

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI OUZOU

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master



Filière : Biologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

THEME

**Optimisation de l'effet de biosurfactant produit
par la souche *Pseudomonas* sp. sur la croissance de
*Lens culinaris***

Présenté par :

Soutenu le : 08 Novembre 2017

Melle Bouchali Thilleli

Melle Amireche Sylia

Jury :

Président : M^r OUELHADJ A.

Maitre de conférences A à l'UMMTO

Promoteur : M^r TAZDAIT D.

Maitre de conférences B à l'UMMTO

Examineur : M^r BOUAZZA B.

Maitre de conférences A à l'UMMTO

Promotion : 2016-2017

Remerciements

Tous d'abord, nous tenant à rendre grâce au bon DIEU tout puissant de nous avoir donné la force et le courage pour mener à terme notre travail.

Nous remercions chaleureusement notre encadreur et professeur Mr TAZDAIT.D, pour son soutien, sa patience, et de nous avoir accordé son temps si précieux.

Nous tenons aussi à remercier les membres du jury, Monsieur OUELHADJ. A., Maître de conférences A à l'UMMTO ; et monsieur BOUAZZA.B., Maître de conférences A à l'UMMTO, de nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Nous exprimons aussi nos profonds remerciements à madame TAZDAIT R.

Un remerciement très particulier à Mr CHERGUI.

Nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nous remercions particulièrement le docteur MAMOU ainsi que M^{lle} CHEKLATE, qui nous ont ouvert les portes du laboratoire au niveau de la faculté médecine de l'UMMTO, afin de réaliser certaines expériences.

Un merci très particulier au personnel du laboratoire de microbiologie du département BMC ainsi que le personnel de laboratoire de chimie pharmaceutique du département chimie de l'UMMTO.

Nous exprimons notre gratitude et notre reconnaissance pour l'aide fournie par le docteur ABDOU laboratoire de microbiologie du CHU T.O.

B. Thilleli et A. Sylia

Dédicace

Avec un cœur remplie de joie et de bonheur que je dédie ce modeste travail,

A mes chers parents BELKACEM et FATIHA qui m'ont soutenus et aimer, je leur dit merci et à travers ce modeste travail j'espère qu'ils trouveront là de quoi être fière de leur petite fille.

À mes beaux-parents SALEM et OURDIA qui m'ont accepté comme leur propre fille.

À mon mari qui m'a soutenu, et qui a cru en moi, même quand moi je n'y croyais plus.

À mon frère KOCIELA et sa fiancée CHEHRAZAD, ainsi que NOOR d'être toujours là pour moi.

À mes oncles et tantes qui m'ont toujours soutenus NORDINE, OUIZA, HOCINE, GHANIMA et à mes sœur : AMIRA, CYLIA, NORA, TAOUS, LAMIA, SARAH, SALMA.

À mes cousines et cousin : FETTA, SLIMEN, GHILES, SAMY, AISSA, DJAFAR.

J'aimerais rendre un hommage à mes défunts grands parents ALI, FATMA, et OUIZA.

*À mes amis KHALED et YUCEF
A ma chère binôme AMMIRECH SYLIA
A ma grande famille, grands et petits.*

Thilleli

Dédicace

Je rends d'abord grâce à DIEU, le tout puissant, pour pouvoir donné la force, le courage, la volonté, l'amour du savoir et surtout la patience pour pouvoir réaliser ce travail.

Je dédie ce mémoire :

*A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance.
A ma mère chérie SADIA et mon père adoré MOKRANE qui ont toujours été à mes côtés que je leur doit tout mes remerciements les plus profonde pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien et leurs sacrifices, je les remercier de m'avoir accompagné tout au long de mon parcours.*

Mes chères sœurs SOUKOURA et LILIA qui ont toujours cru à ma réussite.

A Mon adorable frère KOCEILA.

A Ma très chère NA LJOUHAR qui a été toujours à mes côtés et qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager.

A mes chères cousines et cousin.

A Mon très chère et adorable binôme THILLELI et sa précieuse famille.

A tout la famille AMIRAT.

*Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes
Remerciments*

*A ma grande famille, grands et petits.
A tout mes amis (es) et collègues de la promotion.
Ainsi qu'à toutes et tous, ceux qui étaient là pour moi, avec leur présence et appui.*

Sylia

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	I
Liste des figures	II
Liste des tableaux	III
Introduction générale.....	1

Partie I : Etude bibliographique

CHAPITRE I : Les biosurfactants

I-1- Généralités sur les biosurfactants	5
I-2- Définition du surfactant microbien ou biosurfactant.....	5
I-3- Structures générales des tensioactifs	6
I-4- Nature et classification des biosurfactants	7
I-5- Caractéristiques écologique des biosurfactants.....	9
I-6- Identification des biosurfactants.....	9
I-7- Extraction des biosurfactants du milieu de croissance.....	9
I-8- Rôle des biosurfactants dans la biodégradation des Hydrocarbures	10
I-9- Propriétés physico-chimiques des biosurfactants.....	11
1- Activité d'émulsification	11
2- Abaissement de la tension superficielle et interfaciale	12
3- Concentration micellaire critique (CMC)	14
I-10- Les avantages des biosurfactants	17
1- La biodégradabilité.....	17
2- Faible toxicité	18
3- Biocompatibilité et digestibilité	18
4- Disponibilité des matières premières.....	18
5- Economie de production acceptable	18
6- Utilisation dans le contrôle environnemental	18
7- Tolérance à la température, au pH et à la force ionique.....	19
I-11- Facteurs affectant la production de biosurfactants	19
1- Source de carbone	19
2- Source d'azote	19
3- Le pH.....	20

4- Température	20
5- Aération et agitation	20
I-12- Application des biosurfactants	21
1- Application en industrie pétrolière	21
2- Application dans la bioremédiation.....	21
3- Application dans le secteur de haute technologie	21
4- Application en industrie alimentaire	21
5- Applications en cosmétologie	22
6- Applications pharmaceutiques	22

CHAPITRE II - Microorganismes producteurs de biosurfactants

II-1- Microorganismes producteur de biosurfactants	23
II-2- Les <i>pseudomonas</i>	25
II-2-1- Caractéristiques générales des genres <i>pseudomonas</i>	25
II-2-2- Caractéristiques métaboliques du genre <i>pseudomonas</i>	26
II-2-3- Classification des <i>pseudomonas</i>	27
II-2-4- Distribution écologique du genre <i>pseudomonas</i>	28
II-3- Les Rhamnolipides.....	28
II-3-1- Biosynthèses des Rhamnolipides.....	29
II-3-2- Applications des Rhamnolipides	30
1-Bioremediation	31
2- Industrie alimentaire.....	31
3- Industries pharmaceutiques et cosmétiques	32
4-Biomédecine	32
5- Agronomie.....	32

CHAPITRE III – Les lentilles « *Lens culinaris Medik* »

III-1- Présentation de l'espèce étudiée : La lentille « <i>Lens culinaris Medik</i> ».....	33
III-2- Origine et distribution géographique de l'espèce étudiée	33
III-3- Systématique des lentilles	33
III-4- Description de l'espèce étudiée	34
III-5-Classification taxonomique	35
III-6- Les exigences des lentilles <i>Lens culinarisMedik</i>	35
1- La température	35

2- L'eau	35
3- Le sol.....	35
III-7- Evolution de la culture de la lentille en Algérie	36
III-8- Intérêts des lentilles	36
III-9- Valeurs alimentaires des lentilles	36
III-10-Culture de l'espèce étudiée.....	37
III-11- Contrôle des maladies et ravageurs	38

Partie II- Matériel et méthodes

CHAPITRE IV : Matériel et méthodes

IV-1- Matériel biologique	39
IV-1-1- Souche bactérienne	39
IV-1-2- Les milieux de culture utilisés	39
IV-2- Méthodologie de travail.....	39
IV-2-1- Revivification de la souche bactérienne.....	39
IV-2-2- Repiquage et purification de la souche bactérienne	40
IV-2-3- Caractérisation de la souche bactérienne	40
1. Aspect macroscopique	40
2. Aspect microscopique.....	40
3. Test de la catalase	41
IV-3- Production de biosurfactant(s).....	42
IV-3-1- Préparation du milieu glucose	42
IV-3-2- La Pré-culture	42
IV-3-3- La culture.....	42
IV-4- Suivi de la cinétique de la croissance de la souche bactérienne	43
IV-4-1- Mesure de la densité optique	43
IV-4-2- Index d'émulsification E ₂₄	44
IV-5- Extraction du biosurfactant.....	45
IV-5-1- Caractérisation du biosurfactant.....	46
IV-5-2- Etude de l'effet antibactérien du biosurfactant produit.....	47
IV-6- Optimisation de l'effet du biosurfactant produit sur la croissance de la plante	49
IV-7- La culture des lentilles « <i>Lens culinaris</i> »	51
IV-7-1- Préparation des solutions d'arrosage	52
IV-7-2- La culture	52

Partie III : Résultats et discussions

CHAPITRE V : Résultats et discussions

V-1- Résultats des tests de vérification de la pureté de la souche.....	53
V-1-1- Etude macroscopique	53
V-1-2- Etude microscopique	53
V-1-3- Test de la catalase.....	54
V-2- Le suivi de la croissance bactérienne.....	55
V-3- Extraction du biosurfactant	56
V-4- Caractérisation du biosurfactant produit.....	56
V-5- Etude de l'effet antibactérien du biosurfactants produit.....	58
V-6- Optimisation de l'effet du biosurfactant produit sur la croissance de la plante	59
V-6-1- Analyse de la réponse Y ₁	61
V-6-1-1- Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y ₁ (poids sec)	61
V-6-1-2- Modélisation de la réponse Y ₁	64
V-6-1-3- Représentation graphique des surfaces de réponses associées à la réponse Y ₁	65
V-6-2- Analyse de la réponse Y ₂	67
V-6-2-1-Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y ₂ (hauteur de la plante en cm).....	69
V-6-2-2- Modélisation de la réponse Y ₂	69
V-6-2-3- Représentation graphique des surfaces de réponses associée à la réponse Y ₂	70
V-6-3- Analyse de la réponse Y ₃	73
V-6-3-1- Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y ₃ (pourcentage de germination)	73
V-6-3-2- Modélisation de la réponse Y ₃	75
V-6-3-3- Représentation graphique des surfaces de réponses associée à la réponse Y ₃	76

Conclusion

Référence bibliographiques	IV
Annexes	V

Liste des abréviations

Hsp 40 : Heatschock protéine

EF-G : Elongation factor G

E₂₄ : Indice d'émulsification

RL : rhamnolipides

BHIB : Bouillon cœur cerveau

MH : Milieu Mueller-Hinton

E.P.S : ExoPolySaccharides

IR : Infra-Rouge

DO : Densité Optique

FTIR : Infrarouge à Transformée de Fourier

SQ : Quorum-sensing

pH : Potentiel Hydrogène

CMC: Concentration Micellaire Critique

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre	Page
Figure 1	Accumulation des biosurfactants à l'interface entre le liquide et l'air.	6
Figure 2	Des structures générales de tensioactifs selon la composition de leurs fractions hydrophiles et dans des compositions amphotères non ioniques, anioniques, cationiques.	6
Figure3	Observation sous microscope électronique a balayage du réseau formé par la souche <i>Pseudomonas</i> sp. cultivé sur 2% de n-héxadecane.	10
Figure 4	Observation sous microscope électronique à transmission de gouttelettes d'héxaecane englouties par la souche <i>Pseudomonas</i> sp.	11
Figure 5	L'activité d'émulsification.	12
Figure 6	Illustration montrant la tension superficielle et interfaciale.	13
Figure 7	Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant.	14
Figure 8	Représentation schématique d'une molécule de biosurfactants.	15
Figure 9	Mécanismes de solubilisation des hydrocarbures dans les micelles du bio-tensioactif.	16
Figure 10	Le rapport entre la concentration de biosurfactants, la tension superficielle et la formation de micelles.	17
Figure 11	Image indiquant une population de <i>Pseudomonas</i> sp.	26
Figure 12	Les différentes structures des rhamnolipides.	29
Figure 13	Modèle de la régulation de la production des rhamnolipides chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	30
Figure 14	Description morphologique de la lentille.	34
Figure 15	Photo indiquant la méthode d'incubation à l'aide d'un diffuseur d'aire pour la production de biosurfactants.	43

Figure 16	Photo représentant un Spectrophotomètre.	44
Figure 17	Extraction du biosurfactant à l'aide du rota-vapeur.	45
Figure 18	Spectrophotomètre Infrarouge à Transformée de Fourier.	46
Figure 19	Les étapes de la Spectroscopie à Transformée de Fourier.	47
Figure 20	Illustration montrant la méthode d'antibiogramme avec des disques.	48
Figure 21	Dispositif expérimental utilisé.	52
Figure 22	Aspect macroscopique de la souche <i>Pseudomonas</i> sp. cultivée sur les deux milieux GN et Hektoen.	53
Figure 23	La coloration de Gram après observation au microscope photonique G100.	54
Figure 24	L'effervescence après le test de catalas.	54
Figure 25	Le suivi de la croissance de la souche <i>Pseudomonas</i> sp. sur le milieu glucose.	55
Figure 26	Pesage du biosurfactant produit.	56
Figure 27	Caractérisation du biosurfactants produits par spectroscope à transformée de Fourier.	57
Figures 28	Diagramme de Pareto des effets sur la réponse Y1 (poids sec).	63
Figures 29	Représentation des surfaces de réponse associées à la réponse Y1.	65
Figures 30	Diagramme de Pareto des effets des trois facteurs X1, X2, X3, sur la réponse Y2 (hauteur moyenne de la plante).	69
Figures 31	Représentation graphique des surfaces de réponse associées à la réponse Y2.	71
Figures 32	Diagramme de Pareto des effets sur la réponse Y3.	74
Figures 33	Représentation des surfaces de réponse associées à la réponse Y3.	76

Liste des tableaux

Numéro du Tableau	Titre du tableau	Page
Tableau I	Principales classes, types de surfactants biologiques et quelques microorganismes producteurs.	08
Tableau II	Composés chimiques éliminés par biodégradation bactérienne.	21
Tableau III	Biosurfactants produits par des bactéries et des champignons.	23
Tableau IV	Tableau résumant les domaines d'application des rhamnolipides	31
Tableau V	Valeur nutritionnelle moyenne pour 100g de lentilles.	37
Tableau VI	Tableau indiquant la matrice formée par le logiciel STATISTICA.	50
Tableau VII	Tableau représentant les combinaisons des expériences en valeurs réelles.	51
Tableau VIII	Effet antibactérien du biosurfactants produit.	58
Tableau IX	Les valeurs expérimentales obtenues des trois réponses (Y_1 , Y_2 et Y_3).	60
Tableau X	Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_1 .	62
Tableau XI	Estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y_1 .	64
Tableau XII	Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_2 .	68
Tableau XIII	Estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y_2 .	70
Tableau XIV	Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_3 .	73
Tableau XV	Estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y_3	75

Introduction

Les surfactants d'origine microbien font l'objet de nombreuses études, l'attention portée aux problèmes d'environnement les faisant bénéficier d'un intérêt croissant.

En effet, ces surfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Le surfactant va se trouver à l'interface de phases ayant des degrés de polarité différents, comme dans le cas des mélanges eau-huile ou air-eau. Les composés microbiens qui possèdent de telles propriétés sont dénommés biosurfactants.

En termes d'abaissement de la tension interfaciale, de la tension de surface et de la stabilité thermique et chimique (pH), beaucoup de biosurfactants sont comparables aux surfactants synthétiques et incluent un grand nombre de structures chimiques, comme les glycolipides, les lipopeptides, les complexes polysaccharides, les protéines, les phospholipides et les acides gras mais la structure la plus commune est celle des glycolipides.

D'autre part, les bactéries les plus utilisées dans la production de biosurfactants sont : *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Torulopsis*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Serratia* et *Corynebacterium*, dont la source de carbone peut être un alcane, du glucose, du glycérol...etc. Pour cela Le choix de la source de carbone joue un rôle important sur le rendement et la structure du biosurfactant.

La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (VIPULANANDAN et REN, 2000). C'est pourquoi, depuis quelques années et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des microorganismes : les tensioactifs biologiques ou biosurfactants. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques (BANAT *et al.*, 2000), mais possèdent des avantages potentiels, c'est-à-dire qu'ils sont respectueux de l'environnement, moins toxiques, facilement biodégradables, actifs dans des conditions extrêmes comme les régions de haute salinité/température et peuvent être produits en utilisant des sources organiques peu coûteuses, ce qui favorise leur commercialisation (DIAZ DE RIENZO *et al.*, 2016), ils sont donc supérieurs aux produits synthétiques.

Ces tensioactifs d'origine microbien constituent un domaine de recherche en voie d'émergence, largement utilisés dans de nombreuses industries telles que l'industrie agroalimentaire, le papier, le textile, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques, les huiles (BANAT *et al.*, 2000), les substances actives dans les champoings et de nombreux produits de soins de peau et le procédé de récupération du pétrole, le nettoyage et la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures (MAKKAR *et al.*, 2011; FREITAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Compte tenu de l'importance écologique, économique et industrielle des biosurfactants nous nous proposons à travers cette étude à entreprendre l'optimisation de l'effet des biosurfactants produit par la souche *pseudomonas* sp. sur la croissance des lentilles « *Lens culinaris Medik* », sachant qu'il n'ait pas beaucoup d'études portant sur les applications de ces biosurfactants en tant que biostimulateur de la croissance des plantes.

Nos objectifs pour la réalisation de notre travail se résument comme suite ;

- Purification puis ensemencement de la souche bactérienne *pseudomonas* sp. sur un milieu de glucose pour la production de biosurfactant et réaliser l'extraction de ce dernier à l'aide d'un rota vapeur ;
- Identification et caractérisation par spectroscopie à transformée de fourrier du type de biosurfactants produit ;
- Evaluation de l'effet antibactérien de ce dernier ;
- La variation des trois paramètres d'optimisation qui sont ; (la température, pH et concentration en biosurfactants) sur les lentilles « *Lens culinaris* » en appliquant la méthode des surfaces de réponses selon : La longueur de la tige, le poids du végétal après séchage, pourcentages de germinations. Cependant, les paramètres sont fixés grâce à un logiciel STATISTICA sous forme d'une matrice avec le choix de 3 paramètres et 16 expériences réparties en plusieurs colonnes et lignes où les données sont fixées avec des valeurs codées et grâce à une formule que nous allons appliquer, nous allons convertir ces valeurs codées à des valeurs réelles, puis les exécuter comme plan de notre expérimentation.
- Préparation du milieu de culture pour les lentilles « *Lens culinaris Medik* » et les différentes solutions d'arrosage selon la matrice donnée par le logiciel et lancement des essais dans une boîte de carton fermée dotée d'une lampe blanche pour assurer l'éclairage et un thermomètre pour contrôler la température qui sont disposés près du climatiseur.
- L'optimisation de l'effet de ces biosurfactants produits par la souche *pseudomonas* sp. sur la croissance des lentilles « *lens culinaris Medik* »

Le présent mémoire se subdivise en trois parties :

- ✓ La première partie représente une analyse de la littérature scientifique où sont exposées les données relatives aux biosurfactants et leur description générale (classification, propriétés, structures, avantages et applications...etc.). Cette partie

comprend également les notions fondamentales sur les bactéries productrices des biosurfactants et la présentation de la plante étudiée lentille « *Lens culinaris Medik* ».

- ✓ La seconde partie est réservée à la présentation de la méthodologie adoptée pour la réalisation de notre travail.
- ✓ La troisième partie est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus. Le tout complété par une conclusion générale qui intègre l'essentiel des résultats obtenus dans le cadre de cette recherche et des perspectives.

Etude

Bibliographique

Chapitre I

Les biosurfactants

I – 1- Généralités sur les Biosurfactants

Les biosurfactants ou les bio-tensioactifs sont des tensioactifs naturels produits par des bactéries, des levures ou des champignons provenant de différents substrats, y compris les sucres simples, les huiles, les alcanes (SILVA *et al.*, 2014) ou des hydrocarbures provenant d'un environnement contaminé. Ils ont la capacité de réduire la tension de la surface et de l'interface entre les substances liquides et solides (DAS et MUKHERJEE, 2007), ces biosurfactants se subdivisent en deux catégories :

- **Les bio-tensioactifs de faible poids moléculaire**, comprenant les glycolipides, les phospholipides, les lipopeptides, les peptides, les acides gras et les lipides neutres.
- **Les bio-tensioactifs de haut poids moléculaire**, composés de polysaccharides, de protéines, de lipopolysaccharides, de lipoprotéines ou de mélanges complexes de ces biopolymères (SILVA *et al.*, 2014).

