolécule a une activité variant de faible à forte intensité dont les souches *Agrobacterium tumefaciens* et *Enterobacter* sp. subissent une faible activité (un diamètre de 12 et 11 mm, respectivement). Une activité moyenne est remarquée envers *Escherichia coli* et *Candida albicans*. Un halo de 23 mm de diamètre est noté avec la souche *Enterococcus faecium* ce qui prouve une forte activité par rapport aux autres. D'un autre côté des résultats négatifs ont été enregistrés avec *Salmonella enterica* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Lang et Philip[60] disent que certains nombres de biosurfactants présentent une activité antimicrobienne, tels que les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* et les lipopéptides de *B. subtilis*. Rufino et al. ont également testé l'activité antimicrobienne d'un biosurfactant pur isolé de *C. lipolytica* UCP 0988 et des résultats positifs ont été trouvés. Par contre, le biosurfactant produit par *C. sphaerica* UCP 0995 n'a démontré aucune activité antimicrobienne contre les souches testées [60].

Le rôle et les multiples applications des biosurfactants ont fait l'objet d'intenses recherches dans le domaine médical et thérapeutique.

**Tableau 3.3 : Activité antimicrobienne de biosurfactant contre sept souches ATCC.**

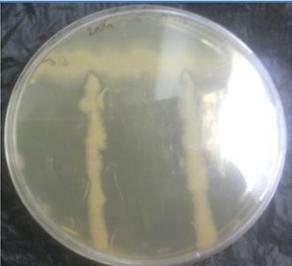
Souches ATCC	Gram	Diamètre (mm)	Résultat
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC Numéro	-	12	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC Numéro	-	16	++
<i>Enterobacter</i> sp. Numéro	-	11	+
<i>Enterococcus faecium</i> Numéro	+	23	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> ATCC Numéro	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC Numéro	Levure	14	++

**3.3.4.2 Activité de croissance :**

Dans le but de justifier la possibilité d'utiliser le biosurfactant produit par la souche S13 pour la dépollution des sites contaminés par les hydrocarbures ou ses résidus, nous avons testé la croissance de quelques souches hydrocarbonoclastes en présence de la souche productrice de la biomolécule.

Un effet synergétique est remarquable traduit par un indice de croissance de l'ordre de 100% pour les souches ING, 3'R et K2E et donc aucun effet inhibiteur est appliqué contre ces dernières.

**Tableau 3.4 : Effet de la souche S13 sur la croissance des bactéries hydrocarbonoclastes.**

Bactérie hydrocarbonoclaste	ING	3'R	K2E
résultats	+++	+++	+++
photos			

### 3.3.4.3 Activité antioxydante :

L'activité antioxydante d'échantillon testé *vis-à-vis* le radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne d'un passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Les résultats obtenus révèlent que le biosurfactant possède une activité anti-radicalaire.

La vitamine C est utilisée comme antioxydant de référence (témoin positif) et possède une activité de l'ordre de 96,79% d'après Koffi et al. [82].

Le biosurfactant présente un fort potentiel antioxydant dont la valeur approximative est 91% traduit par l'apparition d'une couleur jaune due à une recombinaison des radicaux DPPH'.

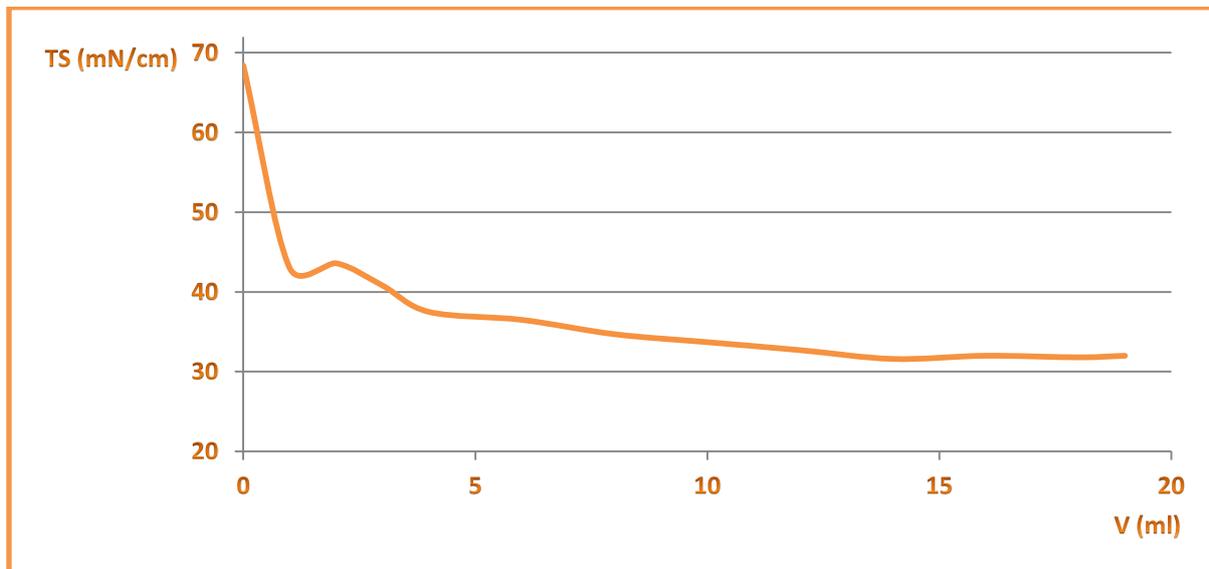
**Tableau 3.5 : pourcentage de l'activité antioxydante de biosurfactant.**

Tube	Le blanc	Vitamine C	Echantillon 1	Echantillon 2
DO à 517	<b>0,098</b>	-	<b>1,15</b>	<b>1,16</b>
I%	-	<b>96,79</b>	<b>91,47</b>	<b>91,55</b>

De ce fait le grand bénéfice qu'offre notre biosurfactant dans le domaine pharmaceutique et alimentaire ne peut être négligeable.

### 3.3.5 La concentration micellaire critique :

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3.6.



**Figure 3.6: Détermination de la CMC de biosurfactant de la souche s13.**

Le biosurfactant de la souche S13 a décrit une tension superficielle minimale inférieure à celle de *C. antarctica* (35 mN / m) et de *Y. lipolytica* (50 mN / m) [61, 05].

Le biosurfactant produit par *C. lipolytica* UCP0992a montré une valeur de CMC inférieure à celle d'autres biosurfactants issus de levures décrites dans la littérature, avec des valeurs de 2,5% trouvées pour les biosurfactants de *C. lipolytica* et *Candida glabrata*, et de 0,6% pour le biosurfactant de *C. antarctica*.

Selon Rufino et al. [5] les propriétés tensioactives du biosurfactant dépendent principalement de sa capacité à réduire les tensions superficielles et interfaciales, la valeur de la CMC et la formation d'une émulsion stable. L'aptitude à réduire la tension superficielle dépend de la concentration spécifique du composé tensioactif, c'est-à-dire de la CMC, définie comme étant la concentration minimale de tensioactif requise pour obtenir une réduction maximale de la tension superficielle de l'eau et initier la formation de micelles. Les tensioactifs efficaces ont de très faibles valeurs de CMC, c'est-à-dire qu'il faut moins de tensioactif pour diminuer la tension superficielle. Les tensions superficielles par rapport aux concentrations isolées de biosurfactants ont été tracées à la Figure 3.7. La tension superficielle de l'eau a diminué progressivement avec l'augmentation de la concentration en biosurfactants de 68 mN.m<sup>-1</sup> à 32 mN.m<sup>-1</sup>, avec un volume de surnageant de 14 ml, depuis elle reste constante.

### 3.4 Caractérisation biochimique et structurale du biosurfactant :

#### 3.4.1 Taux de protéine (méthode de Biuret) :

Nous avons constaté que la teneur en protéine du tube 01 (0.24 mol/L) qui présente celle de biosurfactant est plus forte que la teneur du tube 02 (0.02mol/L).

**Tableau 3.6 : DO et teneur en protéine correspondante de biosurfactant et le surnageant.**

N° Tube	Le blanc	1	2
Surnageant (ml)	0	2	2
Bs	0	+	-
[Protéine] (mol/L)	-	0.24	0.02

La biosurfactant lipopeptidique de la souche *Staphylococcus haemolyticus* 1E est composé de 7,21 % de protéine [25], Le biosurfactant produit par *B. megaterium* a été classé en tant que glycolipide avec une combinaison glucidique et lipidique de 28: 70% et le glycolipide isolé de *C. kutscheri* est un mélange d'hydrates de carbone, de lipides et de protéines associé respectivement à 40: 27: 29%.

#### 3.4.2 Caractérisation structurale par FTIR (Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) :

L'analyse qualitative par spectres d'absorption FTIR de l'extrait organique de substances actives de surface de la souche S13 indique que la structure obtenue est sortie d'un

glycolipide. Cette analyse a permis d'identifier la totalité des bandes d'absorption présentes dans un spectre d'infrarouge et de prédire les constituants concernés :

- ✓ La bande  $3378\text{ cm}^{-1}$  : est une bande de vibration ou de fonction correspondant à un alcool ou un ose (ex: glucose).
- ✓ La bande  $3008\text{ cm}^{-1}$  : est un faible pic correspond de la vibration de la liaison C-H d'un alcène (C = C-H).
- ✓ L'ensemble des pics localisés entre  $2978\text{ cm}^{-1}$  et  $2852\text{ cm}^{-1}$  est attribué aux vibrations des liaisons C-H des groupements  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ .
- ✓ Un empilement localisé à  $1745\text{ cm}^{-1}$  spécifique de la fonction ester (C=O).
- ✓ L'ensemble des pics situés au-dessous de la valeur  $1500\text{ cm}^{-1}$  correspond à la zone d'empreinte digitale de la molécule utilisable pour les cas spécifiques d'où la présence des groupements qui contient le Chlore, le Brome, l'Iode ou bien le soufre.

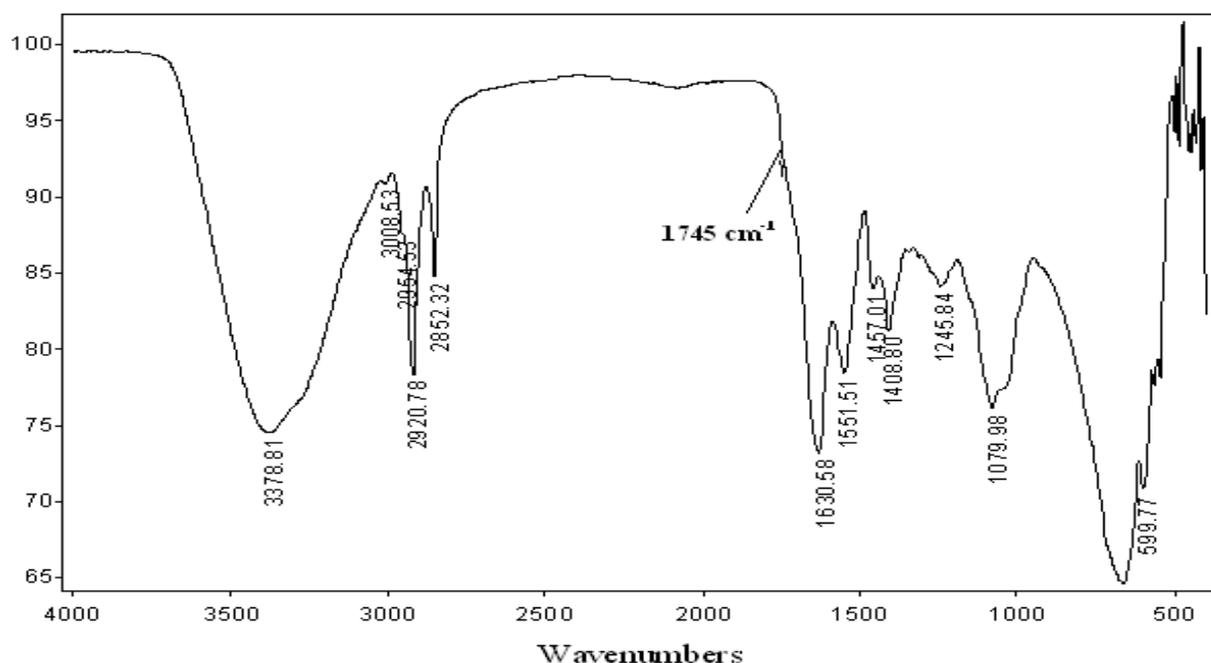


Figure 3.7 : spectre FTIR de biosurfactant produit par la souche S13 avec l'huile d'olive.