Les bio-tensioactifs de bas poids moléculaires présentent une plus grande efficacité dans la réduction de la tension superficielle et interfaciale que les composés à haut poids moléculaire mais ils possèdent des propriétés émulsionnantes plus faibles par rapport aux bio-tensioactifs de haut poids moléculaire (KOLWZAN *et al.*, 2014).

Egalement, ces agents tensioactifs biologiques agissent comme agents mouillants ou moussants, solubilisant, détergents, dispersants, émulsifiants et ils peuvent créer une microémulsion (SRIRAM *et al.*, 2011).

I-2- Définition du surfactant microbien ou biosurfactant

Les surfactants (SURFace ACTive AgeNTS) sont des agents à activités de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) (AL- ARAJIL *et al.*, 2007).

Ces surfactants sont donc des agents tensio-actifs, c'est-à-dire des composés qui abaissent la tension superficielle entre différentes phases telles que gaz, liquide et solide avec différents degrés de polarités et liaisons hydrogènes (**Figure 1**) (SOBERON-CHAVEZ et MAIER, 2011).

Ces composés peuvent être naturels ou synthétiques et contiennent divers groupes fonctionnels qui leur confèrent des propriétés spécifiques, ce qui les rend adaptés à différentes utilisations industrielles et de consommation (SANTOS *et al.*, 2016).

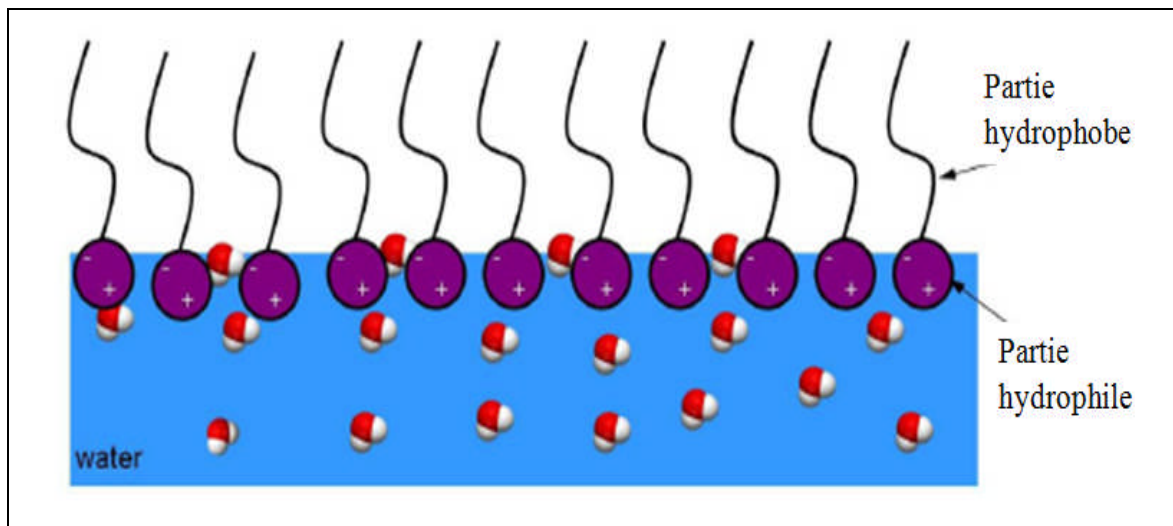


Figure 1 : Accumulation des biosurfactants à l'interface entre le liquide et l'air (SOBERON-CHAVEZ et MAIER, 2011).

I-3- Structures générales des tensioactifs

Ce sont des molécules amphiphiles constituées de domaines hydrophiles (tête polaire) et de domaines hydrophobes (leur queues ou chaîne non polaire) (SANTOS *et al.*, 2016).

La partie polaire est :

- Ionique (cationique ou anionique), non ionique ou amphotère (SANTOS *et al.*, 2016) (Figure 2).

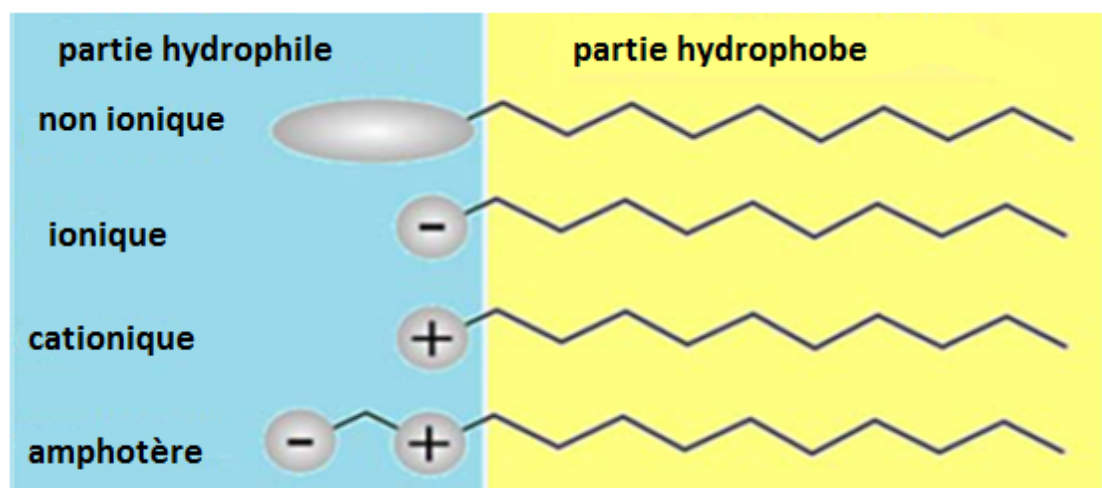


Figure 2 : Des structures générales de tensioactifs selon la composition de leurs fractions hydrophiles et dans des compositions amphotères non ioniques, anioniques, cationiques (SINGH *et al.*, 2007).

- ✓ 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 ;
- ✓ Les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre (PARRA *et al.*, 1989 ; WEST et HARWELL, 1992 ; PORE, 1992).
- ✓ Présente une forte affinité pour l'eau et les liquides polaires,
- ✓ Peuvent contenir des acides aminés, des hydrates de carbone, de l'alcool ou de l'acide carboxylique (KOLWZAN *et al.*, 2014 ; CIANDRINI *et al.*, 2016).

La partie non polaire est souvent :

- une chaîne hydrocarbonée (SANTOS *et al.*, 2016),
- Présente une affinité pour les liquides non polaires.
- Principalement composé d'acide gras à longue chaîne ou d'acide gras hydroxyle (SHARMA *et al.*, 2016 ; MULLIGAN, 2005).

I-4- Nature et classifications des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés selon leur nature biochimique dont 'on distingue cinq grandes classes (**Tableau I**) : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres (HEALY *et al.*, 1996).

1. **Les glycolipides**, sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatique ou d'acides hydroxyaliphatiques. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides (RON et ROSENBERG, 2002).
2. **Les lipopeptides et lipoprotéines**, sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique (ROSENBERG et RON, 1999).

Tableau I : Principales classes, types de surfactants biologiques et quelques microorganismes producteurs (BANAT *et al.*, 2000).

Groupe/ Classe	Biosurfactants	Micro-organisme
Glycolipides	Rhamnolipides Trehalolipides Sophorolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodococcus sp.</i> ; <i>Nocardia</i> , <i>Mycobacterium</i> . <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida</i> <i>Antartica</i>
Lipopeptides et lipoproteines	Surfactine Viscosine	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Phospholipides	Phospholipide	<i>Corynebacterium insidiosum</i>
Acides gras	Acide gras	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipides neutres	Lipides neutres	<i>Clostridium pasteurianum</i>
Lipopolysaccharides ou Polymériques	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

3. Les phospholipides, sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique (HEALY *et al.*, 1996).

4. Les lipopolysaccharides ou polymériques, sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras (HEALY *et al.*, 1996).

5. Les acides gras et lipides neutres, sont les biosurfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée (HEALY *et al.*, 1996).

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biosurfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides (DESAI et BANAT, 1997).

I-5- Caractéristiques écologiques des biosurfactants

Par rapport à leurs homologues synthétiques, les biosurfactants possèdent de nombreuses caractéristiques écologiques (CIANDRINI *et al.*, 2016) tel que:

- Faible toxicité ;
- Pas d'accumulation dans les organismes ;
- Faible sensibilité aux facteurs environnementaux ;
- Possibilité d'utiliser des déchets comme substrats nécessaires à la production de biosurfactants ;
- Facilité de dégradation dans l'environnement par les microorganismes qui vivent dans l'eau ou le sol.
- Présentent également des caractéristiques antimicrobiennes, antifongiques et anti-biofilm (KOLWZAN *et al.*, 2014).

I-6 - Identification des biosurfactants

Une fois les produits (biosurfactants) sont purifiés, il faut déterminer leur structure.

Parmi les différentes analyses qualitatives on utilise le plus fréquemment :

- La spectrométrie d'adsorption en lumière ultra-violette et visible (UV-Vis) qui détecte la présence de chromophores (SPOECKNER *et al.*, 1999),
- La spectrométrie infrarouge (IR) qui détermine les groupements fonctionnels (PEYPOUX *et al.*, 1999),
- La spectrométrie de masse (MS) qui donne le poids moléculaire, des indications sur la structure et fournit l'analyse élémentaire de la molécule (DANIELS *et al.*, 1999),
- La résonance magnétique nucléaire à haut champ (RMN de proton et de carbone 13) indique la structure et la conformation des composés à analyser (DANIELS *et al.*, 1999).

I-7- Extraction des biosurfactants du milieu de croissance

Pour extraire les biosurfactants du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (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, etc. ou des techniques reposant sur la précipitation du biosurfactant. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices (DESAI et BANAT, 1997).

I-8 - Rôle des biosurfactants dans la biodégradation des hydrocarbures

Il existe une relation claire entre l'activité d'émulsification, l'adhérence des cellules à l'hydrocarbure, et le taux de croissance des isolats sur le pétrole brut (MEHDI *et al.*, 2008).

Une étude sur des bactéries (*Pseudomonas* sp.) capables de dégrader le n-héxadecane en produisant des biosurfactants, a montré qu'en présence de n-héxadecane dans le milieu de culture, les bactéries sécrètent des substances qui forment un réseau de projections extracellulaires reliant les cellules les unes aux autres. Ce réseau est supposé être un complexe de biosurfactants et d'alcanes qui forme un site d'ancrage des cellules et un moyen de transport d'hydrocarbures à leur surface cellulaire. Le biosurfactant disperse l'héxadécane en petites gouttelettes, et forme une couche autour de chacune, augmentant ainsi sa disponibilité aux organismes dégradants (CAMEOTRA *et al.*, 2009) (**Figure 3**).

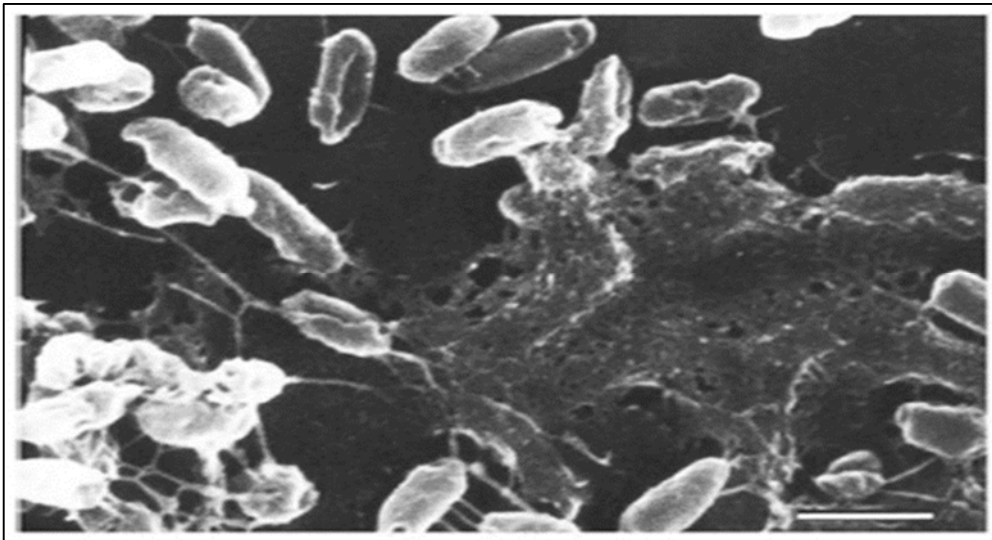


Figure 3 : Observation sous microscope électronique à balayage du réseau formé par la souche *Pseudomonas* sp. cultivé sur 2% de n-héxadecane (CAMEOTRA *et al.*, 2009).

L'étude ultra-structurale a montré qu'un processus semblable à la pinocytose active prend place pour la pénétration des gouttelettes d'hydrocarbure à l'intérieur de la cellule bactérienne (**Figure 4**).

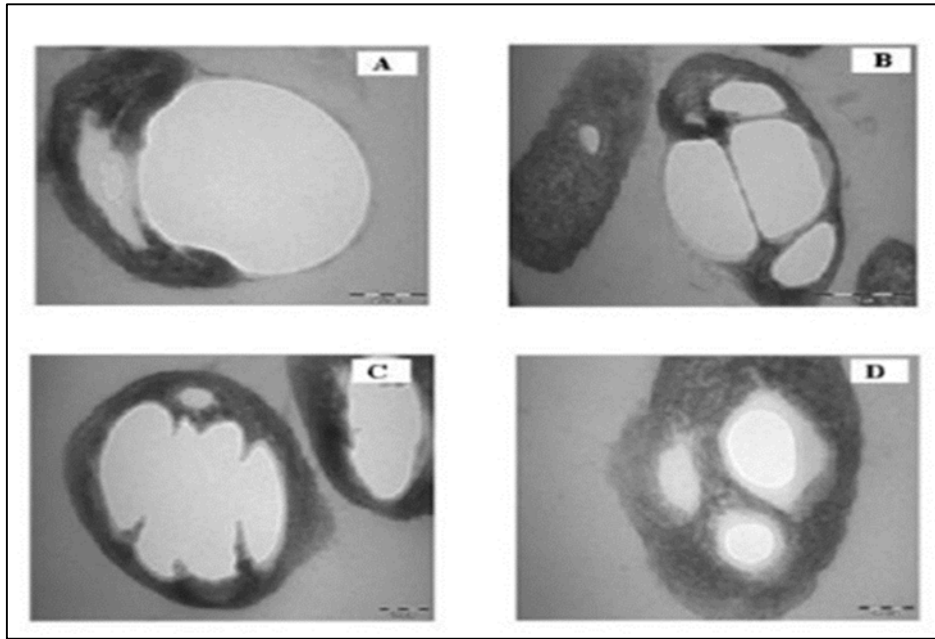


Figure 4 : Observation sous microscope électronique à transmission de gouttelettes d'hexadécane englouties par la souche *Pseudomonas* sp. (CAMEOTRA et al., 2009).

I-9- Propriétés physico-chimiques des biosurfactants

1. Activité d'émulsification

L'émulsification est une propriété fonctionnelle des biosurfactants qui fait référence à la dispersion d'une phase liquide dans une autre, provoquant le mélange de deux liquides non miscibles (INES et DHOUBA, 2015). La mesure de l'activité d'émulsification est l'une des méthodes utilisées pour l'évaluation de la production de biosurfactants par des microorganismes.

Cette méthode a d'abord été décrite par PANCHAL et ZAJIC (1978), et elle nécessite un mélange d'un volume égal d'un composé hydrocarboné (le kérosène est l'huile couramment utilisé) avec l'échantillon, ensuite placer le mélange à la température ambiante pendant 24 heures. Comme indiqué sur la **figure 5 (B)** une émulsion est formée lorsqu'un agent émulsionnant tel qu'un biosurfactant est présent.

L'indice d'émulsification (EI) est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Indice d'émulsification (E24)\%} = \frac{\text{hauteur de la couche d'émulsion}}{\text{hauteur totale de la solution}} \dots\dots\dots \text{(Equation 1)}$$

L'activité d'émulsification est une caractéristique importante des composés du biosurfactant et est exploitée par diverses industries telles que, les produits cosmétiques, alimentaires et en particulier les industries pharmaceutiques (SATPUTE *et al.*, 2010; UZOIGWE *et al.*, 2015).

Cependant, on sait également que les biosurfactants avec des poids moléculaires inférieurs (lipopeptides et biosurfactants à base de glycolipides) forment des émulsions stables (KIM *et al.*, 1997; BENINCASA *et al.*, 2004).

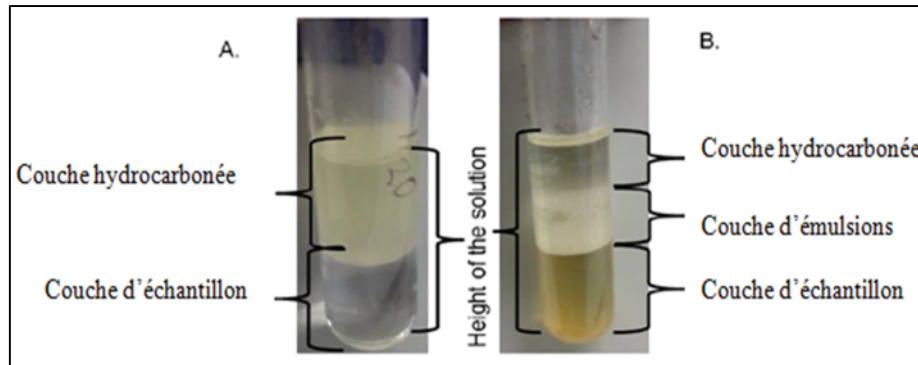


Figure 5 : L'activité d'émulsification (PANCHAL et ZAJIC, 1978).

L'activité d'émulsification des biosurfactants montré par la figure 5 (A) indique l'absence de formation d'émulsion entre un échantillon de culture bactérien et huile diesel après 24 heures à température ambiante, alors que pour l'illustration (B), montre l'apparition d'une couche d'émulsion entre un échantillon de culture bactérien et huile diesel après 24 heures à température ambiante, c'est-à-dire l'émulsion est formée lorsque les biosurfactants sont présents dans le milieu par rapport au tube (A) qui est marqué par leurs absences (PANCHAL et ZAJIC, 1978).

De nombreuses études ont signalé l'application réussie de l'indice d'émulsification comme moyen d'évaluer la production de biomolécules de biosurfactants par divers microorganismes isolés à partir d'environnements divers (DESAI et BANAT, 1997; KIM *et al.*, 1997; DAS *et al.*, 2008a; NDLOVU *et al.*, 2016).

2. Abaissement de la tension superficielle et interfaciale

Les biosurfactants sont connus pour leur excellente activité de surface qui sert à plusieurs fins. Pour cela la propriété la plus importante d'un tensioactif est la réduction de la tension superficielle, qui est la force d'attraction entre les molécules liquides (PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011). La surface est considérée comme la limite entre un liquide et l'air et l'interface est considérée comme la limite entre deux liquides.

Ainsi, la tension entre les phases air / eau et huile / eau sont connues sous le nom de tension superficielle et de tension interfaciale, respectivement (BANAT *et al.*, 2010).

La capacité à abaisser la tension superficielle et interfaciale est causée par l'adsorption du bio-tensioactif à différentes phases. Il en résulte plus d'interaction et de mélange de phases dissemblables qui fonctionnent pour solubiliser des substrats hydrophobes (SATPUTE *et al.*, 2010 ; WALTER *et al.*, 2010, UZOIGWE *et al.*, 2015).

Les microorganismes sont fortement influencés par les phénomènes interfaciaux, en particulier lorsque la paroi cellulaire ou la membrane de ces organismes interagit avec l'environnement externe. Cela stimule la synthèse des biosurfactants utilisée par les microorganismes.

Pour cela les propriétés interfaciales des bio-tensioactifs influencent alors la croissance des microbes comme suite : la séquestration des métabolites toxiques, ainsi que la réduction ou l'augmentation de la disponibilité des substrats pour l'absorption des nutriments (VAN HAMME *et al.*, 2006).