### 3.5 La phytotoxicité du biosurfactant :

L'utilisation des plantes pour tester la toxicité offre plusieurs avantages dont le faible coût de maintenance et la rapidité des résultats avec une évaluation spécifique des avantages potentiels des composés écotoxique dans l'environnement terrestre sont les plus marqués [06]. Dans cette présente étude, l'index de germination qui combine les mesures de germination relatives des grains et d'allongement relatif des racines a été utilisé pour évaluer la toxicité de notre biosurfactant sur le blé.

Selon Tiquia et al. [80], la valeur de 80% de l'index de germination est utilisé comme un indicateur d'absence de la phytotoxicité [80]. En se basant sur cette information, les valeurs de GI de l'ordre de 107,99% et 97,84% correspondant respectivement aux concentrations 0,3

et 0,6 g/L en biosurfactant indiquent l'absence de la toxicité. Il était également possible de visualiser les feuilles et l'allongement des racines secondaires pour toutes les concentrations précitées ce qui est similaire aux résultats observés par Luna et al. [61] pour le biosurfactant de *C. sphaerica*.

Suivant le chemin de Deepansh Sharma et al. [63], nous avons utilisé un tensioactif synthétique (SDS) comme un témoin négatif pour la comparaison ce qui nous a permis de confirmer l'hypotoxicité du biosurfactant par rapport à son homologue synthétique.

Cette propriété, associée à la compatibilité environnementale élevée de ces molécules microbiennes, peut conduire à l'application efficace du biosurfactant de la S13 dans l'agriculture, en réduisant l'utilisation de produits agrochimiques [06].

**Tableau 3.7 : Résultats du test de la phytotoxicité de biosurfactant.**

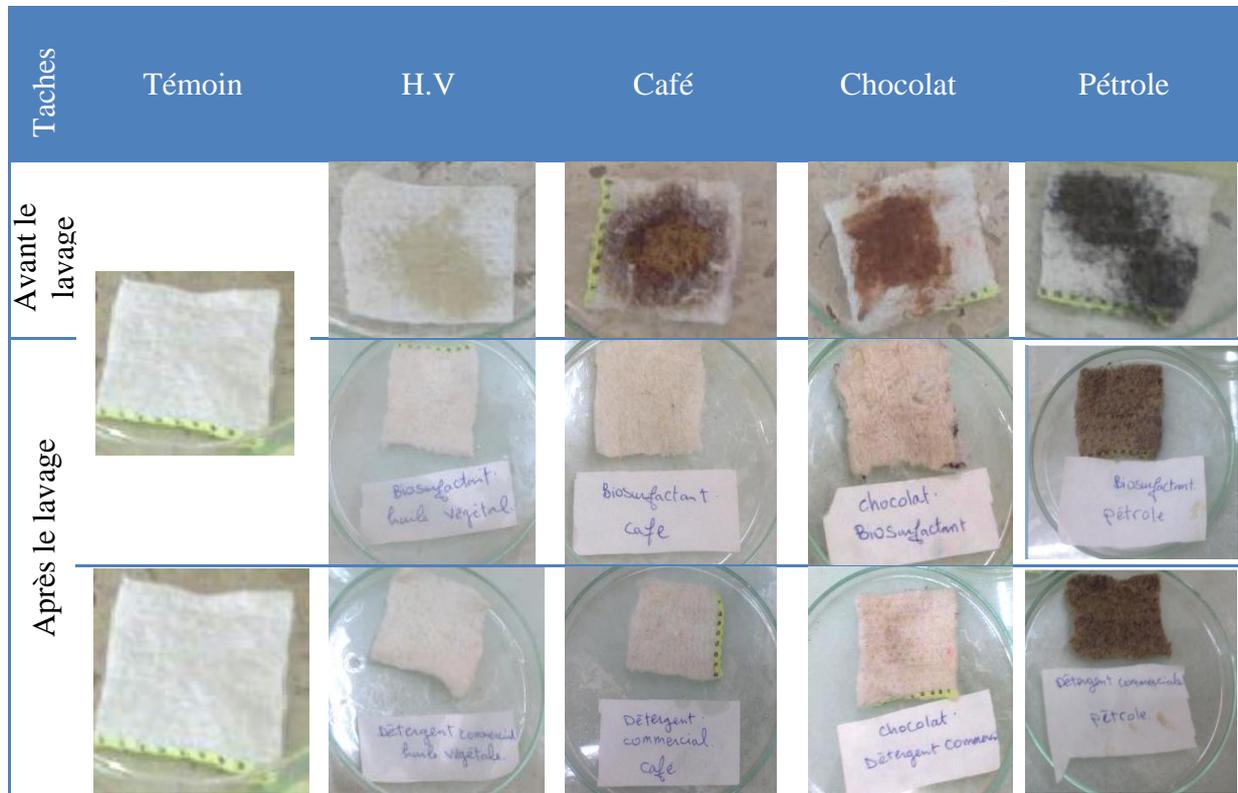
Substance à testé	H <sub>2</sub> O	Biosurfactant					SDS	
[C] (g/l)	/	0.3	0.6	1	1.5	1	10	
Nombre de blé germiné	08	05	05	04	05	6	0	
Longueur Moyen des racines	3,16	5,46	4,95	1,20	1,46	0,70	0	
Germination relative des grains (%)	100	62,50	62,50	50	62,50	75	0	
Allongement relatif des racines (%)	100	172,79	156,64	37,97	46,20	22,15	0	
GI(%)	100	107,99	97,84	18,98	28,80	16,61	0	
								

### 3.6 Application industrielle :

#### 3.6.1 Test de performance de lavage (industrie de détergent) :

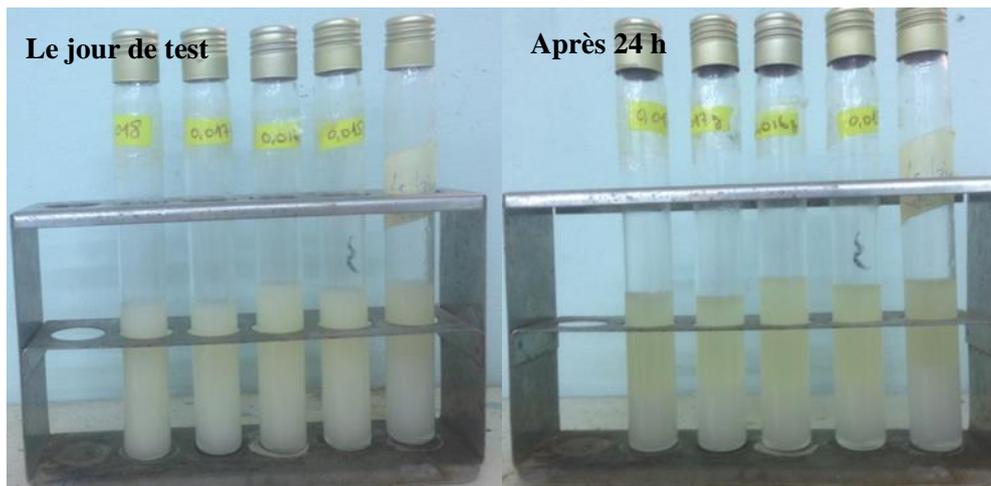
En comparant les résultats obtenus après l'utilisation d'un détergent commercial en parallèle avec ceux obtenus suite à l'utilisation de biosurfactant, on peut clairement conclure que le biosurfactant à une concentration sept fois inférieure a pu rivaliser son homologue synthétique avec un effet presque similaire.

**Tableau 3.8** : détermination de l'efficacité de biosurfactant vis-à-vis le détergent commercial.



### 3.6.2 Test de pouvoir émulsifiant (industrie agroalimentaire) :

Ce test est réalisé pour confirmer l'habilité du biosurfactant à la stabilisation d'une émulsion composée de 70% d'huile végétale, 30% de vinaigre et une pincée de sel (vinaigrette traditionnelle). Après 24h de repos nous avons remarqué une séparation des phases, ce qui indique que ces concentrations ne sont pas suffisantes pour l'émulsification de ce mélange. Il est donc souhaitable de tester des doses plus fortes que ceux cités auparavant pour confirmer l'utilité de cette biomolécule comme étant un émulsifiant.



**Figure 3.8 : utilisation de biosurfactant comme étant un émulsifiant dans la préparation d'une vinaigrette traditionnelle.**

### **Conclusion :**

Le biosurfactant produit d'isolat bactérien sélectionné à partir d'algues brunes d'origine marine a montré de très bonnes activités tensioactives et émulsifiantes. D'après le test de déplacement d'huile et le test d'émulsification (Cooper et Goldenberg) [79] de biosurfactant une activité émulsifiante élevée est prouvée. Les propriétés antimicrobiennes des biosurfactants ont été largement rapportées. Bien que leurs potentiels antimicrobiens ont été testés pour leurs actions contre une batterie d'organismes de test pathogènes. Nos résultats illustrent l'activité antimicrobienne et peuvent donc être utiles dans de nombreuses utilisations domestiques et commerciales. Le biosurfactant isolé a montré sélectivement une activité contre les souches bactériennes Gram positives et Gram négatives. Cela contraste assez avec les rapports antérieurs sur les actions antimicrobiennes des biosurfactants, où les biosurfactants lipopeptidiques de *B. subtilis* et les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* et les lipopéptides de seraient principalement actifs contre les bactéries à Gram positif et Gram négatif. La cinétique de croissance de l'isolat producteur de biosurfactants était généralement comprise entre 24 et 48 heures, avec une bonne production de biosurfactants au cours de cette période avec un rendement de 1,13 g/L. La caractérisation chimique du biosurfactant produit à l'aide de FTIR a montré que le pic obtenu par cette analyse correspond généralement aux groupes fonctionnels de la classe des glycolipides. L'estimation des protéines à l'aide du test de Biuret [75,76] a montré la teneur en protéines du biosurfactant extrait. La production de biosurfactants utilisant de l'huile d'olive comme source de carbone et d'énergie a montré une meilleure production de biosurfactants. La tension superficielle de cette fraction de la souche

S13 s'est avérée être basse ( $29 \text{ mN.m}^{-1}$ ), ce qui indique sa puissante propriété réductrice de la tension superficielle.

D'autre part, la phytotoxicité n'a montré aucun effet toxique en se basant sur les résultats obtenus par Tiquia et al. [80] et Luna et al. [61], cette propriété, associée à la compatibilité environnementale élevée de ces molécules microbiennes, peut conduire à l'application efficace du biosurfactant de la S13 dans l'agriculture, en réduisant l'utilisation de produits agrochimiques et la bioremédiation des sols et des eaux. Ainsi, il possède une propriété antioxydante importante ce qu'il permet l'applicabilité dans le secteur industriel (cosmétique et agroalimentaire). Puis, la S13 a un effet synergétique sur la croissance les bactéries hydrocarbonoclastes testées et donc une application dans le domaine de la dépollution des sols ou la bioremédiation est souhaitable.

En vu d'application industrielle, le biosurfactant a pu rivaliser son homologue synthétique avec un effet presque similaire sur les taches testées.