Comme l'illustre la **figure 6 (A)**, les molécules d'eau sont liées par des forces cohésives qui créent une tension superficielle (INES et DHOUHA, 2015).

Lorsqu'un tensioactif est ajouté à l'eau **figure 6 (B)**, la tension superficielle de l'eau est réduite (SATPUTE *et al.*, 2010).

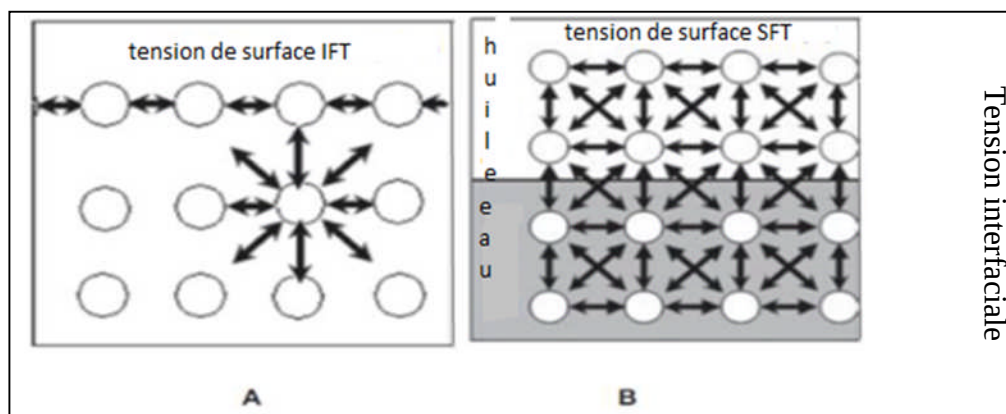


Figure 6 : Illustration montrant la tension superficielle et interfaciale (SATPUTE *et al.*, 2010).

D'après La **figure 6 (A)**, indique l'apparition de la tension superficielle des molécules d'eau, alors que pour la **figure 6 (B)**, montre l'apparition de la tension superficielle de l'huile dans l'eau avec un composé biosurfactants et l'effet de la tension interfaciale de l'eau et de l'huile (SATPUTE *et al.*, 2010).

3. Concentration micellaire critique (CMC)

La concentration micellaire critique (CMC) est par définition la concentration d'un agent de surface (biosurfactant) au-dessus de laquelle, une partie des molécules dispersées au sein de la solution aqueuse se rassemblent sous forme de micelle (PORE, 1992).

Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes incapables de former des liaisons hydrogènes en phase aqueuse créent une forte augmentation de l'énergie libre du système. Une façon d'abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou de former des micelles (HAIGH, 1996).

En effet, dans les micelles les parties hydrophobes se regroupent vers le centre et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau (**Figure 7**).

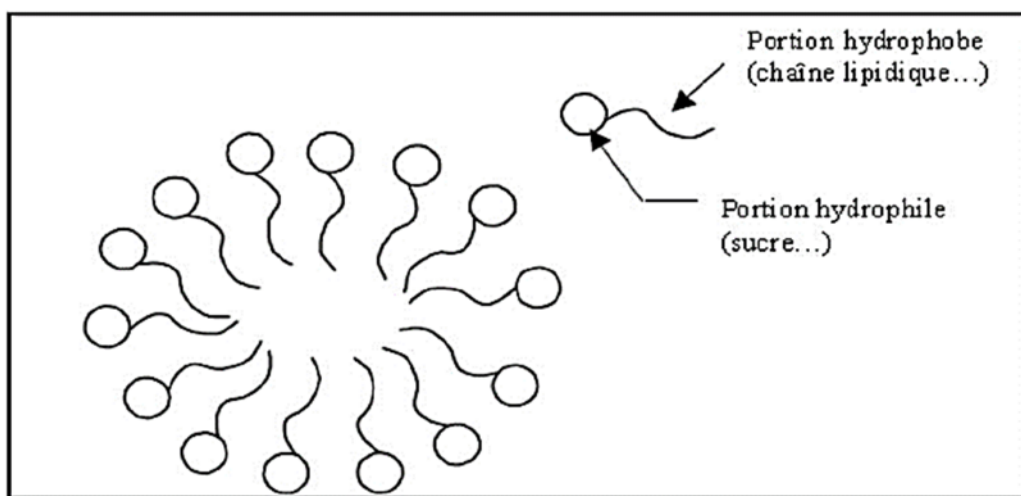


Figure 7: Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant (GABET, 2004).

a. Structure des biosurfactants et paramètres influençant leur micellisation

Les micelles de biosurfactants s'arrangent en différentes microstructures sphériques, globulaires ou cylindriques, mais des vésicules sphériques et irrégulières, des bicouches tubulaires ou des structures lamellaires sont le plus souvent rencontrées (CHAMPION *et al.*, 1995).

Le volume intérieur des micelles dépend de sa forme et du nombre d'agrégation (nombre de monomères constituant la micelle). Généralement, il faut de 50 à 100 monomères pour former une micelle (CHRISTOFI et IVSHINA, 2002).

Le nombre d'agrégation augmente quand l'aire de la section transversale de la partie hydrophile (**ah**) diminue (**Figure 8**). **Lc** représente la longueur de la chaîne hydrophobe et **VH** le volume occupé par celle-ci. La forme de la micelle dépend également de la structure du biosurfactant.

À l'aide d'une approche géométrique, la forme de la micelle peut être déterminée par le rapport suivant :

$$\text{La forme de la micelle} = \frac{V_H}{(a_h \times L_c)} \quad \dots \dots \dots \text{(Equation 2)}$$

Si ce rapport est inférieur à 1/3, la micelle est de forme sphérique (BAI *et al.*, 1998).

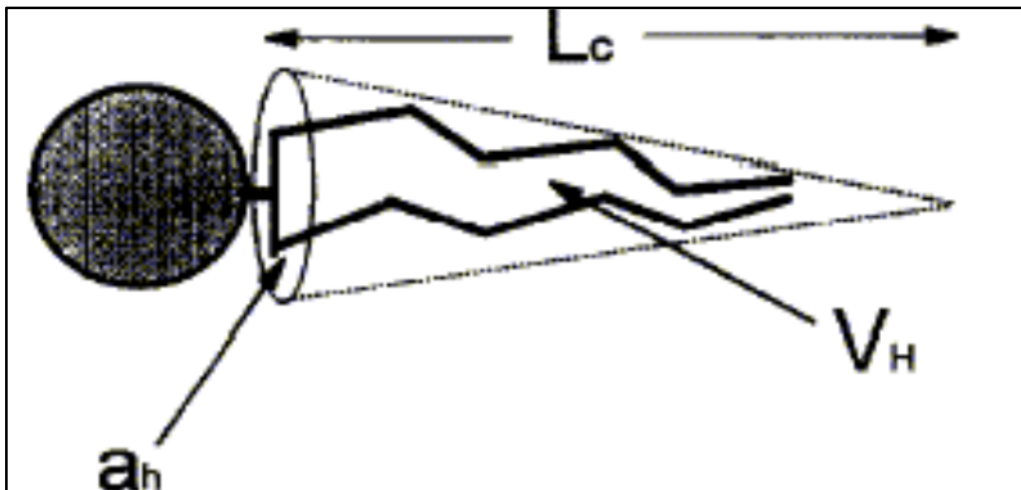


Figure 8 : Représentation schématique d'une molécule de biosurfactants
(BAI *et al.*, 1998).

Quand le nombre d'agrégation augmente, le volume intérieur de la micelle augmente (BAI *et al.*, 1998).

La morphologie des agrégats varie avec le pH, la concentration en biosurfactant, la température ou la force ionique (CHAMPION *et al.*, 1995).

b. Solubilité des biosurfactants

Les biosurfactants à faible masse moléculaire telle que, les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides, sont efficaces pour abaisser les tensions superficielles et interfaciales, alors que les biosurfactants de masse moléculaire élevée contenant des polysaccharides amphipathiques, des protéines, des saccharides lipopoliques, des lipoprotéines ou des mélanges complexes de ces biopolymères sont plus efficaces pour solubiliser les émulsions huile dans l'eau (PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011).

Parmi les biosurfactants les mieux étudiés, on retrouve les rhamnolipides qui appartiennent à la classe des glycolipides. Ces rhamnolipides ont été identifiés comme prédominants chez *Pseudomonas aeruginosa* (TULEVAA *et al.*, 2002).

Des recherches effectuées sur ces rhamnolipides, dans des cultures liquides secouées complétées par des composés hydrophobes, dans telles conditions, ces rhamnolipides sont libérées dans le milieu sous forme de monomères qui s'accumulent sous forme des micelles et des vésicules plus grandes lorsque la concentration atteinte et dépasse un niveau critique de micelle (CMC). Les hydrocarbures sont incorporés dans le noyau hydrophobe des micelles, ce qui améliore efficacement leur dispersion dans la phase aqueuse et donc leur biodisponibilité pour l'absorption par les cellules. Ce procédé a été étudié en grande partie avec des alcanes comme substrats modèles qui est appelé « solubilisation de micelles » (**Figure 9**) (ZHANG et MILLER, 1992).

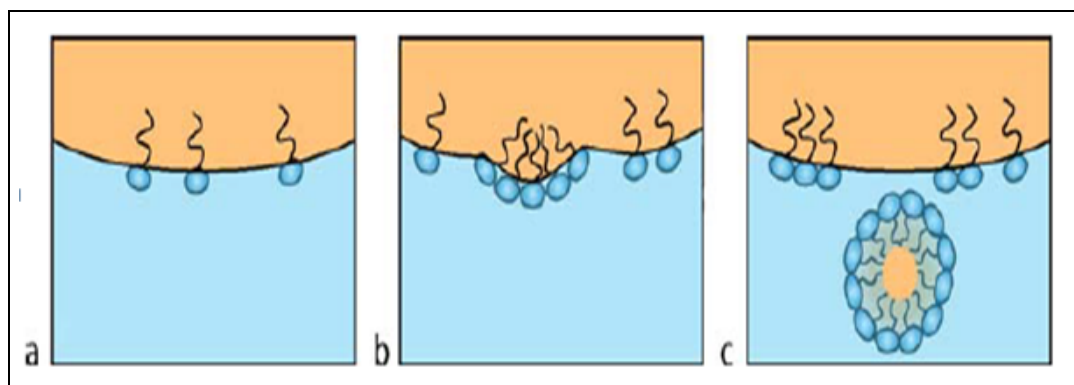


Figure 9 : Mécanismes de solubilisation des hydrocarbures dans les micelles du bio-tensioactif (ZHANG et MILLER, 1992).

A faible concentration, les bio-tensioactifs se présentent sous forme de monomères à l'interface entre les phases aqueuses et hydrocarbonées (a). Lorsque la concentration augmente et que l'espace disponible diminue, les biosurfactants ont tendance à se répartir en granulats (b) jusqu'à un point appelé « concentration critique de micelles », au cours duquel des micelles sont formées en piégeant les hydrocarbures dans leur noyau hydrophobe (c). Une fois dispersés, les hydrocarbures deviennent disponibles pour l'adsorption par les cellules bactériennes afin de les dégrader (ZHANG et MILLER, 1992).

Les activités du biosurfactants dépendent de la concentration des composés tensioactifs (**Figure 10**) jusqu'à obtention de la concentration critique de micelle (CMC) (PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011).

La concentration à laquelle les micelles ont commencé à se former a été représentée sous le nom de CMC (RASHEDI *et al.*, 2005). A des concentrations supérieures à la CMC, les molécules de biosurfactants s'associent pour former des micelles, des bicouches et des vésicules.

La formation de micelles permet aux biosurfactants de réduire la tension superficielle et interfaciale et d'augmenter la solubilité et la biodisponibilité des composés organiques hydrophobes (PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011).

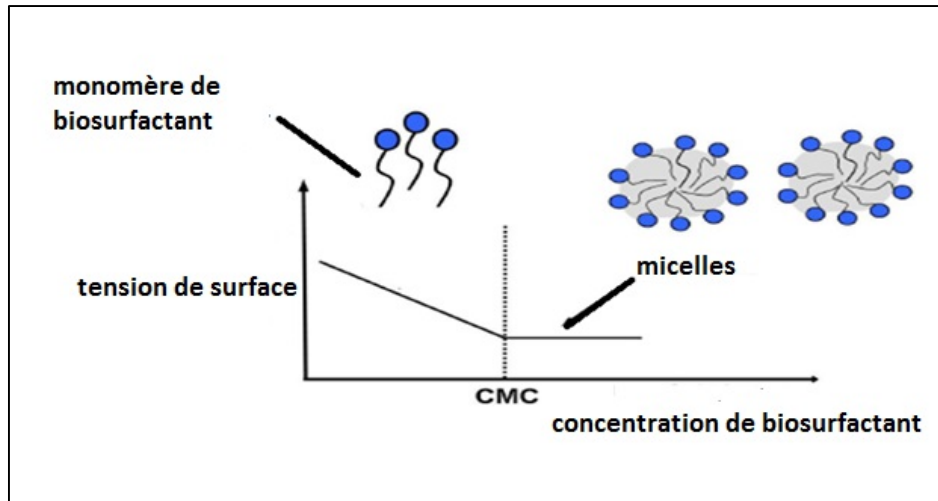


Figure 8 : Le rapport entre la concentration de biosurfactants, la tension superficielle et la formation de micelles (WHANG *et al.*, 2008).

I-10 - Les Avantages des biosurfactants

Malgré la diversité de leur composition chimique et de leurs propriétés, la plupart des biosurfactants ont des caractéristiques communes qui présentent des avantages par rapport aux produits tensioactifs synthétiques (FRACCHIA *et al.*, 2014). Pour cela, certains avantages de ces biosurfactants sont décrits comme suite :

1. La biodégradabilité

Les biosurfactants sont naturellement biodégradables. La biodégradabilité est une question très importante aux problèmes liée à la pollution environnementale comme pouvoir être décomposé par des processus naturels, par des bactéries, des champignons ou d'autres organismes simples en composant plus élémentaires, ils ne créent pas beaucoup de problèmes pour l'environnement et sont particulièrement adaptés aux applications environnementales telles que la bioremédiation (MULLIGAN *et al.*, 2005) et la dispersion des déversements d'hydrocarbures (BENERJEE, 1991).

2. Faible toxicité ;

Les biosurfactants ne causent pas de graves dommages à l'écosystème biotique car leur niveau de toxicité est faible.

De nombreux tensioactifs chimiques sont toxiques pour les êtres vivants, ce qui les rend moins utiles pour être utilisés dans différentes industries.

Les tensioactifs microbiens sont généralement considérés comme des produits faibles ou non toxiques et par conséquent appropriés pour les produits pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (POREMBBA *et al.*, 1991).

3. Biocompatibilité et digestibilité

Les biosurfactants sont biocompatibles dans la nature (ROSENBERG *et al.*, 1999), ce qui signifie qu'ils sont bien tolérés par les organismes vivants. Ceux-ci lorsqu'ils interagissent avec ces organismes ne changent pas leur bioactivité. Cette propriété permet leur application dans les produits cosmétiques, pharmaceutiques et en tant qu'additifs alimentaires fonctionnels.

4. Disponibilité des matières premières

Les biosurfactants peuvent être produits à partir de matières premières, comme l'huile de colza, les effluents des pommes de terre, les déchets de raffinage de pétrole, les eaux usées, le lait caillé et les déchets de distillerie, l'huile de tournesol, etc. (MUTHUSAMY *et al.*, 2008) qui sont disponibles en grande quantité. La source de carbone peut provenir d'hydrocarbures, de glucides et /ou des lipides, qui peuvent être utilisés séparément ou en combinaison.

5. Economie de production acceptable ;

Selon l'application, les biosurfactants peuvent également être produits à partir des déchets industriels et des produits. Ceci est particulièrement intéressant pour la production en vrac du biosurfactant qui est économiquement acceptable (MUTHUSAMY *et al.*, 2008).

6. Utilisation dans le contrôle environnemental ;

Les biosurfactants peuvent être utilisés efficacement dans la gestion des émulsions industrielles, le contrôle des déversements d'hydrocarbures, la biodégradation et la désintoxication des effluents industriels et la bioremédiation des sols contaminés (MUTHUSAMY *et al.*, 2008).

7. Tolérance à la température, au pH et à la force ionique ;

De nombreux biosurfactants peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes et conservent leurs activités après la stérilisation. Par exemple, on sait que les glycolipides ne sont pas affectés par une stérilisation à 121°C et un pH allant de 5 à 12 et aussi beaucoup de biosurfactants tolèrent des concentrations en sel jusqu'à 10% (FRACCHIA *et al.*, 2014).

I-11 -Facteurs affectant la production de biosurfactants

Les facteurs affectant la production de biosurfactants ainsi, la composition et l'activité émulsionnante dépendent de la souche productrice, des conditions de culture, la nature de la source de carbone, de la source d'azote, des limites nutritionnelles, des paramètres chimiques et physiques tels que la température, l'aération et le pH qui influencent non seulement la quantité de biosurfactants produite, mais aussi le type de polymère produit (FAKRUDDIN, 2012).

1. Sources de carbone ;

La qualité et la quantité de biosurfactants sont affectées et influencées par la nature du substrat de carbone. Nous avons signalé que le glucose, le saccharose, le mannitol, l'amidon, le maltose, le glycérol etc.... étaient une bonne source de substrat de carbone pour la production de biosurfactants (RAHMAN et GAKPE, 2008).

2. Sources d'azote ;

L'azote est important dans le milieu de production du biosurfactant car il est essentiel pour la croissance microbienne, et la synthèse des protéines et des enzymes en dépend.

Différents composés azotés ont été utilisés pour la production de biosurfactants tels que l'urée, peptone, l'extrait de levure, le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, le nitrate de sodium, la farine de soja, le glutamate de sodium et extrait de viande (ADAMCZAK et BEDNARSKI, 2000).

De nombreuses études ont montré que la synthèse des rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitante. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices (LANG et WULLBRANDT, 1999).

3. Le pH ;

Le pH est un facteur important, il peut limiter ou favoriser la production de biosurfactants.

Les sols peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11. Des valeurs extrêmes de pH pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons étant favorisée par un pH proche de la neutralité (LEAHY et COLWELL, 1990).

Pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, par exemple, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactants chute rapidement (ARINO *et al.*, 1996).

ISHIGAMI *et al.* (1987) et CHAMPION *et al.* (1995) ont montré que suivant le pH, les rhamnolipides produits avaient une structure différente et s'organisaient différemment. Par exemple, à un pH de 5,5 la structure est de forme lamellaire alors qu'à des pH supérieurs, des vésicules se forment.

4. Température ;

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation des hydrocarbures en modifiant son état physique, sa composition chimique, l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes (LEAHY et COLWELL, 1990).

Une diminution de la température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (WALWORTH *et al.*, 2001).

La quantité de biosurfactants est maximale à pH 6,5 lors de l'incubation à 37°C, ce qui était significativement différent pour la production à d'autres températures.

5. Aération et agitation ;

L'aération et l'agitation sont des facteurs importants qui influent sur la production de biosurfactants car ils facilitent le transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase aqueuse (ADAMCZAK et BEDNARSKI, 2000).

I- 13 - Applications des biosurfactants

Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les biosurfactants sont aujourd'hui utilisés dans différents domaines d'application tels que :

1. Application en industrie pétrolière

Particulièrement dans l'amélioration de récupération transport dans les pipelines et dans les opérations de nettoyage des bacs de stockage du pétrole (BANAT, 1995 ; MEYLHEUC *et al.*, 2001; CEDOU, 2013), Dégradation des hydrocarbures d'origine pétrolière (LAHOUSINE, 1999).

2. Application dans la bioremédiation

La bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, les polluants organiques et les métaux lourds (**Tableau II**), (RAZA *et al.*, 2007) et dans le traitement des eaux usées (SAMADI *et al.*, 2007).

Tableau II : Composés chimiques éliminés par biodégradation bactérienne (Mulligan, 2009).