Par conséquence, la souche bactérienne S13 et son biosurfactant ont un intérêt biotechnologique dans plusieurs domaines notamment le domaine : pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, agriculture et environnemental.

## CONCLUSION GENERALE

De nos jours, le besoin quotidien en tensioactifs augmente de plus en plus jusqu'à devenir parfois une nécessité.

Même si les tensioactifs synthétiques possèdent beaucoup d'avantages facilitant ainsi la vie humaine, les conséquences sur l'écosystème sont multiples et handicapantes.

En effet, les tensioactifs faits de composants chimiques ne sont pas biodégradables. Autrement dit, ils ne se désintègrent pas entièrement ou quasiment pas après usage. Ils contribuent donc pour une grande part à une pollution massive et continue de nos cours d'eau, de nos terres, etc. Nous ne le savons peut-être pas, mais ces produits sont responsables de la mort et la disparition de certaines espèces de poisson ou de cétacés. Dans le cas où ces derniers ne sont pas à 80 % biodégradables, ils polluent l'environnement et peuvent subsister pendant des années. Il est donc impératif que nous pensions tous à opter pour des substances biodégradables permettant la préservation de notre environnement.

Notre étude a été menée sur l'habilité d'une souche provenant de la côte méditerranéenne algérienne à produire un tensioactif et de le caractériser en vue d'une application dans des domaines déférents.

Dans un premier temps, un milieu minimum contenant 1% (v/v) d'huile d'olive a été utilisé comme un milieu de production pour la souche S13. Un bon résultat a été approuvé et traduit par un halo de DDP de 7,3 cm et une tension de surface réduite jusqu'à  $29\text{mN.m}^{-1}$ .

L'extraction est optimisée en utilisant deux solvants et l'acétate d'éthyle était le plus performant avec un rendement de  $1,13\text{g.L}^{-1}$  ce qui nous permet de passer à l'échelle industrielle.

Par la suite, la caractérisation physicochimique et antimicrobienne ont montré que le biosurfactant a un intérêt dans le domaine environnemental et industriel *vis-à-vis* son pouvoir émulsifiant élevé (plus de 50%), sa stabilité thermique ( $4^{\circ}\text{C}$  -  $55^{\circ}\text{C}$ ) et chimique notamment en milieu fortement salin ( $300\text{mg.L}^{-1}$ ), de plus, il présente une activité antimicrobienne contre certaines bactéries pathogènes.

En outre, l'analyse de FTIR et la méthode de biuret montrent que le biosurfactant est un glycolipide avec une concentration de 0,24 mol/L en protéine. Par ailleurs, l'évaluation de la phytotoxicité sur les grains de blé de ce dernier n'a montré aucune toxicité à des concentrations jusqu'à  $600\text{mg.L}^{-1}$

Toutefois, une application industrielle est réalisée, la performance du glycolipide est approuvée par rapport à un tensioactif synthétique.

En se basant sur la présente étude, nous pouvons conclure que la souche S13, ainsi que son biosurfactant demeurent d'intérêts biotechnologiques pour divers types d'applications, notamment, la bioremédiation des sols, la dépollution d'eau de mer et les sédiments marins, la cosmétique, la médecine, l'agriculture et le domaine agroalimentaire.

Avant de terminer, il est important d'ouvrir les fenêtres sur les perspectives suivantes :

- Utilisation d'autres techniques d'analyse (LC-MS, RMN...) pour confirmer la structure de biosurfactant issu de la souche S13.
- Détermination de la valeur de la CMC avec une méthode standard.
- évaluation de l'activité antimicrobienne avec la méthode de microdilution pour déterminer la CMI et la CMB.
- Evaluation de la toxicité animale afin de garantir l'utilisation à l'échelle agroalimentaire, médicale, cosmétique et pharmaceutique.
- Optimiser le milieu de production pour minimiser le coût de la production.
- Utiliser un milieu de composition purement naturelles, renouvelables et pour quoi pas valorisables.
- L'application de biosurfactant dans l'agriculture et la bioremédiation à l'échelle industrielle,
- Fabrication de biosurfactant de la S13 à grande échelle et le commercialiser.

## Les références :

- [01] : Huiling LU.2016.Contribution à l'étude des relations structure-propriétés de molécules amphiphiles à tête sucre.Université de Technologie Compiègne.
- [02] : Camille Ludot.2013.Développement de méthodologies de synthèse de tensioactifs glycosidiques à partir de biomasse lignocellulosique.Université de reims champagne-ardenne.
- [03] : I. M. Banat á R. S. Makkar á S. S. Cameotra. 2000.Potential commercial applications of microbial surfactants.Appl Microbiol Biotechnol (2000) 53: 495±508.
- [04] : Desai, J. D., and I. M. Banat. 1997. Microbial production of surfactants and the commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:47–64.
- [05] : Raquel Diniz Rufino, Juliana Moura de Luna, Galba Maria de Campos Takaki, Leonie Asfora Sarubbo.2014.Characterization and properties of the biosurfactant produced by Candida lipolytica UCP 0988. Electronic Journal of Biotechnology 17 (2014) 34–38.
- [06] : Hélvia W. C. Araújo, Rosileide F. S. Andrade, Dayana Montero-Rodríguez, Daylin Rubio-Ribeaux, Carlos A. Alves da Silva and Galba M. Campos-Takaki. 2019. Sustainable biosurfactant produced by Serratia marcescens UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. Microb Cell Fact, 18:2.
- [07] : Fakruddin Md. 2012.Biosurfactant: Production and Application.J Pet Environ Biotechnol, 3:4, DOI: 10.4172/2157-7463.1000124.
- [08] : Dorra HENTATI. 2018. Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie.Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de MONTPELLIER.
- [09]: MAYOT. E. 2007. «Monobactames Et Triazoles Fluorocarbones Amphiphiles : Vers Des Systemes Catanioniques A Proprietes Multiples». Université Henri Poincaré.
- [10] : FERHAT SAMIRA.2012.La production de biosurfactants par des souches Brevibacterium et Ochrobactrum isolées localement a partir d'un sol contamine par le petrole brut.
- [11] : MAMERI YAZID.2010. Phototransformation de tensioactif anionique induite par un oxyhydroxyde de fer(iii) (goethite) en solution aqueuse. Université mentouri-constantine.
- [12] : OTMANI HADJIRA.2012.propriétés physico-chimique d'un system micellaire mixte tensioactif non ionique fluore/cationique.
- [13] : HADJ MOHAMMED AHMED.2013. Etude des propriétés thermodynamique d'un surfactant. Université ABOU-BAKR BELKAID- Tlemcen.
- [14] : Mémoire : GHAZOULI. CHAHRAZED.2010. Interactions des poly-électrolytes complexes tensioactifs.

- [15] : ZELMAT CHERIFA.2008. Micellisation d'un système modèle tensioactif mixte cationique/ non ionique.
- [16] : YETTOU MANALE. 2018. Extraction du lanthane d'une solution synthétique contenant des métaux de transition, optimisation du procédé.
- [17] : BENHAMZA Med EL HOCINE. Intitulé Nouvelles formulations pour peintures, résines et adjuvants à base de tensioactifs biodégradables.
- [18]: Shekhar, S., Sundaramanickam, A., Balasubramanian, T. 2015. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(14), 1522-1554.
- [19]: ABDEMALEK Ilham. 2017.
- [20]: SEFROU ZEYNEB. 2012. Etude de la formulation d'émulsion dans l'extraction du plomb(II) par membrane liquide.
- [21] : RONDEL CAROLINE. 2009. L'université de Toulouse, France.
- [22] : NABIL MOULOUD BABI. 2016. Etude des propriétés émulsifiantes de tensioactifs anioniques pour une application en cosmétique. Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou.
- [23] : SARDI AMINA. 2009. Université d'Oran.
- [24] : <https://www.esthetiquecosmetique.fr/cours-esthetique>.
- [25]: Kamel EDDOUAOUUDA.2012. Etude du potentiel biodegradatif de souches isolées du sol de Hassi Messaoud contaminé par du pétrole : criblage, biodegradation de HAP et production de biosurfactant. Université SAAD DAHLAB de BLIDA.
- [26]: Rupshikha Patowary & Kaustuvmani Patowary & Mohan Chandra Kalita & Suresh Deka.2016. Utilization of Paneer Whey Waste for Cost-Effective Production of Rhamnolipid Biosurfactant. *Appl Biochem Biotechnol* (2016) 180:383–399. DOI 10.1007/s12010-016-2105-9.
- [27]: Sandra Hewald, Katharina Josephs, and Michael Böcker. 2005. Genetic Analysis of Biosurfactant Production in *Ustilago maydis*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, June 2005, p. 3033–3040.
- [28]: S. Vijayakumar and V. Saravanan. 2015. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology* 10 (5): 181-192.
- [29]: Milena G. Rikalović<sup>1</sup>, Gordana Gojgić-cvijović, Miroslav M. Vrvic and Ivanka Karadžić.2012. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain. *J. Serb. Chem. Soc.* 77 (1) 27–42 (2012) JSCS–4246.
- [30] : Ibrahim M. Banat & Andrea Franzetti & Isabella Gandolfi & Giuseppina Bestetti & Maria G. Martinotti & Letizia Fracchia & Thomas J. Smyth & Roger Marchant.2010.

Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) 87:427–444.

[31] : Inge N. A. Van Bogaert & Karen Saerens & Cassandra De Muynck & Dirk Develter & Wim Soetaert & Erick J. Vandamme. **2007**. Microbial production and application of sophorolipids. *Appl Microbiol Biotechnol* (2007) 76:23–34.

[32]: Livre : Ekaterina Kulakovskaya Tatiana Kulakovskaya. 2014. Chapitre 1 - Structure et occurrence des glycolipides extracellulaires de levure p(1-13).livre :Glycolipides .Extracellulaires de Levures. Biodiversité, biochimie et perspectives. ScienceDirect

[33]: S.F. Vaughn, R.W. Behle, C.D. Skory , C.P. Kurtzman, N.P.J. Price. **2014**. Utilization of sophorolipids as biosurfactants for postemergence herbicides. *Crop Protection* 59 (2014) 29 e 34.

[34]: Ashis K. Mukherjee and Kishore Das. **2010**. Microbial Surfactants and Their Potential Applications .Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.

[35]: Jin-Feng Liu, Serge Maurice Mbadinga, Shi-Zhong Yang, Ji-Dong Gu and Bo-Zhong Mu. **2015**. Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 4814-4837; doi: 10. 3390 / ijms16034814.

[36]: Ian W. Hamley. **2015**. Lipopeptides: de l'autoassemblage à la bioactivité . Royal society of chemistry, 51, **8574-8583**.

[37] : Sangkeun Son , Sung-Kyun Ko, Mina Jang, Jong Won Kim , Gil Soo Kim ,Jae Kyoung Lee , Eun Soo Jeon 1, Yushi Futamura , In-Ja Ryoo , Jung-Sook Lee ,Hyuncheol Oh , Young-Soo Hong, Bo Yeon Kim , Shunji Takahashi , Hiroyuki Osada,Jae-Hyuk Jang , and Jong Seog Ahn .**2016**. New Cyclic Lipopeptides of the Iturin Class Produced by Saltern-Derived *Bacillus* sp.**14, 72**.

[38]: Magali Deleu,\* Michel Paquot,\* and Tommy Nylandery. April **2008**. Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*, on Model Biomembranes. *Biophysical Journal*, **2667–2679**.

[39]: Nongnuch Vanittanakom and Wolfgang Loeffler. **1986**. Fengycin - a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* f-29-3. *The journal of antibiotics.* 39 (7): 888-901

[40]: Khem Raj Meena, Abhishek Sharma and Shamsheer S Kanwar. **2017**. Microbial Lipopeptides and their Medical Applications. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*.

[41]: Arpita Roy. **2017**. Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. **2090-4541**.