Composés éliminés par voie bactérienne	
Composés organiques	Métaux lourds
- Phénanthrène - Styrène - Polychlorobiphényle - Pétrole Brut (Heavy, Light) - Gaz-Oil - Diesel - 4-Chlorophenol (4-CP) - Perchloroethylene (PCE)	- Cadmium - Plomb - Zinc - Copper, et Nickel - Chromium hexavalent - Arsenic - Phenanthrene mélangé au Cadmium

3. Application dans le secteur de haute technologie,

Comme l'impression électronique, l'enregistrement magnétique, la micro-électronique (MARQUES *et al.*, 2009) ainsi que dans les nanotechnologiesetc (MULLIGAN, 2009).

4. Application en industrie alimentaire,

Comme additifs alimentaires, et comme améliorants dans la boulangerie et la charcuterie (PROMMACHAN, 2002).

5. Applications en cosmétologie

L'emploi de tensioactifs devrait connaître la plus grande croissance dans les marchés du soin corporel et des cosmétiques (WERTZ, 2012).

Dans l'industrie cosmétique, grâce à ses propriétés d'émulsification, de moussage, de capacité de liaison à l'eau, et de mouillage. Ces agents tensioactifs sont utilisés comme, agents solubilisant, nettoyants, antimicrobiens, agents d'action enzymatique, insecticides, antiacides, produits pour le bain, produits antipelliculaires, produits pour bébés, mascara, Rouge à lèvres, dentifrice, nettoyants dentaires pour ne citer que quelques-uns (GHARAEI-FATHABAD, 2011).

6. Applications pharmaceutiques

Comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales pour combattre les différentes maladies infectieuses (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Plusieurs biosurfactants ont des propriétés antimicrobiennes telles que la Surfactine qui a un pouvoir antibactérien (PEYPOUX *et al.*, 1999), antitumoral, inhibitrices de la formation de caillot de fibrine (LAURILA, 1985), et dans la lutte contre le virus de l'immunodéficience humaine (BANAT, 2000).

Chapitre II
Les microorganismes
producteurs

II-1- Les microorganismes producteurs de biosurfactants

Les biosurfactants sont un groupe chimiquement diversifié de molécules tensioactives, produites par divers groupes de microorganismes (RADING *et al.*, 2006), qui se développent de manière aérobie dans les milieux aqueux, avec différentes sources de carbone tel que : des hydrates de carbone (sucre), des hydrocarbures, des huiles, ou un mélange de ces derniers (CAMPOS *et al.*, 2013).

Ces microorganismes en question sont en général des bactéries, des champignons ou des levures (DEB *et al.*, 2016), isolés des sites pollués, les suivants sont communément les plus étudiés pour leurs productions de biosurfactants : *Arthrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Candida lipolytica*, *Torulopsis bonbicola* (CAMPOS *et al.*, 2013). Le tableau III résume certains microorganismes ainsi que les types de biosurfactants qu'ils produisent.

Tableau III : Biosurfactants produits par des bactéries et des champignons

Organismes	Biosurfactants	Références
Bactéries		
▪ <i>Serratia marcescens</i>	Serrawettin	LAI <i>et al.</i> (2009)
▪ <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>R. graminis</i>	Lipides polyol	AMARAL <i>et al.</i> (2006)
▪ <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter spp.</i> ,	Lipides de tréhalose	MUTHUSAMY <i>et al.</i> (2008)
▪ <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> ,		
▪ <i>Mycobacterium spp.</i>		
▪ <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Thiobacillus thiooxidans</i> ,	Lipides ornithine	DESAI et BANAT (1997)
▪ <i>Agrobacterium spp.</i>		
▪ <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc mesenteriods</i>	Viscosine	BANAT <i>et al.</i> (2010)
▪ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ,	Rhamnolipides	JADHAV <i>et al.</i> (2011)
▪ <i>Serratia rubidea</i>		
▪ <i>P. fluorescens</i> , <i>Debaryomyces polymorphus</i>	Carbohydrate-lipide	NERURKAR <i>et al.</i> (2009)

▪ <i>P. aeruginosa</i>	Protéine PA	HISATSUKA <i>et al.</i> (1971)
▪ <i>Lactobacillus fermentum</i>	Diglycosyl diglycérides	MULLIGAN <i>et al.</i> (2001)
Champignons		
▪ <i>Torulopsis bombicola</i>	Sophorose lipidique	KIM <i>et al.</i> (1997)
▪ <i>Candida bombicola</i>	Sophorolipides	CASAS <i>et al.</i> (1997)
▪ <i>Candida lipolytica</i>	Complexe protéine-lipidopolysaccharide	SARUBBO <i>et al.</i> (2007)
▪ <i>Candida lipolytica</i>	Complexe Protein-lipidcarbohydate	RUFINO <i>et al.</i> (2007)
▪ <i>Candida ishiwadae</i>	Glycolipide	THANOMSUB <i>et al.</i> (2004)
▪ <i>Candida batistae</i>	Sophorolipide	KONISHI <i>et al.</i> (2008)
▪ <i>Aspergillus ustus</i>	Glycolipoprotéine	ALEJANDRO <i>et al.</i> (2011)
▪ <i>Trichosporon ashii</i>	Sophorolipide	CHANDRAN et Das (2010)

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau, et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable, indique une production efficiente (PRUTHI *et al.*, 1995). La présence de biosurfactants est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux liquides purs non miscibles (KREPSKY *et al.*, 2007).

CAMEOTRA (2009) explique ce phénomène comme étant l'un des comportements des microorganismes pour augmenter la biodisponibilité de plusieurs substrats hydrophobes tel que les hydrocarbures, les huiles, qui sont peu utilisés à cause de leur insolubilité dans l'eau.

En effet, ces bactéries synthétisent les biosurfactants qui sont soit des molécules intracellulaires (par exemple dans la membrane cellulaire), extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule (par exemple sur la paroi cellulaire) (PRABHU *et al.*, 2003), pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne à fin de les dégrader (AL-ARAJIL *et al.*, 2007).

Cependant, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms

(Alasan d'*Acinetobacter*), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de *T. bombicola*), l'activité antibactérienne (gramicidine, polymyxine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds (VANDECASTEELE, 2008).

II-2- Les *Pseudomonas*

II-2-1- Caractéristiques générales du genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* sont un groupe bactérien particulièrement important (Figure 11), qui appartient à la sous-classe des γ Protéobactéries, et comprennent plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (BOSSIS *et al.*, 2000 ; PALLERONIE et MOORE, 2004). Ils ont été découverts par MUIGAN en 1894. Ce genre constitue l'un des plus complexes parmi ceux des bactéries à Gram négatif (MEGHDAS *et al.*, 2004). Il s'agit du genre le plus important de l'ordre des *Pseudomonadales*, la famille des *Pseudomonadaceae*. Les *Pseudomonas* sont sous forme de bâtonnet droit légèrement incurvé de 0,5 à 1 μm sur 1,5 à 5 μm de longueur, mobile grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (PRESCOTT *et al.*, 2008). Ce genre peut être isolé de différents milieux tellurique ou aquatique. L'action des bactéries de ce dernier varie selon les espèces et l'hôte. Certaines espèces sont pathogènes pour l'homme et les animaux (NICHIMORI., 2000), et les plantes, alors que d'autres peuvent être bénéfiques (certaines exercent des effets stimulants pour la croissance des plantes, et d'autres sont des fertilisants puisqu'elles ont la capacité de décomposer des matières organiques (NIELSEN *et al.*, 1998).

Les *Pseudomonas* ont la capacité de se développer à des températures différentes, certaines de ses espèces peuvent se développer à des températures basses entre (-1) et (30) °C tel que *P. psychrophila* (YUMOTO *et al.*, 2001) et *P. thermotolérance* qui peut se développer à des températures atteignant(+55) °C (MANAIA et MOORE, 2002).

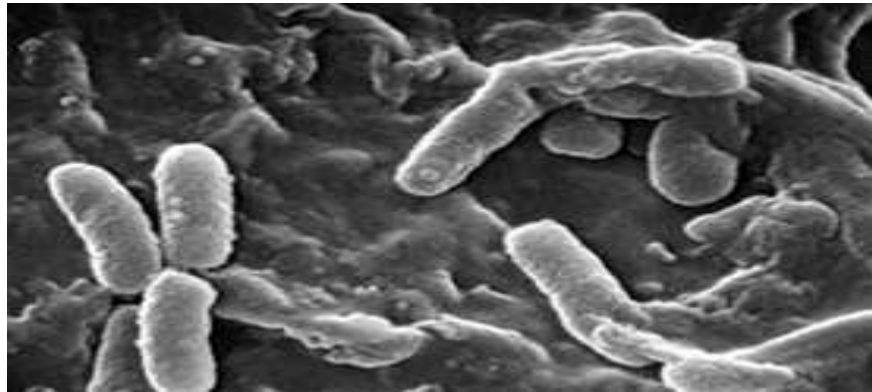


Figure 11 : Image représentative d'une population de Pseudomonas

II-2-2- Caractéristiques métaboliques du genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif non fermentatif, il utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons, même que certaines souches ont recouru à la dénitrification, c'est-à-dire qu'elles utilisent les nitrates comme accepteurs final d'électrons (PRESCOTT *et al.*, 2008) ce qui leur permet de croître en anaérobiose. Elles sont catalase positive, mésophile chimio-organotrophes puisqu'elles peuvent croître dans des milieux ne contenant qu'une seule source de carbone. Certaines sont chimio-organotrophes facultatives, peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie. Elles ont une versatilité nutritionnelle (peuvent utiliser des sources de carbones variables) (STANIER *et al.*, 1966). Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à des pH inférieur à 4,5, elles ont la capacité de dégrader des composés complexes, comme les protéines les polysaccharides complexes (PALLERONIE *et al.*, 1984).

Ces bactéries pourraient intervenir dans des processus de décontamination des sols et des biodépollutions, qui sont dus à leur capacité de dégrader des composés complexes tels que les xénobiotiques et les hydrocarbures aromatiques et leurs dérivés, ces dernières ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs (LATOUR et LEMANCEAU, 1997 ; BOSSIS *et al.*, 2000).

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'Exopolysaccharide entourant leurs cellules, qui les protègent de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Les E.P.S permettent aux souches de former des biofilms qui assurent l'adhérence aux surfaces de manière à ce qu'elles ne soient pas délogées (VISCA *et al.*, 2007).

Certaines souches de *Pseudomonas* ont la capacité de produire des biosurfactants, qui sont à la une des recherches pour leurs différentes utilisations dans différentes industries.

II-2-3- Classification des *Pseudomonas*

La classification du genre *Pseudomonas* est passée par plusieurs étapes. En premier lieu, il y a eu les travaux de STANIER *et al* (1960) qui consistaient en l'utilisation de 146 composés organiques afin de rapporter les caractéristiques nutritionnelles de 267 isolats du genre. Vient ensuite la découverte de la renaturation de l'ADN par MARMUR (1961) qui a permis la confirmation de la classification phénotypique des *Pseudomonas*, par des essais d'hybridation ADN/ADN (COLOWELL et MENDEL, 1964 ; COLOWELL *et al* 1965 ; JOHNSON et ORDAL, 1968). Viennent peu de temps après la classification du genre selon les caractéristiques génotypiques par PALLERONI et ses collaborateurs, qui ont classifié le groupe de *Pseudomonas* en 5 sous-groupes selon l'homologie ADN/ARN.

Les groupes étaient phylogénétiquement trop éloignés, par conséquent seules les bactéries appartenant au groupe ARNr I ont été retenues dans le genre *Pseudomonas*.

WOESE (1984), proposa d'identifier et de classifier les espèces en fonction de leurs ARN ribosomal 16 S, ce qui a permis par la suite la subdivision des Protéobacter en 15 sous-groupes appartenant aux classes α , β , γ (KERSTER *et al.*, 1996).

Par la suite, il y a eu reclassification des espèces du genre comme par exemple : *Pseudomonas acidovorans* et *Pseudomonas testosteroni* qui faisaient partie du groupe des ARNr III reclassifié dans le genre *Comamonas* (TAMAOKA *et al.*, 1987). Deux ans plus tard *Pseudomonas flava*, *Pseudomonas palleroni*, *Pseudomonas taeniospiralis*, *Pseudomonas pseudoflava* et *Pseudomonas carboxydoflava* ont été reclassées dans le genre *Hydrogenophaga* (WILLEMS *et al.*, 1989).

A partir de 1990, le séquençage du gène codant pour l'ARNr a débuté. Il a été appliqué pour toutes les bactéries, puis le séquençage des génomes complets, puis déposé dans des banques de données telles que NCBI.

Durant la première décennie du millénaire, la taxonomie la plus détaillée du genre *Pseudomonas* basé sur les séquençages du gène codant pour l'ARNr 16S fut entreprise par ANZAI *et al.*, 2000, en analysant 128 espèces de *Pseudomonas*. Ils ont conclu que 57 seulement appartiennent au groupe de *Pseudomonas* sensu stricto ; c'est-à-dire les *Pseudomonas* vrais, la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisés en 7 classes :

1. Groupes des *Pseudomonas syringae* ;
2. Groupe des *Pseudomonas chlororaphis* ;

3. Groupe des *Pseudomonas fluorescens* ;
4. Groupe des *Pseudomonas putida* ;
5. Groupe des *Pseudomonas stutzeri* ;
6. Groupe des *Pseudomonas aeruginosa* ;
7. Groupe des *Pseudomonas pertucinogen* ;

La division du genre *Pseudomonas*, réalisée grâce à l'exploitation des données de l'ARNr (hybridation puis séquençage), est confirmé par des analyses des quinones, des profils des acides gras *et al.*, cellulaires (MOSS *et al.*, 1972 ; IKEMOTO *et al.*, 1978 ; OYAZU et KOMAGATA, 1983 ; STED 1992 VANCANNET *et al.*, 1996) et de certaines protéines dont EF-G (BOCCHETTA, 1996), Hsp 40 (BUSTARD et GUPTA, 1997), des protéines enzymatiques comme celles impliquer dans la biosynthèse de tyrosine.

II-2-4- Distribution écologique du genre *Pseudomonas*

La plupart des *Pseudomonas* sont très ubiquistes, elles sont isolées d'eau douce et de mère, des sols, des poussières en suspension dans l'aire, et des végétaux. Elles peuvent vivre dans des niches écologiques très diverses (BOETELHO et LEDA, 2006), comme par exemple la souche *Pseudomonas aeruginosa* qu'on retrouve dans des milieux hospitaliers, dans l'aire, des eaux douces et marines. Elle peut même être rencontré dans des sols contaminés par des hydrocarbures (YOUCEF *et al.*, 2004). Elle peut être retrouvé sous forme planctonique mobile ou en biofilm (MEAR *et al.*, 2014).

D'autres espèces sont considérées comme saprophytes telles que *Pseudomonas aeruginosa*, elles peuvent être isolées des végétaux, des selles, des sécrétions, de la surface de la peau et des produits alimentaires. D'autres ont la capacité de coloniser des plantes telles que certaines espèces de *Pseudomonas syringae*, (STANIER *et al.*, 1987). Pour ce qui est de *Pseudomonas fluorescens*, elles sont rencontrées dans les sols, les eaux et en particulier au niveau des rhizosphères.

II-3- Les rhamnolipides

La découverte des rhamnolipides remonte à 1946, lorsque BERGUESTONE *et al.* , (1946 a), a rapporté un glycolipide huileux, qui a été appelé acides piolipique, composé de L rhamnose et d'acides β -hydroxydécanoïque, produit par *Pseudomonas pyocyaneus* (aujourd'hui *Pseudomonas aeruginosa*) cultivée dans un milieu, où la source de carbone est du glucose.

JAVIS et JOHSON (1949) ont montré une caractéristique supplémentaire de la structure du composé isolé, à savoir qu'il était composé de deux acides β hydroxydicanoïque (les deux acides reliés par une liaison ester) lié par des liaisons glycosidiques à des fragments de rhamnoses. EDIVARD et HAYASHI (1965), en utilisant l'oxydation du périodate et la méthylation, ont rapporté que la liaison entre les deux rhamnose est du type α -1,2-glycoïdique.

De 1972 à 2000, divers RL produit par des souches de *P.aeruginosa*, cultivé sur différents substrats (n paraffine, glycérol, n alcane glucose...etc.) ont été isolé et signalé.

Les rhamnolipides isolés comprenaient tous types d'homologue RL (RL1, RL2, RL3, RL4) et ne cessent d'augmenter avec les progrès des méthodes analytiques (ABDEL MAWGOUD *et al.*, 2010)

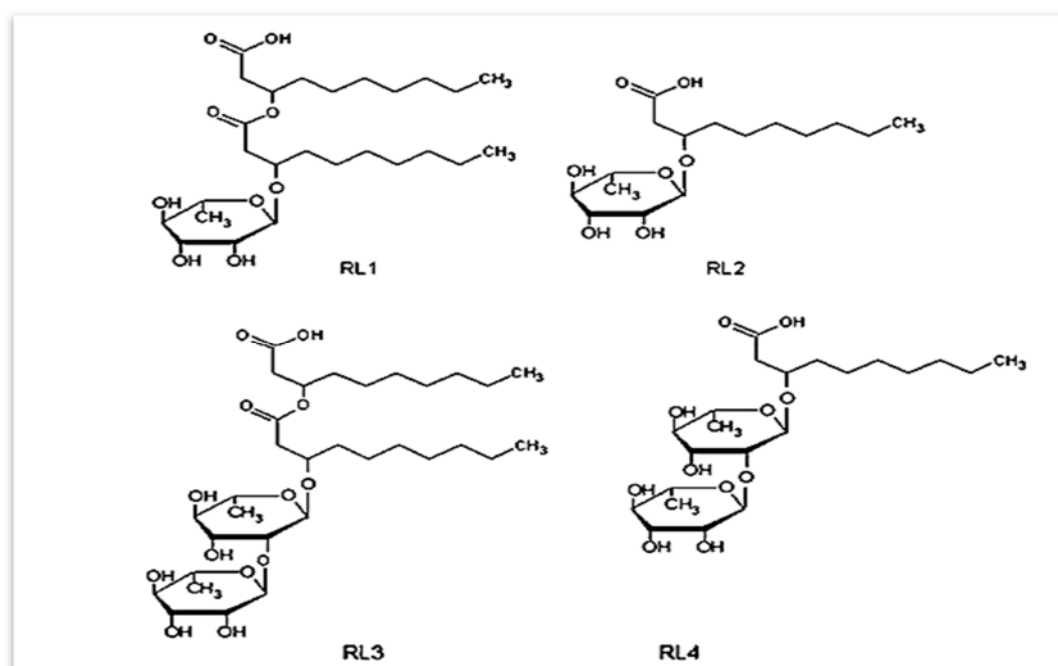


Figure 12 : Les différentes structures des rhamnolipides. (MILENA G. RIKALOVIĆ *et al.*, 2015).

II-3-1- Biosynthèses des rhamnolipides

Les gènes impliqués dans la synthèse des rhamnolipides ont été isolé et caractérisé par Ochsner *et al.*, (1994a, 1994b, 1995a, 1995b) quatre gènes en sont responsables, ce sont rhlABRI. Ces gènes sont sous le contrôle du système rhl, l'un des systèmes SQ (Quorum-sensing) chez *pseudomonas aeruginosa*.

Les gènes régulateurs rh codent pour un activateur transcriptionnel le RhlR, cette protéine régulatrice est activée par un auto-inducteur le RhlI, le produit d'une synthèse rhlI.

Le complexe RhlR-RhlI formé va activer l'opéron rhl AB qui va coder pour la rhamnotransferase. La rhamnotransferase est une enzyme responsable de la synthèse des rhamnolipides.

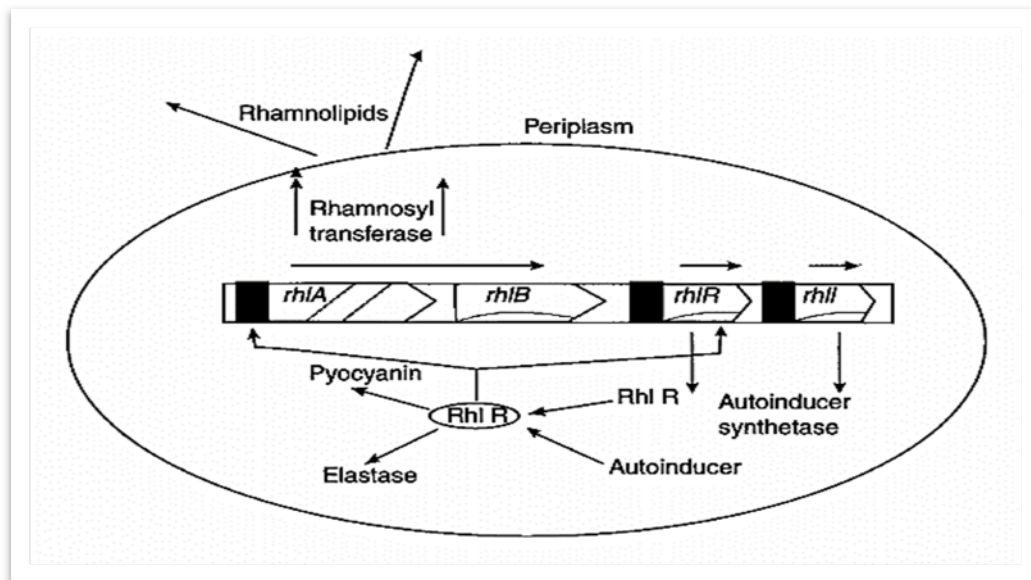


Figure 13 : Modèle de la régulation de la production des rhamnolipides chez *Pseudomonas aeruginosa* (ADAPTER DE LANG et WULLBRANDT, 1999).

II-3-2 Applications des rhamnolipides :

Les propriétés principales des biosurfactants tels que, les propriétés détergentes, moussante, émulsionnante, solubilisante, mouillante, épaississante, séquestrante de métal, de formation de vésicules et de dispersion des phases, peuvent être exécuté par les rhamnolipides.

Toutes ces propriétés sont associées à leur caractère amphiphile, et leur confèrent la possibilité de s'accumuler entre les phases fluides, réduisant aussi les tensions superficielles et interfaciales.

L'utilisation environnementale des rhamnolipides est actuellement considérée comme le principal domaine d'application potentiel de rhamnolipides, mais un nombre croissant de brevets indiquent l'application réussie dans les industries alimentaires, agricoles, industries cosmétiques et pharmaceutiques et dans les nanotechnologies.

Tableau IV : tableau résumant les domaines d'application des rhamnolipides

Champs d'application	Processus spécifique / buts
Bioremédiation	- Agent de rinçage organique (PAH, NAPL, mélange d'hydrocarbure, agent de rinçage des métaux lourds, Cu, Zn, Pb, Ni, Cr) ; - biodégradation des matières organiques (pétrole et dérivés).
Industrie Alimentaire	- Ingrédient polyvalent (diminution de la tension interfaciale et de surface, formation et stabilisation d'émulsion, amélioration des textures, et conservation des produits). - Source de L- rhamnose / conditionnement de surface.
Cosmétiques et pharmaceutiques	- Utilisation dans des produits de soins pour la peau.
Biomédecine	- Activité antimicrobienne et antivirale ; - Immunosuppression cellulaire ; - Guérison des plaies ; - Prévention du traitement des gencives, et régénération par voie parodontale de l'ulcère ; - Inhibition des lignées cellulaires de cancer du sein humaines.
Agronomie	- Contrôle des pathogènes végétaux, zoosporique, en affectant la motilité ; - Cause la lyse, et l'inhibition de la germination des spores et le développement des mycéliums.

1. Bioremediation

Les rhamnolipides ont un potentiel dans la bioremédiation, comme étant des agents de rinçage organique, et agent de rinçage des métaux, etc.

Différentes études ont confirmé que les biosurfactants et spécialement les RL peuvent affecter la biodégradation des hydrocarbures qu'ils soient aliphatiques ou aromatiques, ça été démontré que l'ajout des RLs à une culture pure de *Pseudomonas aeruginosa* renforce la biodégradation des hexadécane, des octadécane, n-paraffine et phénanthrène (SEREVA *et al.*, 1995).

2. Industrie alimentaire

En raison de leurs différentes propriétés, les rhamnolipides sont employés dans les industries alimentaires comme étant agent stabilisant de la texture des pâtes et dans la conservation des produits de boulangerie.

Les rhamnolipides peuvent servir de source de rhamnose ; un composant utilisé commercialement dans la production de composée de farine de meilleure qualité.

3. Industries pharmaceutiques et cosmétiques

Les rhamnolipides ont été utilisés sous plusieurs formulations différentes dans les produits de soins, par exemple les antiacides, les coussins d'acné, les produits antipelliculaires, il a été aussi utilisé dans les solutions de lentilles de contact, les déodorants, les produits des soins des ongles, et les dentifrices (KLECHKNER *et al.*, 1993 ; MAIER *et al.*, 2000). Ces produits nécessitent des tensioactifs qui ont des activités émulsionnantes en surface (LOURITH *et al.*, 2008) en particulier l'activité émulsifiante, qui est la clef de la consistance de la texture de ces produits (HABA *et al.*, 2003)

Les produits cosmétiques contenant des rhamnolipides, ont été breveté et utilisé comme produits antirides et antiâge (PILJAC *et al.*, 1999). Ils ont été lancé sous plusieurs formes posologiques, sous forme de cosmétique commerciaux pour la peau (DESAUTO, 2008) en raison de leurs irritabilité cutanée extrêmement faible (HABA *et al.*, 2003).

4. Biomédecine

Au début les propriétés antimicrobiennes de grande envergure ont été notée. Fait intéressant, des travaux de recherche ont démontré que les rhamnolipides étaient actifs contre une grande variété de bactéries qu'elles soient Gram (+) ou Gram (-) (ABDEL-MAWGOUD, 2010).

Les différentes combinaisons de rhamnolipides testés, ont montré une activité antimicrobienne contre presque toutes les espèces Gram (+) testé incluant *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, et *Bacillus*, ainsi qu'une activité significative contre un nombre d'espèces à Gram (-) comme *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogens* et *Klebsiella pneumoneae* (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011).

5. Agronomie

Il a été aussi démontré que les rhamnolipides ont certaines capacité de contrôler quelques pathogènes zoosporiques des végétaux tels que *Phytophthora cryptogea* et *Pythium spp*, d'autres études suggèrent que les rhamnolipides peuvent faciliter l'absorption de nutriment et des engrais par les racines, à côté de leurs activités insecticides (SACHDEV et CAMEOTRA, 2013).

Chapitre III

Présentation de l'espèce étudiée : La lentille

III-1- Présentation de l'espèce étudiée : La lentille « *Lens culinaris* Medik »

Les Lentille cultivées, les Lentilles comestibles ou les Lentilles « *Lens culinaris* Medik » est une espèce qui fait parti des légumes secs importante et populaire, utilisée principalement pour l'alimentation humaine depuis la préhistoire, Trônant parmi les légumineuses ayant la plus petite taille, elle a l'avantage de nécessiter un temps de cuisson plus court que la majorité des légumineuses (Saskatchewan, 2000).

Les lentilles « *Lens culinaris* Medik » est principalement consommée comme source de protéines dans divers produits allant des potages aux desserts. Renfermant 25% de protéine, excellente source de vitamine A, elle fournit les fibres, du potassium, des vitamines B et du fer. Cette source de protéines ne renferme pas de cholestérol et presque pas de lipides.

La paille peut également être utilisée comme aliment de qualité supérieure pour le bétail ou en tant que source de matières organiques pour l'amélioration des sols (Saskatchewan, Pulse, Growers, 2000).

III-2- Origine et distribution géographique de l'espèce étudiée

L'ancêtre du *Lens culinaris* est le *Lens orientalis* (LADIZINSKY *et al.*, 1984). Le centre d'origine de la lentille cultivée se situe au Proche-Orient (ZOHARY, 1972) d'où elle s'est diffusée vers la Méditerranée, en Asie, en Afrique et en Europe, c'est un des plus anciens légumes secs cultivés (BRINK et BELAY, 2006). La lentille est maintenant cultivée partout dans le monde : sous-continent indien, Moyen-Orient, Afrique du Nord, Europe du Sud, le Nord et le Sud d'Amérique et en Australie (CHAHOTA *et al.*, 2007).

III-3- Systématique des lentilles

L'espèce *Lens culinaris* (lentille cultivée) appartient au genre *Lens*, classé dans la tribu des *Viciae*. Lors d'une révision du genre *Lens* (BRINK et BELAY, 2006), 4 espèces sont retenues :

Lens culinaris: a été divisée en quatre sous-espèces principales :

- subsp. *culinaris* (la lentille cultivée),
- subsp. *odemensis*,
- subsp. *orientalis*,
- subsp. *tomentosus*.
 - *Lens ervoides*
 - *Lens nigricans*
 - *Lens lamottei*

La lentille cultivée est classée en deux groupes selon la taille de la graine. Le groupe *macrosperma* prédominant principalement en Afrique du Nord, en Europe et en Amérique (diamètre supérieur à 6 mm), tandis que Le groupe *microsperma* (diamètre inférieur à 6 mm) domine en Asie, en Egypte, et en Ethiopie (BRINK et BELAY, 2006).

III-4- Description de l'espèce étudiée

Toutes les lentilles cultivées appartiennent à l'espèce « *Lens culinaris Medik* » (INSTITUT TECHNIQUE DES GRANDES CULTURES (ITGC), 2006), qui est une espèce de plantes dicotylédones annuelles appartenant à la famille des *Fabaceae* ou légumineuses et font partie des légumes secs, largement cultivée pour ses graines comestibles riches en protéines.

- **Description morphologique:** La lentille est une plante annuelle herbacée de 20 à 72cm de haut. La (Figure 14) montre les différentes étapes de la description morphologique de la lentille.

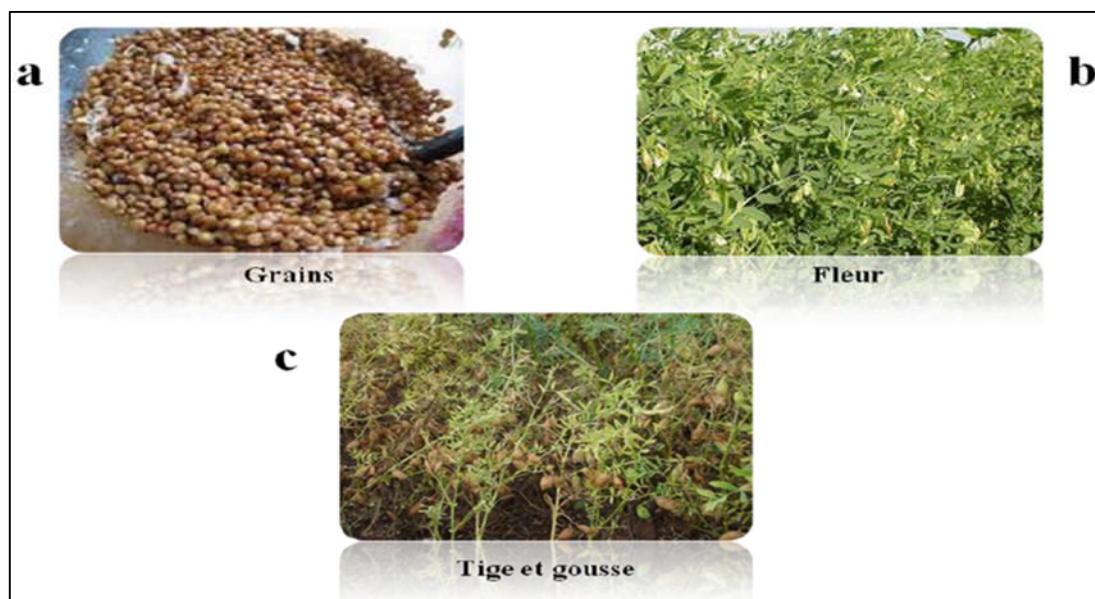


Figure 14 : Description morphologique de la lentille

-**Les tiges** : sont dressées et très rameuses.

-**Les feuilles** : alternes, composées pennées, comptent de 10 à 14 folioles opposées, oblongues, et sont terminées par une vrille généralement simple ou bifide.

-**Les fleurs** : à la corolle papilionacée typique de la sous-famille des Faboideae, sont de couleur blanche ou bleu pâle et groupées par petites grappes de deux à quatre. Le calice est régulier, à cinq dents étroites et relativement longues. La floraison estivale intervient entre mai et juillet.

- **Les fruits** : sont des gousses aplaties, courtes, contenant deux graines aplaties en forme caractéristique de disque faiblement bombé. La couleur des graines varie selon les variétés des plus pâles (vert pâle, blond, rose) au plus foncé (vert foncé, brun, violacé, etc.) (BRINK et BELAY, 2006).

III-5- Classification taxonomique

- Règne : *Plantae*
- Super division :Spermatohyta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : *Magnoliopsida*
- Sous-classe : Rosidae
- Ordre: *Fabales*
- Famille: *Fabaceae*
- Sous-famille: *Faboideae*
- Genre: *Lens*
- Espèce: *Lens culinaris* Medik
(DUHOUX et NICOLE, 2004).

III-6- Les exigences des lentilles « *Lens culinaris* Medik »

a. La température

La lentille est une plante qui résiste bien aux températures basses pendant la période végétative. Mais elle est sensible aux gelées et aux fortes températures à la floraison .La température favorable à la germination se situe entre 10°C et 30°C.

b. L'eau

La lentille tolère la sécheresse. Elle peut être cultivée dans les zones où la pluviométrie est comprise entre 300 et 500 mm et même une pluviométrie de 250 mm dans des sols lourds. Pendant la période de formation et de remplissage du grain, le stress hydrique provoque un échaudage qui se traduit par des grains maigres, de mauvaise qualité et un rendement faible.

c. Le sol

La lentille peut être cultivée sur différents types de sols. Elle s'accommode mieux aux sols légers et peu profond. Les sols à PH légèrement acide (6.0) à modérément alcalins (8.0), lui conviennent bien. Lorsque le pH du sol est supérieur à 9, la nodulation est retardée et les rendements sont faibles. Les sols trop calcaires, les sols trop fertiles et les sols à faible réserve utile en eau sont fortement déconseillés. La lentille demande une terre propre et ameublie en profondeur (INSTITUT TECHNIQUE DES GRANDES CULTURES (ITGC), 2006).

III-7- Evolution de la culture de la lentille en Algérie

La lentille a été cultivée avant 1830 dans jardins des fellahs (surtout en Kabylie), jusqu'à 1940 une étude a révélé que les lentilles rencontrées en Afrique du nord appartiennent à deux sous-espèces : la lentilles petite verte de puy (*Lens exculenta Moench, sp. Microsperma* vra. Dupuyensis Barul.) a été la première des variétés européennes introduites en grande culture en Algérie. Dans certaines régions, des cultures de puy vert et de lentille large ont coexisté et des croisements naturels se sont produits qui ont donné naissance à la (lentille verte d'Algérie) (VANDENBERG et SLINKARD, 1990).

III-8- Intérêts des lentilles

La culture de la lentille enrichit le sol en azote, donc elle induit une diminution en apport en engrais azoté et assure un assolement et une rotation (graminées et légumineuses) pour optimiser l'exploitation et la diversification de la production agricole. La plante est surtout cultivée pour ses graines, récoltées et exportées comme aliment. Cependant, la paille est aussi utilisée, comme aliment de qualité supérieure pour le bétail ou comme source de matière organique pour l'amélioration des sols (Saskatchewan Pulse Growers, 2000).

➤ Intérêt agronomique :

En Algérie, on distingue les lentilles de culture locale et les lentilles de culture européenne. Les premières, cultivées depuis les temps ancestraux sont des mélanges variables de formes diverses. Beaucoup de variétés anciennement cultivées ont disparu. Pour ce qui est de la richesse floristique, il n'existe pas en Algérie, de mise au point permettant d'avoir une idée précise. Il faut signaler que quelques variétés de lentilles ont été sélectionnées dans les différentes zones agro-climatiques incluant des variétés locales (FAO, 2006). La culture de cette légumineuse enrichit également le sol en azote, donc induit une diminution en apport en engrais et assurer un assolement et une rotation (graminées et légumineuses) pour optimiser l'exploitation agricole et la diversification de la production agricole.

III-9- valeurs alimentaires des lentilles

Les lentilles sont cultivées depuis la haute antiquité pour leurs graines très riches en éléments nutritifs et particulièrement en protéines, elle apporte également des fibres et des sels minéraux, dont du fer. Elle est utilisée pour l'alimentation humaine et animale. C'est un aliment très précieux à cause de ses grandes quantités nutritionnelles.

Certains nutritionnistes et médecins conseillent sa consommation pour la réduction du taux de cholestérol et la prévention des risques cardio-vasculaires (INSTITUT TECHNIQUE DES GRANDES CULTURES (ITGC), 2006). Le tableau suivant indique les valeurs nutritionnelles moyennes des lentilles sèches pour 100g :

Tableau V : Valeur nutritionnelle moyenne pour 100g de lentilles cuites.

Composants	Moyenne pour 100g	Composants	Moyenne pour 100g
Protéine	8,2 g	Glucides	12,6 g
Lipides	0,5 g	Sodium	3,0 mg
Potassium	309 mg	Magnésium	25 mg
Phosphore	164 mg	Fer	3 mg
Calcium	27 mg	Cuivre	0,24 mg
Manganèse	0,42 mg	Sélénium	2,8 ug
Zinc	1,03 mg	Vitamine B1	0,12 mg
Vitamine B2	0,06 mg	Vitamine B3	0,66 mg
Vitamine B5	0,47 mg	Vitamine B6	0,169 mg
Vitamine B9	56,8 ug	Vitamine C	1,75 mg
Vitamine E	0,26 mg		

III-10- Culture de l'espèce étudiée

La lentille pousse en terrain léger et sablonneux, légèrement calcaire (pH de 6,0 à 8,0) à exposition ensoleillée et climat plutôt frais. Elle se sème au printemps en rangs distants de 35 cm, en poquets de 6 à 8 graines disposés en quinconce. Recouvrir les graines de 1 cm de terre finement émietée. Biner et sarcler régulièrement. Arroser en cas de sécheresse prolongée.

Butter lorsque les plantes sont suffisamment hautes. Afin d'éviter que les plantes ne couchent au sol, tendre 2 ou 3 fils sur chaque rang.

La récolte se fait en milieu d'été avant l'arrivée à maturité des graines. Arracher les pieds et laisser les sécher sur place pendant une journée. Puis les suspendre en petites bottes dans un endroit bien aéré. Battre pour récolter les graines au fur et à mesure des besoins. Elles se conservent mieux dans leur cosse. Le froid aura l'avantage d'éliminer la bruche si nécessaire (Biologie du *Lens culinaris* Medikus, 2014).

La lentille est souvent considérée comme une culture tolérant la sécheresse, bien qu'elle utilise l'eau de manière relativement peu efficace, par rapport au blé de printemps. La lentille donne un rendement peu élevé en matière sèche, et les semis utilisent très peu l'eau du sol jusqu'au 25 juin environ (stade de la première fleur).

III-11- Contrôle des maladies et ravageurs

Les maladies les plus rencontrées sur les lentilles sont :

Les fusarioses (*Fusarium* sp. *Mycrospharella pinodes* agent causal du flétrissement et *Fusarium solani* agent causal des pourritures racinaires), le botrytis (*Botrytis* sp.), la rouille (*Uromyces fabae*), le mildiou (*Peronospora lentis*), l'oïdium (*Erysiphe polygoni*) et l'anthracnose (*Ascochyta lentis*).

Ces maladies causent d'importants dégâts sur la culture à différents stades. Elles peuvent être contrôlées par l'application de fongicides.

Les insectes provoquent également des dégâts considérables sur la culture, du fait de leur grande mobilité. Parmi les insectes les plus répandus et les plus redoutés, on cite :

Les pucerons (*Aphis* sp.) qui peuvent transmettre des maladies virales, la sitone (*Sitona* sp.) et la bruche (*Bruchus* sp.) qui infeste les champs et dont les larves endommagent le grain durant le stockage.

Le contrôle chimique, dès l'application des premiers insectes, reste le moyen le plus efficace pour limiter leurs infestations.

La lentille est également sensible à la cuscute (*Cuscuta* sp.), qui est une plante parasite étouffante (INSTITUT TECHNIQUE DES GRANDES CULTURES (ITGC), 2006).

Chapitre IV

Matériel biologique et méthodologie de travail

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie, département BMC de la Faculté des Sciences biologiques et des Sciences agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO). Il a pour objectif l'étude de l'optimisation de l'effet des biosurfactants produits par la souche bactérienne de *Pseudomonas* sp sur la croissance des lentilles genre « *Lens culinaris* Medik ».