[42] : Edward Gakpe, Pattanathu K.S.M. Rahman and A.A. Mohamed Hatha.**2007**. Microbial biosurfactants. *JOURNAL OF MARINE AND ATMOSPHERIC RESEARCH*. Res. 1-17.

- [43]: Danyelle Khadydja F. Santos, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna , Valdemir A. Santos and Leonie A. Sarubbo .2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. International Journal of Molecular Sciences. 17, 401; doi: 10.3390/ijms17030401.
- [44]: Eric DÉZIEL.1996.Étude de la production de biosurfactants par des souches bactériennes métabolisant les Hydrocarbures aromatiques polycycliques.
- [45]: Maneerat, S. 2005.Biosurfactants from marine microorganisms. Song klana karin Journal of Science Technology. 27(6): 1263-1272.
- [46]:[http://santé\\_medicine.journaldesfemmes.fr/faq/38590\\_antimicrobienne\\_definition](http://santé_medicine.journaldesfemmes.fr/faq/38590_antimicrobienne_definition).
- [47]: Bouziaine Errahmani Leila et DJEBOURZineb.2015/2016.Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master: L'activité antioxydante et antibactérienne d'huile essentielle d'*Origanum vulgare*L cultivé.
- [48]: Racha Tepsorn.2009. Antimicrobial Activity of Thai Traditional Medicinal Plants Extract Incorporated Alginate-Tapioca Starch Based Edible Films against Food Related Bacteria Including Foodborne Pathogens. University of Hohenheim Pattani, Thailand.
- [49]: Thèse: Randrianarivelo Roger.2010.Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « *cinnamosma fragrans* », alternative aux antibiotiques en crevetticulture. Université d'Antananarivo.
- [50]: Jiyeon Kim. 2014. Isolation and Characterization of a Biosurfactant producing Bacterium Bacillus pumilus IJ-1 from Contaminated Crude Oil Collected in Taean, Korea. J Korean Soc Appl Biol Chem (2014) 57, 5–14 DOI 10.1007/s13765-013-4236-9.
- [51]: Cristina Popovici , Ilonka Saykova , Bartek Tylkowski .2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de génie industriel, 4, 25-39.
- [52]: Molyneux P. 2004.The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity. Songklanakarin J. Sci. Technol, 26(2) : 211-219.
- [53]: K.K Gautam and V.K Tyagi. 2006. Microbial Surfactants. journal of oleo science, Vol. 55, No. 4, 155-166.
- [54]: Cooper,D.G. ; Paddock,D.A. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola* . Appl. Environ. Microbiol. 47, 173–176.
- [55]: M., D.J.D.e.B.I., Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997. 1( 61): p. 47-64
- [56]: Parra J.L ,Guinea.J ,Manresa.M.A ,Robert.M , Mercade.M.E , Comellesand.F ,Bosch.M.P.1989.Chemical characteriation and physicochemicalbehavior of biosurfactants.J.Am chem. Soc.vol 66,p141- 145.

- [57]: Kang, S.W.; Kim, Y.B.; Shin, J.D.; Kim, E.K. **2010**. "Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid", Appl. Biochem. Biotechnol Journal, V.160, 780–790.
- [58] : Singh, P., Patil, Y., Rale, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. Journal of Applied Microbiology, 1, 12.
- [59]: Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., Sarubbo, L. **2016**. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. International Journal of Molecular Sciences, 17(3), 401.
- [60] : Humberto Bezerra de Souza Sobrinho, Juliana Moura de Luna, Raquel Diniz Rufino, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Léonie Asfora Sarubbo. **2013**. Evaluation de la toxicité d'un biosurfactant issu de *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivé avec des résidus industriels dans un bioréacteur. Journal électronique de biotechnologie, 0717-3458. DOI: 10.2225 / vol16-issue4-fulltext-4
- [61] : Juliana M. Luna, Raquel D. Rufino, Leonie A. Sarubbo, Galba Maria Campos-Takakia. **2013**. Characterisation, surface properties and biological Activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 102 (2013) 202– 209.
- [62]: Khamili Souad. **2008**. Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelque champ pétrolier du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites.
- [63]: Deepansh Sharma, Baljeet Singh Saharan, Nikhil Chauhan, Anshul Bansal, and Suresh Procha. **2014**. Production and Structural Characterization of *Lactobacillus helveticus* Derived Biosurfactan. The Scientific World Journal, 493548.
- [64]: A. BENSAKHRIA. Chapitre II : Toxicité aigue.
- [65]: Professeur Toumi. **2010/2011**. Pharmacologie. www.dzpharm.com.
- [66]: Dr. Benhamida. **2017/2018**. Polycopie de pharmacologie. Université Blida, 1a faculté de médecine, département de pharmacie.
- [67] : A. BENSAKHRIA. Chapitre III : Toxicité chronique.
- [68]: Patrick Sorgeloos, Claire Remiche-Van Der Wielen, Guido Persoone. **1978**. Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 2, Issues 3–4, Décembre, pages 249-255.
- [69] : www.perrin33.com>genie-ferment.
- [70] : www.e-sante.Futura-science.com