IV- Matériel et méthodes

IV-1- Matériel biologique

IV-1-1- Souche bactérienne

La souche utilisée dans cette étude appartient au genre *Pseudomonas* sp. Elle a été sélectionnée dans le cadre de travaux réalisés auparavant (KEDDOU, 2015).

IV-1-2- Les milieux de cultures utilisés

IV-1-2-1- Les milieux de cultures utilisés pour la purification de la souche

- milieux cœur cervelle (BHIB)
- milieux de gélose nutritive
- milieux Muller Hinton
- milieux Hektoen

Les milieux utilisés sont de marque NIMEDIA.

IV-2- Méthodologie de travail

IV-2-1- Revivification de la souche bactérienne

- Après l'obtention de la souche dans un tube de BHIB, elle a été ensemencé dans un autre tube BHIB neuf stérile, afin de s'assurer de la viabilité de la souche, puis incubation à 37°C pendant 24h.
- Après incubation, on procède à l'ensemencement sur un milieu solide contenant la gélose nutritive.
- Une fois les boîtes ensemencées et étiquetées, elles sont incubées à l'étuve pendant 24h à 37°C.

IV-2-2- Repiquage et purification de la souche bactérienne

- Les colonies obtenues après ensemencement sur des boîtes de pétri, ont été repiquées sur des milieux spécifiques (milieux Hektoen) afin de les purifier.
- Cette étape a eu lieu au niveau du laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou.
- Après 24 h d'incubation, l'étape de purification sur des milieux spécifiques permet d'obtenir des cultures pures.

IV-2-3- Caractérisation de la souche bactérienne**1. Aspect macroscopique**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies que ce soit à l'œil nu ou avec l'utilisation d'une loupe permet d'effectuer une première approche pour la caractérisation et l'identification par une observation globale des souches (la taille, la forme, la couleur de pigment des colonies obtenue etc.), après ensemencement sur milieu solide et incubation à 37°C pendant 24 h.

2. Aspect microscopique

Il s'agit de l'apparence microscopique des colonies que nous pouvons obtenir par différents tests tel que la coloration de Gram, et qui vient pour confirmer l'hypothèse suggérée par la première approche (l'aspect macroscopique).

2.1.La coloration de Gram

La coloration de Gram est la coloration la plus utilisée en bactériologie. C'est une coloration différentielle qui permet de distinguer les bactéries selon deux critères :

- l'aspect morphologique ;
- l'organisation de leurs parois.

Cette organisation s'effectue en deux groupes ;

- les Gram positif qui apparaissent en violettes ;
- les Gram négatif qui apparaissent en roses.

Cette différence de coloration est liée à la nature biochimique de la paroi bactérienne. Les bactéries qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram-), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (Gram+).

La coloration de Gram permet donc de se renseigner sur :

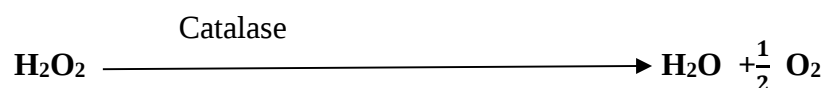
- Le type Gram (Gram + ou Gram -)
- la forme des bactéries
- la taille
- le mode de regroupement
- La pureté

Préparation du frottis :

- Stériliser la lame par l'alcool ;
- Déposer une goutte d'eau sur la lame ;
- Prélever quelques colonies à l'aide d'une anse ;
- Frotter la pointe dans la goutte d'eau ;
- Faire passer la lame au-dessus de la flamme du bec benzène afin de le fixer
- Couvrir le frottis déjà fixé avec du violet de gentiane, et laisser agir 1 minute ;
- Jeter l'excès du colorant et rincer avec de lugol pendant une minute ;
- Rincer avec de l'alcool et laisser agir 30 secondes ;
- Rincer immédiatement avec l'eau puis couvrir avec de la fuschine (colorant rose) et laisser agir une minute ;
- Rincer avec de l'eau puis laisser sécher au-dessus de la flamme du bec benzène ;
- ajouter une goutte d'huile d'émersion et observation au microscope optique (G×100),

3. Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la réaction de dégradation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en H_2O et O_2 par la réaction suivante :



Le test de catalase est l'un des principaux tests utilisés par les microbiologistes pour identifier les espèces bactériennes.

Le test est effectué en plaçant une goutte de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sur une lame de microscope et à l'aide d'une anse à boucle, prélever un échantillon de colonies à tester, la déposer sur la goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et observer.

Si le mélange produit des bulles ou une effervescence, l'organisme est dit « catalase positif » sinon est de « catalase négatif ».

IV-3- Production de biosurfactant(s)

Un milieu de glucose a été préparé pour la production de biosurfactants, au sein du même laboratoire.

IV-3-1- Préparation du milieu glucose

- Dans un Erlenmeyer de 2000 ml on a introduit les réactifs suivants : 1,6 g de K_2HPO_4 , 0,4 g de KH_2PO_4 , 0,09 g de $MgSO_4$, 15 g de $NaCl$, 0,1 g de NH_4NO_3 , 0,02 g de $CaCl_2$, 0,01 g de $ZnSO_4$, 0,05 g de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,008 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,004 g de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, 0,01 g de l'urée, 5g de glucose. Ajuster jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Agiter pour homogénéiser
- Ajuster le pH à 7
- Mettre dans un autoclave, 20 min à 120°C).

IV-3-2- La Pré-culture

Dans un Erlenmeyer de 500 ml, 200 ml du milieu de culture glucose avec un PH de 7, ont étéensemencé avec 4 ml de la suspension bactérienne standardisée.

La pré-culture a duré 48 heures agitées à l'aide d'un diffuseur d'air à température ambiante de 27 °C, sous aération continue avec un débit d'air de 0.121ml/mn/ml.

IV-3-3- La culture

Dans un Erlenmeyer de 1litre, 500 ml du milieu de culture de glucose ont étéensemencé avec 200 ml de la pré-culture puis incubé à température ambiante de 27 °C pendant 7 jours avec une agitation continue à l'aide d'un diffuseur d'air avec un débit de 0.034ml/mn/ml (**Figure 15**).

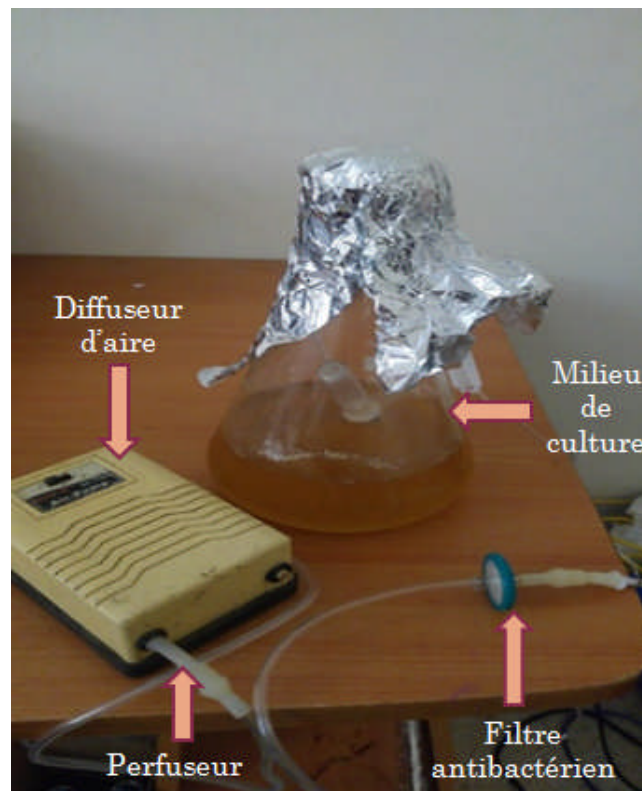


Figure 15 : Photo indiquant la méthode d'incubation à l'aide d'un diffuseur d'air pour la production de biosurfactant.

Comme cette image le montre, le diffuseur d'air est relié à notre culture par deux perfuseurs, qui sont reliés entre eux avec un filtre antibactérien, qui nous permet de filtrer l'air qui passe, et d'éviter les contaminations.

IV-4- Suivi de la cinétique de croissance de la souche bactérienne

IV-4-1- Mesure de la densité optique

Pour le suivi de la croissance bactérienne, nous avons mesuré la densité optique durant toute la période d'incubation à l'aide d'un spectrophotomètre avec une longueur d'onde de 600 nm pendant 7 jours.



Figure 16 : Photo représentant un Spectrophotomètre.

IV-4-2- Index d'émulsification E₂₄

L'index d'émulsification permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (hydrocarbure) dans une phase hydrophile (milieu de culture).

Il a été mis au point par BRODRICK et COONEY pour être ensuite modifiée par FRANCY *et al.*, (1991) et BODOUR *et al.*, (2004).

Le test consiste à mélanger dans un tube à essai : 2 ml de gasoil avec 2 ml du milieu de culture centrifugé à 3000 tours /min pendant 20 min afin d'éliminer les cellules bactériennes et utiliser le surnageant.

Après agitation à l'aide d'un vortex pendant 2 min, les tubes sont laissés au repos pendant 24h à température ambiante, ensuite nous procédons aux mesures de l'index d'émulsification en utilisant l'équation 2. C'est le rapport de la hauteur d'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange dans le tube, le tout multiplié par 100.

$$E_{24} = (H_e / H_t) \times 100$$

..... (Equation 2).

Dont :

- **H_e** : hauteur d'émulsion ;
- **H_t** : hauteur totale du mélange.

IV-5- Extraction du biosurfactant

Les biosurfactants sont extraits en utilisant la méthode de **SILVA *et al.*, (2010)**. Selon le protocole suivant :

- L'extraction du biosurfactant du milieu de culture se fait par centrifugation à 5000 tours/30 min ;
- Le surnageant est récupéré et ajusté à un pH de 2 en utilisant du Hcl 6M,
- Ensuite le même volume de chloroforme / méthanol ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$) est ajouté au surnageant et mélangé rigoureusement pendant 15 min ; observation de la séparation de deux phases organique et inorganique,
- La phase organique est enlevée, et l'opération est répétée une deuxième fois ;
- Le produit concentré dans la phase organique est mis dans un Rota-vapeur (pour extraire les biosurfactants) jusqu'à évaporation du solvant. **(Figure 17)**
- A la fin, un produit visqueux jaunâtre est obtenu auquel du méthanol est ajouté.
- Le mélange est laissé à température ambiante jusqu'à évaporation du solvant (méthanol).



Figure 17 : Extraction du biosurfactant à l'aide du rota-vapeur de type Heidolph

IV-5-1- Caractérisation du biosurfactant

➤ Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (**FTIR : *Fourier Transformed InfraRed spectroscopy***) est une méthode d'analyse chimique basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau à analyser.

Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Cette méthode d'analyse est simple à mettre en œuvre et non destructive.

Elle est fondée sur le principe que les molécules absorbent à des fréquences qui sont caractéristiques de leur structure. Ces dernières correspondent à l'énergie de transition de liaisons vibrantes. Le spectre IR qui résulte permet d'identifier les liaisons.

L'appareil de mesure est un "spectrophotomètre à transformée de Fourier" (PerkinElmer Spectrum two). Il projette sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde sous lesquelles le matériau absorbe les photons, ainsi que les intensités de cette absorption (**Figure 18**).

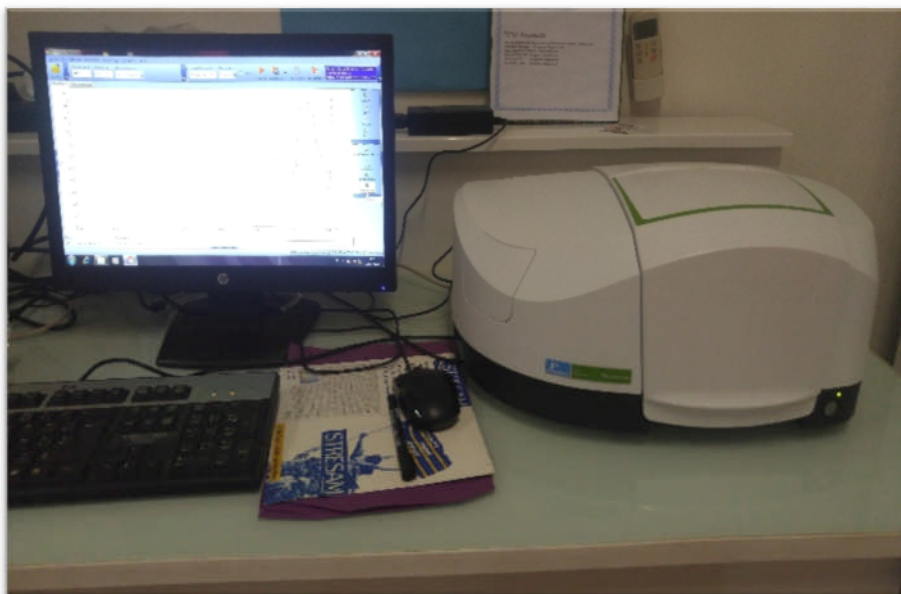


Figure 18: Spectrophotomètre Infrarouge à Transformée de Fourier (Perkin Elmer Spectrum two).

➤ **Méthodologie de travail**

- 4 mg de KBR (Bromure de Potassium) avec 0.1g de notre échantillon (le biosurfactant) ; sont mélangés rigoureusement jusqu'à obtention d'une pâte ;
- Une petite quantité de cette pâte est placée sur un moule, puis passée au compresseur pour obtenir un disque ;
- Le disque est retiré délicatement et le poser sur la plaque du spectroscope et observer (**Figure 19**).

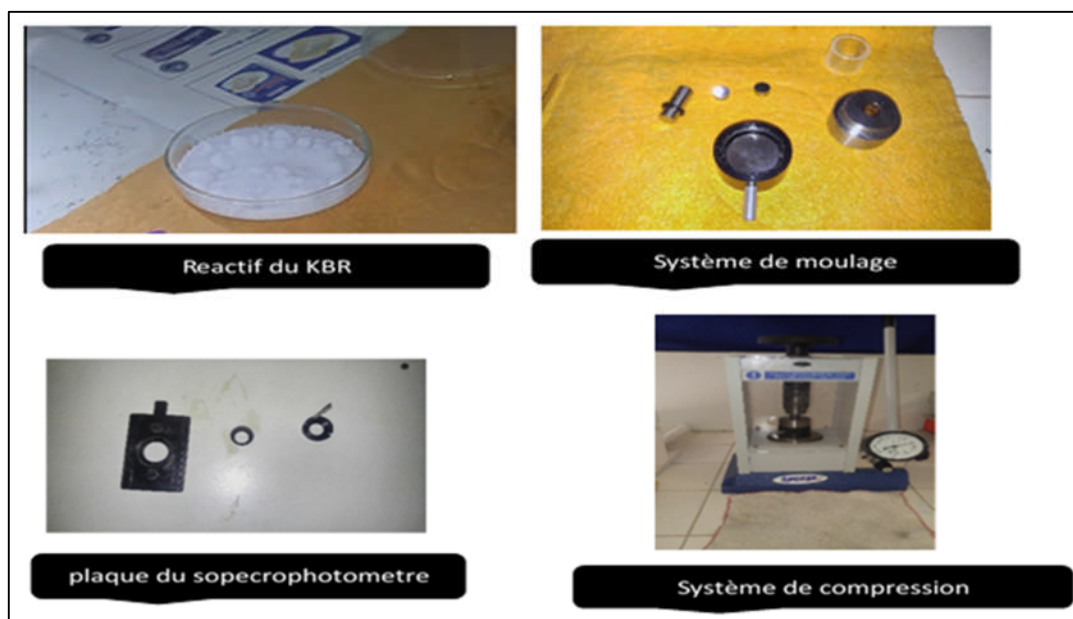


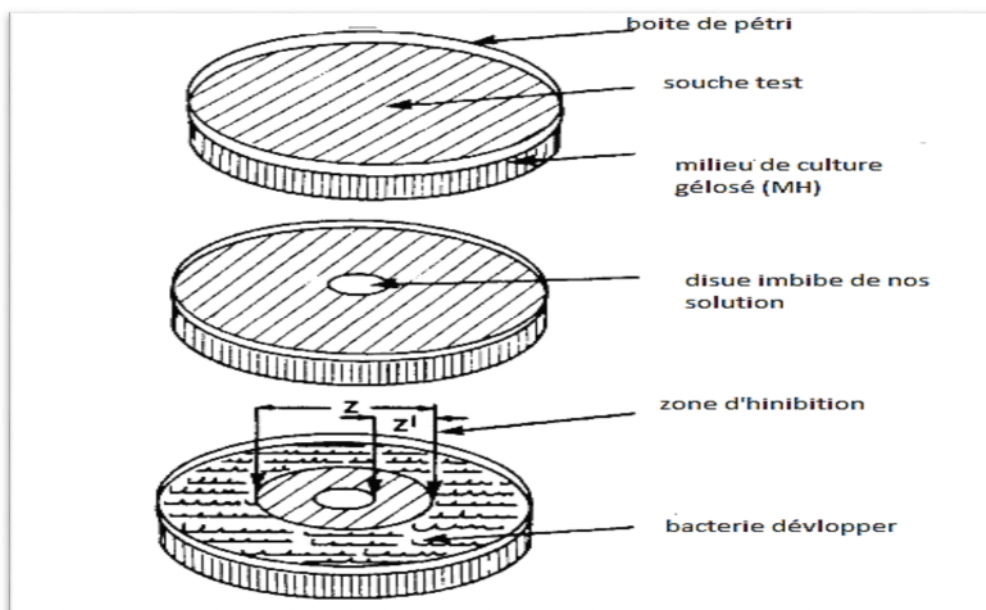
Figure 19: Les étapes de la Spectroscopie à Transformée de Fourier

IV-5-2- Etude de l'effet antibactérien du biosurfactant produit

Nous avons entrepris dans cette étude de l'effet antibactérien éventuel du biosurfactant produit, sur certaines souches bactériennes. Pour ce faire nous avons utilisé ;

- Quatre souches bactériennes : *E.coli*, *Bacillus cereus* (ATCC14579), *Klebsiella pneumonia* et *Staphylococcus aureus* MU50 ;
- 0,18g de notre échantillon de biosurfactant ont été dilués dans 3 ml d'eau distillée, ce qui nous fait une concentration de 0,06g/ml) ;
- Nous avons effectué des dilutions pour cette solution mère à savoir 1/2, 1/5, 1/10, et utilisé pour chaque souche un témoin positif spécifique, et un témoin négatif qui est de l'eau distillée.

- Les témoins positifs sont des antibiotiques de référence : il s'agit de :
 - Néomycine pour *Bacillus*
 - Céfoxitine (FOX) pour *Klebsiella*
 - Colistine (CS) pour *E.coli*
 - SXT pour *Staphylococcus*
- Après standardisation des souches, nous avons ensemencé des boîtes de pétri contenant le milieu Muller Hinton (MH),
- Nous avons utilisé des disques fabriqués à base du papier wattman,
- Dans chaque boîte ensemencée avec nos bactéries, nous avons disposé 4 disques,
 - 1 —————> Disque imbibé avec la solution mère
 - 2 —————> Disque imbibé avec la solution diluée à 1/2
 - 3 —————> Disque imbibé avec la solution diluée à 1/5
 - 4 —————> Disque imbibé avec la solution diluée à 1/10
- Ensemencement de deux autres boîtes pour chaque bactérie dans lesquelles nous avons disposé les témoins négatifs et les témoins positifs ;
- Incubation des boîtes à 37 °C pendant 24h.



**Figure 20: Illustration montrant la méthode d'antibiogramme avec des disques
(ZAIKA ,1987)**

IV-6- Optimisation de l'effet du biosurfactant produit sur la croissance de la plante

(Lens culinaris)

Selon les travaux réalisés par nos camarades précédemment MOUFOUK et KABOUCHE intitulé (cinétique de production de biosurfactants par une souche de *Pseudomonas* cultivée sur milieux empiriques et évaluation de deux effets : antimicrobien et stimulateur de croissance), il s'est avéré que le biosurfactant produit par la souche *Pseudomonas sp* possède une influence positive sur la croissance de la lentille (*Lens culinaris*). Notre objectif est de connaître la concentration optimale de ce dernier, à côté de deux autres paramètres.

Dans cette partie de notre travail, nous avons pour but d'optimiser la croissance de la lentille (*Lens culinaris*), en faisant varier trois paramètres (température, pH et concentration en biosurfactants obtenus), et mesurer la réponse selon : la hauteur, le poids sec, et le pourcentage de germination. Pour cela, nous avons fait appel à un logiciel informatique « STATISTICA » (Release version 7).

A la fin de ces expériences, nous allons introduire les réponses dans le logiciel afin de déduire la combinaison parfaite entre la température optimale, la concentration optimale du biosurfactant, et le pH optimum.

La matrice est sous forme de valeurs codées et pour déduire les valeurs réelles, l'Equation 3 est utilisée.

$$X = \frac{x - [x_{\max} + x_{\min}]/2}{[x_{\max} - x_{\min}]/2} \dots\dots\dots \text{(Equation 3)}$$

Avec :

- X : la valeur codée ;
- x : des valeurs réelles, dont :
- $x_{\min}$: la valeur minimale ;
- $x_{\max}$: la valeur maximale.

La matrice qui a été formée par le logiciel est indiquée dans le (Tableau VI)

Tableau VI : Tableau indiquant la matrice formé par le logiciel STATISTICA

Nombre d'expériences	Température	pH	Concentration en biosurfactants
1	-1,00000	-1,00000	-1,00000
2	-1,00000	-1,00000	1,00000
3	-1,00000	1,00000	-1,00000
4	-1,00000	1,00000	1,00000
5	1,00000	-1,00000	-1,00000
6	1,00000	-1,00000	1,00000
7	1,00000	1,00000	-1,00000
8	1,00000	1,00000	1,00000
9	-1,68179	0,00000	0,00000
10	1,68179	0,00000	0,00000
11	0,00000	-1,68179	0,00000
12	0,00000	1,68179	0,00000
13	0,00000	0,00000	-1,68179
14	0,00000	0,00000	1,68179
15	0,00000	0,00000	0,00000
16	0,00000	0,00000	0,00000

(-1 ; 1 ; 0,0 ; -1,68179 ; 1,68179) sont des valeurs codées, avec :

- (-1) valeur minimale ;
- (1) valeur maximale ;
- (0) valeurs moyennes ;
- (-1,68179) pour des valeurs inférieure a la minimale ;
- (1,68179) pour des valeurs supérieure a la maximale.

Dans cette partie du travail et pour chaque paramètre, il faut fixer :

- Une valeur réelle maximale et minimale ;
- Puis déduire la valeur moyenne de chacun ;
- Ensuite à l'aide de **l'équation 3** on calcule les valeurs réelles codées par (-1,68179 et 1,68179) pour chaque paramètre.

Après avoir effectué tous les calculs nous avons obtenu le tableau suivant :

Tableau VII : Tableau représentant les combinaisons des expériences en valeurs réelles

	Température (°C)	pH	Concentration du biosurfactant (g/50 ml)
1	19	4	0,02
2	19	4	0,2
3	19	8	0,02
4	19	8	0,2
5	25	4	0,02
6	25	4	0,2
7	25	8	0,02
8	25	8	0,2
9	17	6	0,11
10	27	6	0,11
11	22	2,63	0,11
12	22	9.36	0,11
13	22	6	0,041
14	22	6	0,26
15	22	6	0,11
16	22	6	0,11

IV-7- La culture des lentilles *Lens culinaris*

Pour la culture des lentilles, nous avons conçu un protocole nous-mêmes (**Figure 21**) : il s'agit d'une boîte de carton fermée, sur laquelle nous avons fixé une lampe blanche (néon) d'une puissance de 10 W, ce qui équivaut à 100 lumens assurant l'éclairage et un thermomètre pour contrôler la température à l'intérieur de la boîte.

Les différentes valeurs de température ont été maintenues à l'aide d'un climatiseur.



Figure 21 : Dispositif expérimental utilisé

IV-7-1- Préparation des solutions d'arrosage

D'après le tableau, nous avons besoin de 9 solutions d'arrosage. De ce fait, nous avons pris 9 flacons dans lesquels nous avons versé 50 ml d'eau minérale (Lala Khadija). Dans chaque flacon, nous avons dissous respectivement les concentrations de biosurfactant et réglé le pH comme il est indiqué dans le tableau de la matrice.

IV-7-2- La culture

Les étapes ci-dessous sont réalisées dans l'ordre pour les cinq expériences correspondant aux cinq températures. (17 °C, 19°C, 22°C, 25°C, 27°C).

- Nous avons préparé 5 boîtes de pétri bien étiquetées ;
- Dans chaque boîte, nous avons déposé 15 graines de lentilles bien lavées, que nous avons recouvert avec 50 g de terre préalablement autoclaver, pendant 20 min à 120°C ;
- Puis nous les avons arrosés avec les solutions adéquates pondant 8 jours.

Chapitre V

Résultats et discussion

V-1-Résultats des tests de vérification de la pureté de la souche**V-1-1- Etude macroscopique**

Après ensemencement de la souche sur de la gélose nutritive et milieu Hektoen, puis incubation à 37°C pendant 24h, les résultats sont comme suite :

Sur gélose nutritive nous avons observé l'apparition de colonies irrégulières de couleur blanc jaunâtre visqueuse, et sur milieu Hektoen nous avons observé de petites colonies de couleur bleu-vert bombée (**Figure 22**).

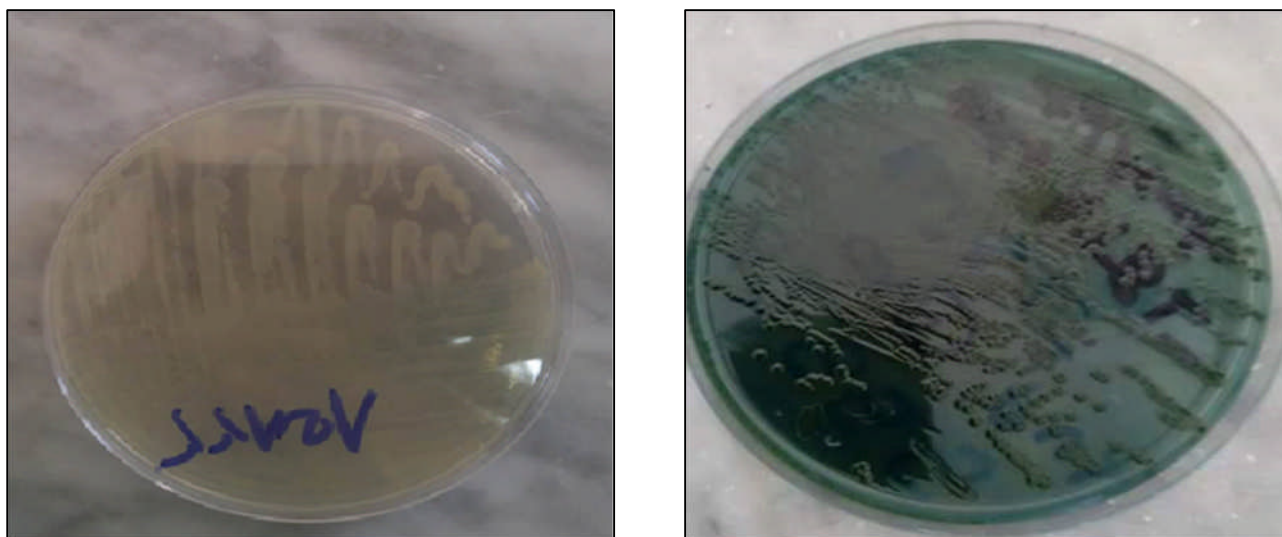


Figure 22 : Aspect macroscopique de la souche *Pseudomonas* sp. cultivée sur les deux milieux GN et Hektoen.

V-1-2- Etude microscopique

Pour confirmer l'hypothèse posée après l'étude macroscopique, une coloration de Gram a été réalisée, ainsi qu'un test de catalase.

A l'issue de cette étape (coloration de Gram) et après observation au microscope photonique, nous avons pu distinguer la forme, le type et l'arrangement des cellules où nous avons observé des cellules de forme bâtonnet, coloré en rose, arranger en mono et diplo-bacille (**Figure 23**).

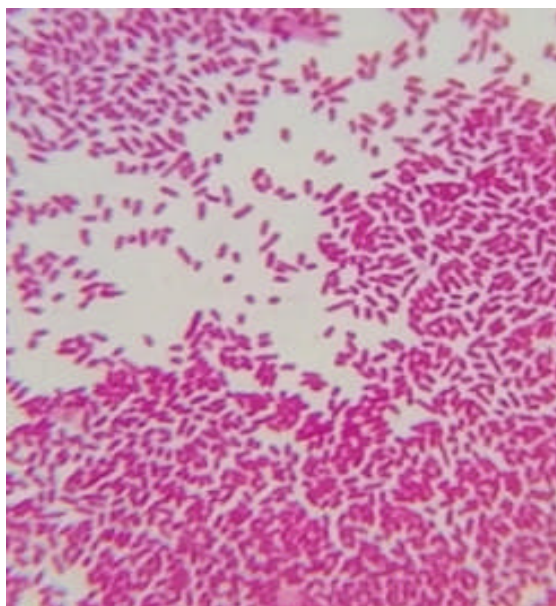


Figure 23 : La coloration de gram après observation au microscope photonique G100

V-1-3- Test de la catalase

Après la disposition d'une goutte de H_2O_2 sur une lame préalablement stérilisée avec de l'alcool, et le dépôt d'un petit échantillon de notre souche à tester, sur la goutte de H_2O_2 , nous avons observé une effervescence immédiate (**Figure 24**).



Figure 24 :L'effervescence après le test de catalas

D'après les résultats macroscopiques et microscopiques obtenus, et le résultat de test de catalase, nous pouvons déduire que notre souche peut être rattachée au genre *Pseudomonas* sp.

Les *Pseudomonas* sp. sont des bacilles à Gram négatif, opportuniste mobile grâce un flagelle polaire. Les souches du genre *Pseudomonas* sont dépourvues de spores et de capsules. elles apparaissent plus souvent isolées ou en diplobacille.

V-2- Le suivi de la croissance bactérienne

Le suivi de la croissance bactérienne dans le milieu glucose a été réalisé par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm pendant toute la période d'incubation,

D'après les résultats obtenus, nous avons pu tracer la courbe suivante (**Figure 25**).

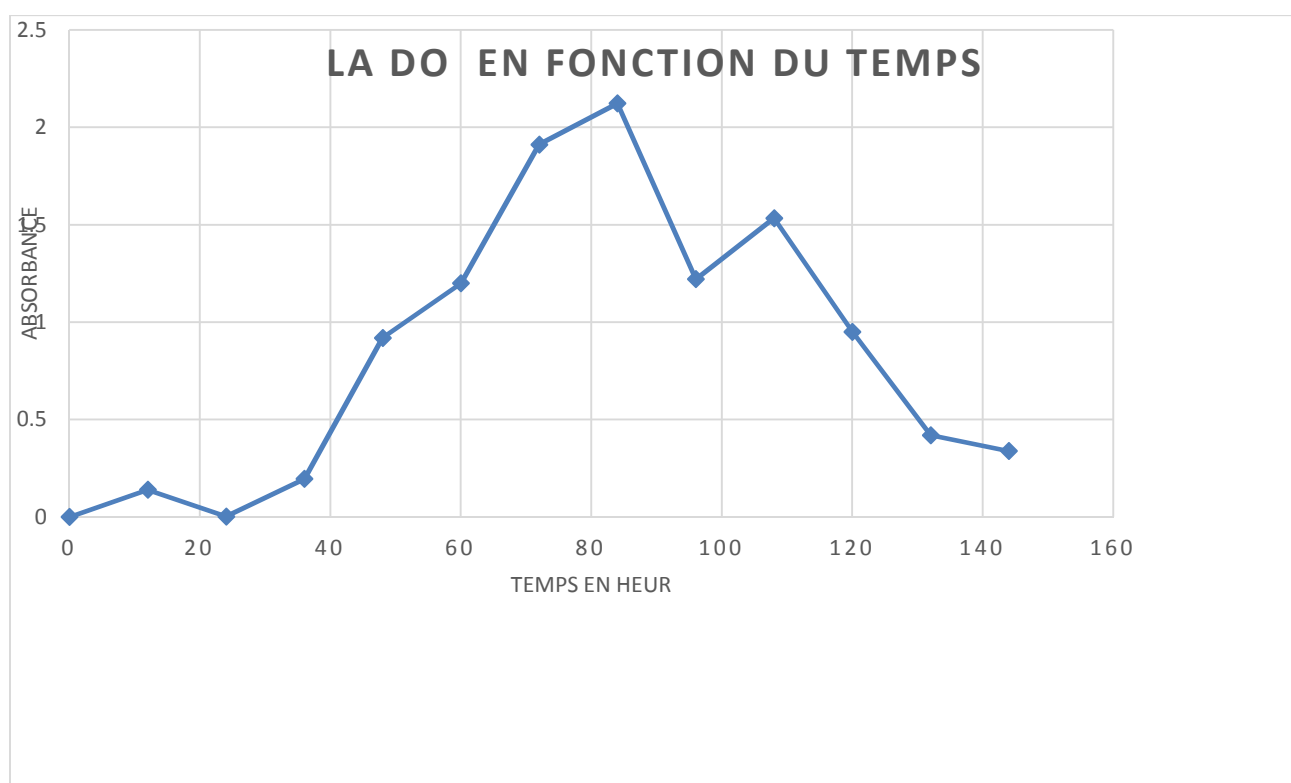


Figure 25 : Le suivi de la croissance de la souche *pseudomonas* sp. sur le milieu glucose.

La courbe de croissance de notre souche *Pseudomonas* sp. ressemblait à une courbe typique de croissance bactérienne, caractérisée par une courte phase de latence, suivie par une

longue phase de croissance exponentielle, puis par une brusque phase de déclin due à l'épuisement des nutriments dans le milieu.

V-3- Extraction du biosurfactant

Après le passage de la phase organique au rota-vapeur pour l'extraction du biosurfactant, nous avons obtenu une poudre, elle est représentée dans la (Figure 26).

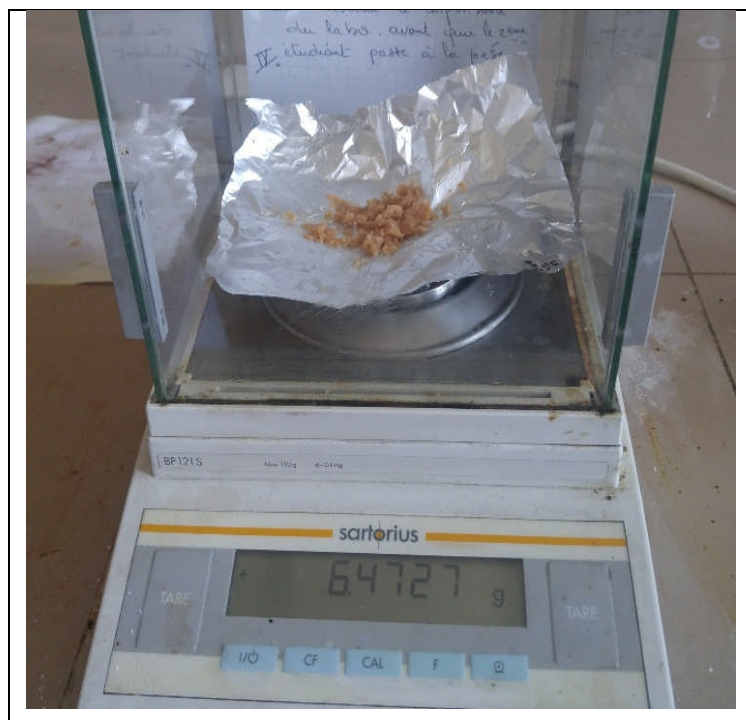


Figure 26 : Pesage du biosurfactant produit

Comme nous le montre la figure ci-dessus, nous avons obtenu une production de 6.4727g de biosurfactant pour 700 ml de milieu de culture utilisé.

V-4- Caractérisation du biosurfactant produit

Après l'analyse du biosurfactant produit par la souche *pseudomonas* sp. Avec d'un spectroscope infrarouge à transformé de Fourier, nous avons obtenu un spectre (Figure 27) qui comporte une zone de nombre d'ondes qui s'étend de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} . Le spectre montre dans cette zone le O-H lier (alcool) une vibration d'élongation à $3369,18\text{ cm}^{-1}$, le C-H une vibration d'élongation à $2932,25\text{ cm}^{-1}$. Ensuite vient C-O une vibration d'élongation de $1734,84\text{ cm}^{-1}$ suivi par la suite par le C=C vibration d'élongation de $1634,04\text{ cm}^{-1}$. Dans la zone 1404 cm^{-1} nous observons un pic représentant le O-H d'une vibration de déformation, une

vibration d'élongation C-O à $1076,51\text{ cm}^{-1}$, et une autre vibration d'élongation C=CH vers 800 cm^{-1} et une vibration d'élongation C-H vers 700 cm^{-1} .

D'après les résultats obtenus, et en les comparant à l'intensité des pics des tables IR, nous avons pu déduire que le biosurfactant produit semble appartenir à la classe des glycolipides (peut être des rhamnolipides). Et cela est dû à la présence des vibrations d'élongation OH qui représentent les OH liés du cycle glycosidique et ceux des groupements COOH.

Les CH représentent les CH_2 des chaînes d'acides gras. Et les vibrations d'élongations C-O représentent les liaisons éther entre les deux acides gras du glycolipide.

Les rhamnolipides sont un type de biosurfactant de nature glycolipidique qui contient une ou deux molécules de rhamnose liées à une ou deux molécules d'acide β -hydroxydécanoïque. Les souches *Pseudomonas* sont connues pour leur production de ce type de polymère.

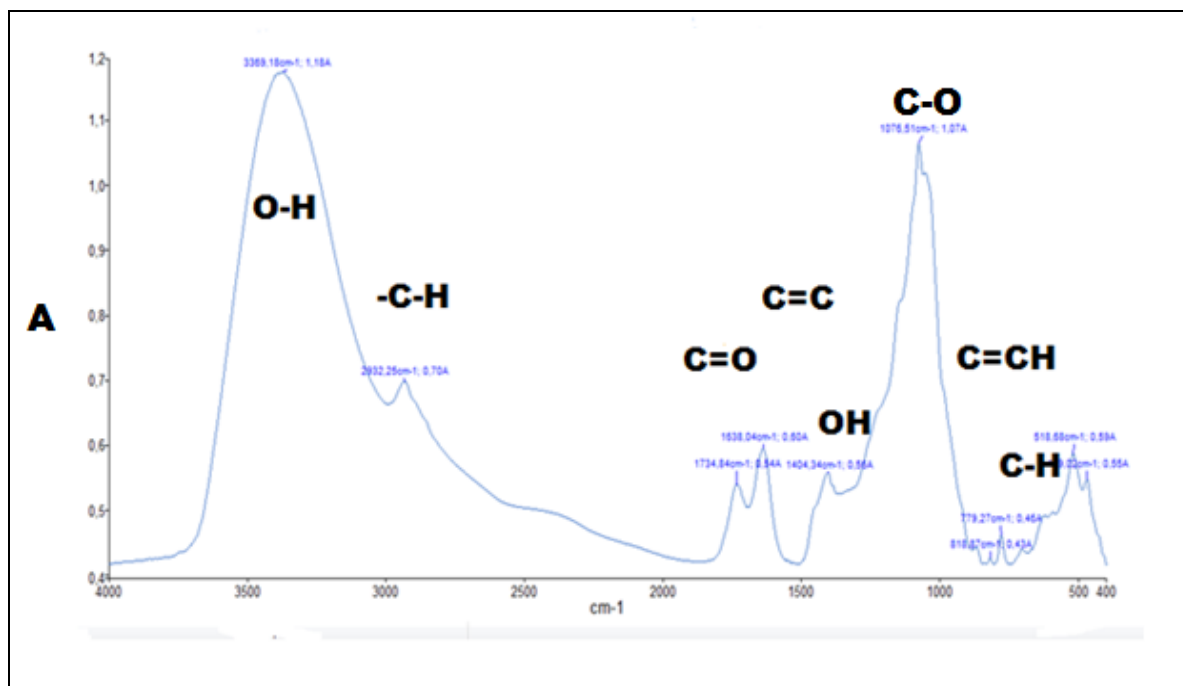


Figure 27 : Caractérisation du biosurfactant produit par spectroscopie à transformée de Fourier.