- [71]: Morikawa M, Daido H, Takao T, Satoru M, Shimonishi Y, Imanaka T, **2000**. A new lipopeptide biosurfactants produced by arthrobactersp.strain MIS38. *Journal of bacteriology*, vol,175,p:6459-6466.
- [72]: Sorkhoh, N. A., Ghannoum, M. A., Ibrahim, A. S., Stretton, R. J., Radwan, S. S., —Crude Oil and Hydrocarbon-Degrading Strains of Rhodococcus rhodochrous Isolated from Soil Kuwaitl, *Marine Environments in Pollution Journal*, V. 65, (**1990**), 1-17.
- [73]: Amodu et al.(**2014**). Biosurfactants & emulsions, *BioResources* 9(2), 3508-3525.
- [74]: Cooper, D. G., Goldenberg, B. G., Surface active agents from two Bacillus speciesl, *Appl. Environ. Microbiol Journal*, V.53, (**1987**), 224-229.
- [75] :Gornall .**1949**. *J.Biol.Chem.*177, 751.
- [76]: Droguet.Sebastien.l-monsite. comparaison-méthode- de dosage des protéines dans de milieux.
- [77]: Fleming. I. **1989**. Spectroscopic methods inorganic chemistry.4<sup>th</sup>Ed: Mc Graw Hill book company, London,p264.
- [78]: Benmeddour T, Laouar H, Benabdi A.A, Brahimi S. **2015**. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of extracts from three species of the genus *allium*: *A. cepa* , *fistulosum* and *sativum* grown in agricultural area of doussen (wiliya of Biskra),pp.09.14
- [79]: A. Meddour, M. Yahia<sup>1</sup>, N. Benkiki<sup>1</sup>, A. Ayachi<sup>2</sup> .2013. Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparispinoso L. *Lebanese Science Journal*, Vol. 14, No. 1, 2013.
- [80] : S. M. Tiquia, N. F. Y. Tama et I. J. Hodgkis.1996. *Environmental Pollution*, Vol. 93, No. 3, pp. 249-256.
- [81] : R.Thavasi, S. Jayalakshmi and I.M. Banat. Biosurfactants from marine bacterial isolates. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* A. Méndez-Vilas (Ed.)
- [82] : Koffi Akessé Georges, Ahoua Angora Remi Constant, Ekou Tchirioua, Kone Mamidou Witabouna.**2018**. Activité antioxydante de quelques plantes utilisées dans la région de Tiassalé (Côte d'Ivoire) dans le maintien de la santé de la peau. *European Scientific Journal* October 2018 edition Vol.14, No.30 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431

# Annexes

## ANNEXE I

### Taux de protéine :

Pour déterminer la teneur en protéines présentes dans une solution quelconque "X" par la méthode de dosage dite du biuret, on utilise trois types de solution :

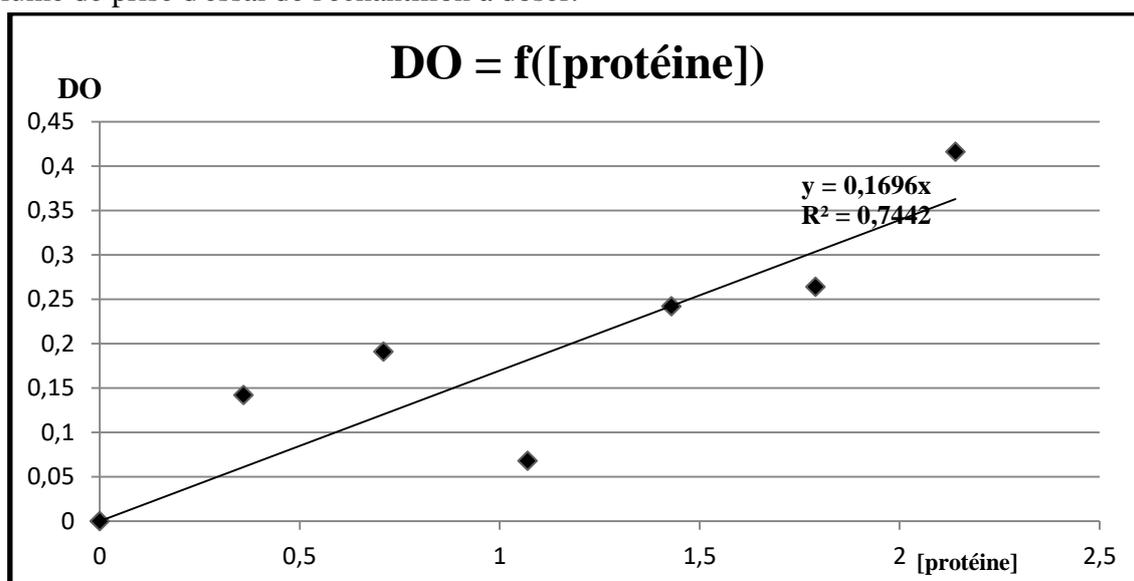
1. une solution de la protéine dont on veut déterminer la concentration.
2. une solution de concentration connue d'une protéine considérée comme une référence ou un standard par rapport à la protéine dont on veut déterminer la concentration.
3. une solution de réactif qui développe une coloration en réagissant avec des acides aminés spécifiques de ces protéines

La solution de concentration connue permet de constituer une gamme étalon en mesurant l'absorbance de ces dernières à 540 nm.

Le tableau ci-dessous regroupe les résultats obtenus :

N°tubes	01	02	03	04	05	06	07	08
DO à 540	0	0.142	0.191	0.068	0.242	0.4264	0.416	0.189
C <sub>2</sub> =[protéine] (mol /l)	0	0,36	0,71	1,07	1,43	1,79	2,14	x

Cette proportionnalité permet de déterminer la quantité de protéine contenue dans un volume de prise d'essai de l'échantillon à doser.



D'après le graphe et Par extrapolation on déduire la concentration de protéine.

**APPENDICE A**  
**VERRERIE ET CONSOMMABLES UTILISES**

Erlenmeyer de 250 ml, 500ml, 1000ml.
Fiole Jaugée de 50ml, 100ml, 1000ml,
Eprouvette graduées de 10ml, 20ml, 15ml, 25ml, 50ml,100ml, 250ml, 500ml,
Bécher de 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml.
Boites de Pétri en plastique (D=80mm, D=60mm).
Boites de pétri en verre (D=50mm, D=80mm).
Pipettes Pasteur.
Anse de platine.
Tubes à essai de 20ml.
Seringues .
Micropipettes (200 $\mu$ L ,1000 $\mu$ L ).
Ampoule à décanter de 250ml,500ml, 1000ml.
Ballon de 250ml,500ml,1000m,2000ml.
Barreau magnétique.
Coton cardé.
Papier Aluminium.
Papier Film.
Papier Filtre de Wattman 47 mm de diamètre.
Spatules.
Flacons en verre de200ml.
Entonnoirs.