V-5- Etude de l'effet antibactérien du biosurfactants produit :

Nous avons effectué des tests pour vérifier si le biosurfactant produit présente des effets antibactériens éventuels.

Après incubation de nos boîtes contenant les souches à tester avec les disques imbibés de solution de biosurfactants, à 37 °C pendant 24h. Nous avons obtenu des résultats représentés dans le tableau suivant (**Tableau VIII**).

Tableau VIII : Effet antibactérien du biosurfactants produit.

Concentration Du biosurfactant	<i>Bacillus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>E.coli</i>
Solution Mère	-	-	-	-
Dilutions ½	-	-	-	-
Dilutions 1/5	-	-	-	-
Dilutions 1/10	-	-	-	-
L'antibiotique de référence	<i>Bacillus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>E. coli</i>
Neomycine	+			
Cefoxytine (FOX)		--		
Colistine				+
SXT			+	
Témoin négatifs	-	-	-	-

D'après les tests effectués sur les quatre souches bactériennes : *E. coli*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, nous avons remarqué que la solution mère des biosurfactants avec une concentration de 0.06 g/ml, ainsi que les différentes dilutions,

n'avaient pas eu d'effet antibactérien sur ces souches, qui peut être expliquée par le fait que la concentration du biosurfactants utilisé n'étaient pas suffisantes.

D'après des recherches effectuées dans ce domaine, il a été démontré que les biosurfactants ont un effet antibactérien, et aussi un effet anti fongique et antiviral. Ainsi, **NITSCHKE et al.,(2010)** ont rapporté une activité antibactérienne des rhamnolipides produits par la souche *Pseudomonas aeruginosa*, contre de nombreuses bactéries incluant *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*. Comme l'ont aussi souligné **KACHHOLZ et SCHLINGMANN, 1987**, les rhamnolipides ont aussi un effet antibactérien, sans pour autant être nocif pour l'être humain et l'environnement.

V-6- Optimisation de l'effet du biosurfactant produit sur la croissance de la plante lentilles *Lens culinaris*

Dans la perspective de l'application des biosurfactants en tant que bio-stimulant de la croissance de la plante « *Lens culinaris Medik* », nous avons entrepris d'examiner les effets de trois paramètres (facteurs) qui sont : la température, pH et concentration en biosurfactants. Pour ce faire, la méthode de surface de réponse a été appliquée par le biais du logiciel STATISTICA (*Release 7.0*). Cette méthode nous a permis de déterminer une relation entre les facteurs en questions appelées variables d'entrée et trois réponses de sortie désignées par Y_1 , Y_2 et Y_3 . La première des trois correspond au poids sec en (g), la seconde représente la hauteur de la tige en (cm) et la troisième représente le taux de germination.

Au total, 17 essais expérimentaux ont été réalisés en plus du témoin négatif. Les valeurs obtenues inhérentes aux trois réponses sont indiquées dans le tableau suivant (**Tableau IX**).

Tableau IX: Les valeurs expérimentales obtenues des trois réponses (Y₁, Y₂ et Y₃)

Essai	Température	pH	Concentration en biosurfactant	Poids sec Y1	Hauteur moyenne Y2	% de germination Y3
1	19	4	0,02	0,0032 g	1,7 cm	6,66
2	19	4	0,2	0	0	0
3	19	8	0,02	0,0109 g	1,65 cm	26,66
4	19	8	0,2	0	0	0
5	25	4	0,02	0,0160 g	6,6 cm	13,33
6	25	4	0,2	0,0029 g	4,1	6,66
7	25	8	0,02	0,0876 g	12	33,33
8	25	8	0,2	0,0115 g	4,5	6,66
9	17	6	0,11	0	0	0
10	27	6	0,11	0	0	0
11	22	2,63	0,11	0,0301	1,58	40
12	22	9,36	0,11	0,0042	0,5	6,66
13	22	6	0,041	0,0431	1,53	66,66
14	22	6	0,26	0	0	0
15	22	6	0,11	0,0041	1,2	6,66
16	22	6	0,11	0	0	0
17	T(-)	-	-	0,0267 g	2,92	33,33

D'après les résultats de ce tableau, on constate que l'essai 7 avec la température de 25°C et pH de 8, et à une faible concentration en biosurfactants qui est de 0,02g/50ml donne une bonne croissance de la plante lentille « *Lens culinaris* » :

- La hauteur moyenne de (12 cm) par rapport au témoin négatif qui est de (2,92), une différence très importante ;
- Un poids sec de (0,0876 g) par rapport au témoin négatif qui est de (0,0267) ;

- Un pourcentage de germination équivalent au témoin négatif qui est de (33,33%).

D'autre part, l'essai 13 à température de 22°C avec un pH de 6, montre un pourcentage de germination élevé (66,66%) par rapport à l'essai 7 et au témoin négatif, et cela toujours à une faible concentration en biosurfactants qui est de (0,041), cependant son effet sur la croissance de la plante est faible (hauteur moyenne de 1,53 cm), par rapport au témoin qui est de 2,92 cm et l'essai 7 qui est de (12cm).

Pour ce qui est de l'essai 11, nous observons un pourcentage de germination élevé (40%) par rapport à l'essai 7 et au témoin négatif, ce malgré une concentration élevée en biosurfactants 0,11 (par rapport à 0,02) et un pH très acide (2,63), mais concernant la hauteur moyenne et le poids sec de la plante, les valeurs obtenues ne présentent pas vraiment une différence importante en comparaison avec le témoin et l'essai 7.

pour la plupart des concentrations en biosurfactants qui sont supérieures 0,02 et 0,041g/50 ml nous avons remarqué qu'il n'y a pas eu de germination de la plante étudiée.

V-6-1- Analyse de la réponse Y₁

V-6-1-1- Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y₁ (poids sec)

Sur la base de leurs effets, les trois variables ou facteurs considérés, ont été criblés, et ce, au seuil de confidentialité de 90%.

Les résultats rapportés dans le (**Tableau X**) montrent que les facteurs X₁ (température) et X₃ (concentration en biosurfactants) semble exercer un effet linéaire significatif sur la réponse Y₁ (le poids sec de la plante) avec une p-value ($p < 0,1$) qui sont respectivement de 0,076805 pour X₁ et 0,040284 pour X₂.

On constate par ailleurs, que la valeur quadratique de X₃ (concentration en biosurfactant) exerce un effet significatif par une ($p < 0,1$) qui est de 0,095665. Le reste des effets quadratiques ne sont pas significatifs car la valeur de la p-value est supérieure à 0,1.

Les effets significatifs de l'interaction entre les différents facteurs, pris deux par deux, montrent en premier lieu l'effet d'interaction de X₁ et X₂, qui ont un effet significatif positif sur la réponse Y₁, alors que le facteur X₂ seul il n'exerce aucun effet. par conséquent, on constate que l'interaction des facteurs X₁ et X₂ agit sur le poids de la plante.

Cependant, l'interaction des deux autres facteurs X₁ et X₃ exerce un effet significatif négatif qui est de (-9,15854), qui se traduit par le fait que si un facteur exerce un effet positif,

le deuxième exerce un effet inverse, c'est-à-dire que l'autre paramètre va agir négativement et vice-versa, aussi pour ce qui est de l'interaction entre X_2 et X_3 (-8,62195), ont un effet significatif mais agissent négativement.

Tableau X : Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y1.

Facteur	Poids sec					
	Effet	Erreur standard	T	P	-95% Cnf.Limt	+95% Cnf.Limt
Constante (ordonnée à l'origine)	0,007268	0,001807	4,0226	0,155117	-0,015689	0,03022
Température (Linéaire X_1)	0,013139	0,001593	8,2485	0,076805	-0,007101	0,033379
Température (Quadratique X_1^2)	-0,006311	0,001804	-3,4989	0,177226	-0,029230	0,001660
pH (linéaire X_2)	0,004442	0,001587	2,7990	0,218446	-0,015721	0,02460
pH (Quadratique X_2^2)	0,005969	0,001775	3,3632	0,183989	-0,016581	0,02851
Concentration du biosurfactant (X_3 linéaire)	-0,024245	0,001536	-15,7822	0,040284	-0,043764	-0,004725
Concentration du biosurfactants (quadratique X_3^2)	0,011811	0,001788	6,6045	0,095665	-0,010912	0,03453
Interaction $X_1 X_2$	0,018125	0,002050	8,8415	0,071699	-0,007923	0,04417
Interaction $X_1 X_3$	-0,016585	0,001811	-9,1585	0,069237	-0,039593	0,00642
Interaction $X_2 X_3$	-0,015613	0,001811	-8,6220	0,073509	-0,038622	0,00739

Si $P < 0,1$ l'effet est significatif.

➤ Le diagramme de Pareto

C'est un histogramme qui permet de visualiser l'importance des différentes parties ou catégories d'un ensemble précédemment analysé et chiffré, sous la forme d'un classement.

Il affiche les valeurs des effets standardisés et établit une ligne de référence sur le diagramme. Tout effet qui dépasse cette ligne de référence est potentiellement important.

En d'autres termes, il permet d'identifier les effets les plus influents sur la réponse étudiée et de détecter les effets des facteurs les plus importants et leurs interactions sur un processus.

Les effets standardisés sont calculés en divisant l'effet par son erreur standard (NEUREITER et *al.*, 2002 ; ANDERSON et WHITCOMB, 2015).

Les valeurs numériques des effets standardisés des trois facteurs sur la réponse Y1 sont illustrées dans le diagramme de Pareto (**Figure 28**).

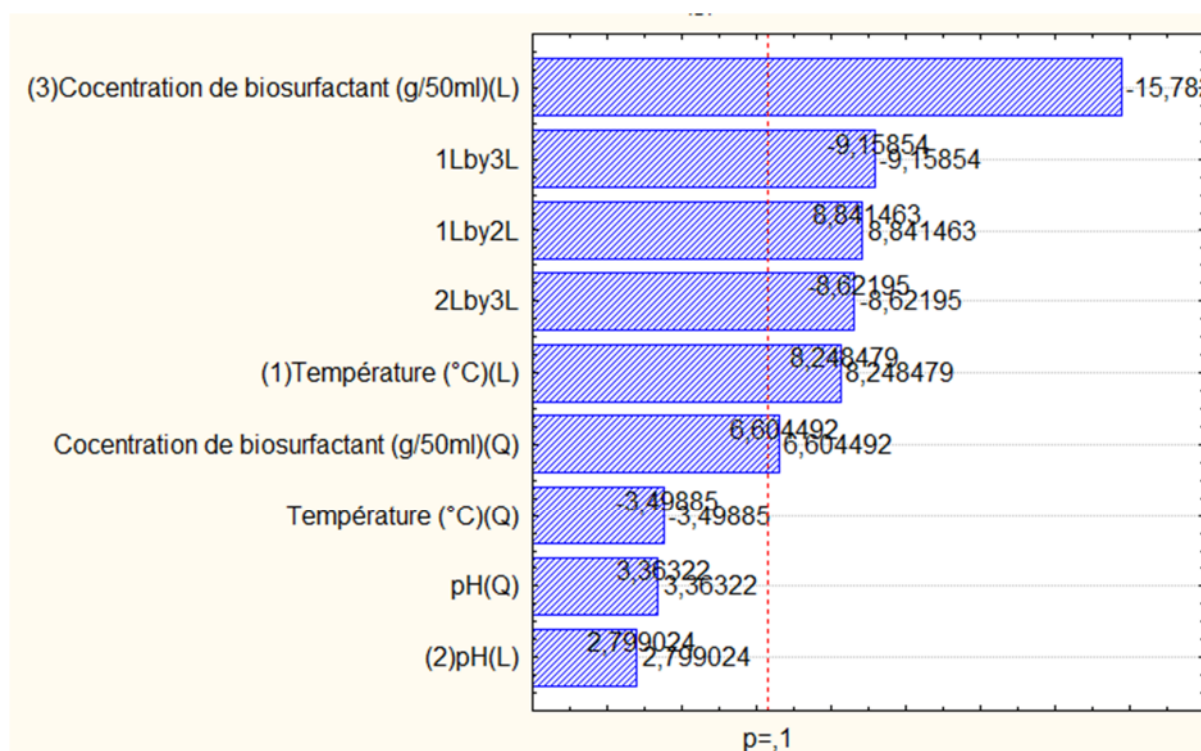


Figure 28 : Diagramme de Pareto des effets sur la réponse Y1 (poids sec)

Les résultats rapportés dans ce diagramme montrent que les facteurs ayant un effet significatif ($p < 0,1$), influent soit négativement ou positivement sur la réponse Y1.

D'après le diagramme nous constatons que L'effet linéaire du 3^{ème} paramètre X3 (concentration en biosurfactants) qui est de l'ordre (-15,78) exerce un effet significatif négatif très important sur la réponse Y1, dépasse très largement la ligne de référence qui est de 0,1. Ce qui démontre, que la croissance de la plante est favorisée à des faibles concentrations en biosurfactants qui se traduit par poids sec de notre plante. (**Tableau IX**).

Nous constatons également que l'effet linéaire du premier paramètre (température), qui est de l'ordre (8.24), exerce un effet significatif positif important sur la réponse Y1 puisqu'elle est supérieure à la valeur seuil de (0,1). Ce qui signifie que plus on augmente la

température plus nous avons une croissance qui se traduit par une masse importante de notre plante après séchage.

L'interaction des deux paramètres X_1 et X_3 qui est de l'ordre de $(-9,15)$ est significativement négatif. Cela signifie que si l'un des facteurs agit d'une manière positive sur poids sec de notre plante (réponse Y_1) l'autre paramètre va inhiber l'effet du premier, en agissant négativement comme de cas de la concentration en biosurfactant et le pH.

L'interaction du premier paramètre X_1 (température) X_2 (pH) qui est de 8,24, exerce un effet significativement positif important sur la réponse Y_1 .

V-6-1-2-Modélisation de la réponse Y_1

L'estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y_1 est donnée dans le (Tableau XI).

Tableau XI : Estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y_1 .

Facteurs	Poids sec en g	
	Coefficient de régression	Erreur standard
Constante (ordonnée à l'origine)	-0,086764	0,056835
X_1 linéaire	0,012744	0,004554
X_1 quadratique	0,000351	0,000100
X_2 linéaire	-0,035156	0,004664
X_2 quadratique	0,000746	0,000222
X_3 linéaire	0,681817	0,097200
X_3 quadratique	0,934399	0,141479
Interaction entre X_1 et X_2	0,001510	0,000171
Interaction entre X_1 et X_3	-0,34769	0,003796
Interaction entre X_2 et X_3	-0,049097	0,005694

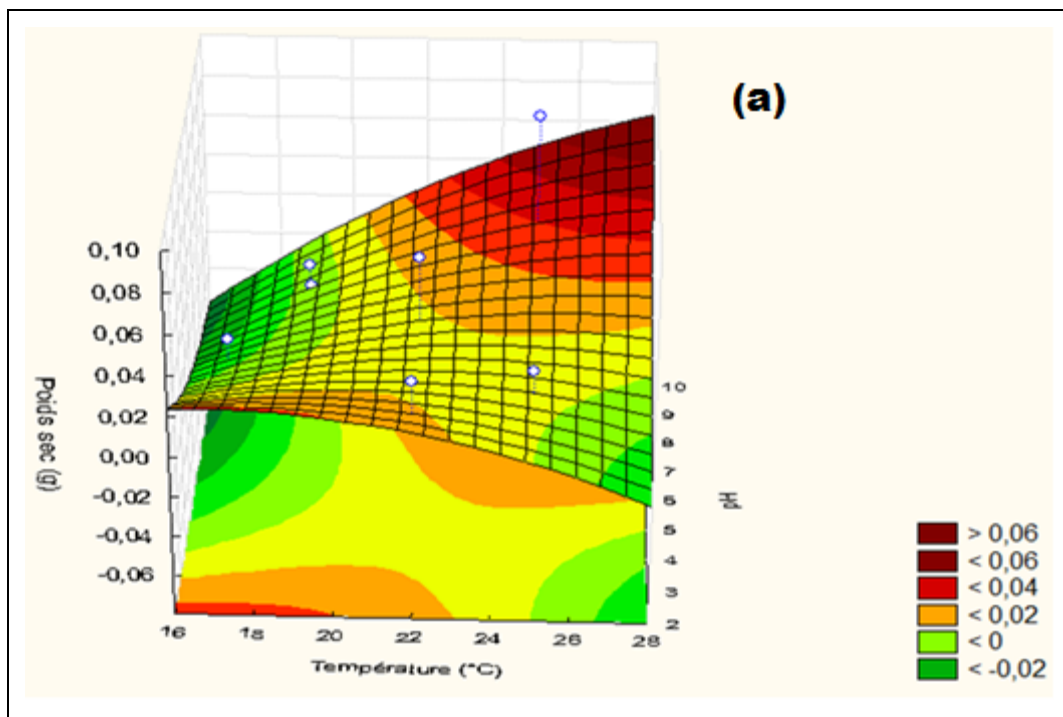
Les valeurs de ces coefficients sont utilisées pour établir le modèle mathématique du second degré associé à la réponse Y1. L'équation du modèle s'écrit comme suit (**Equation 5**) :

$$Y1 = -0,086764 + 0,012744 X1 - 0,000351 X1^2 - 0,035156 X2 + 0,000746 X2^2 + 0,681817 X3 + 0,93499 X3^2 + 0,001510 X1 X2 - 0,034769 X1 X3 - 0,049097 X2 X3.$$

V-6-1-3. Représentation graphique des surfaces de réponses associée à la réponse Y1

Les surfaces de réponses présentent les variations d'une réponse donnée en fonction de deux facteurs à la fois, les autres facteurs étant maintenus constants.

La (**Figure 29**) représente les surfaces de réponses associées à la réponse Y1.



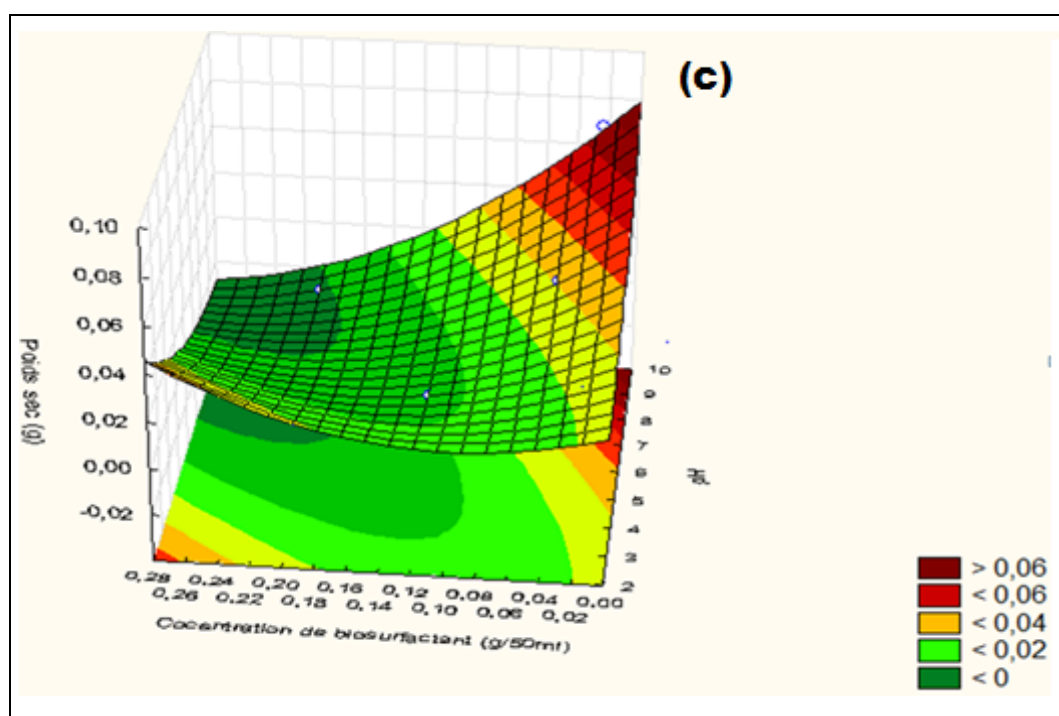
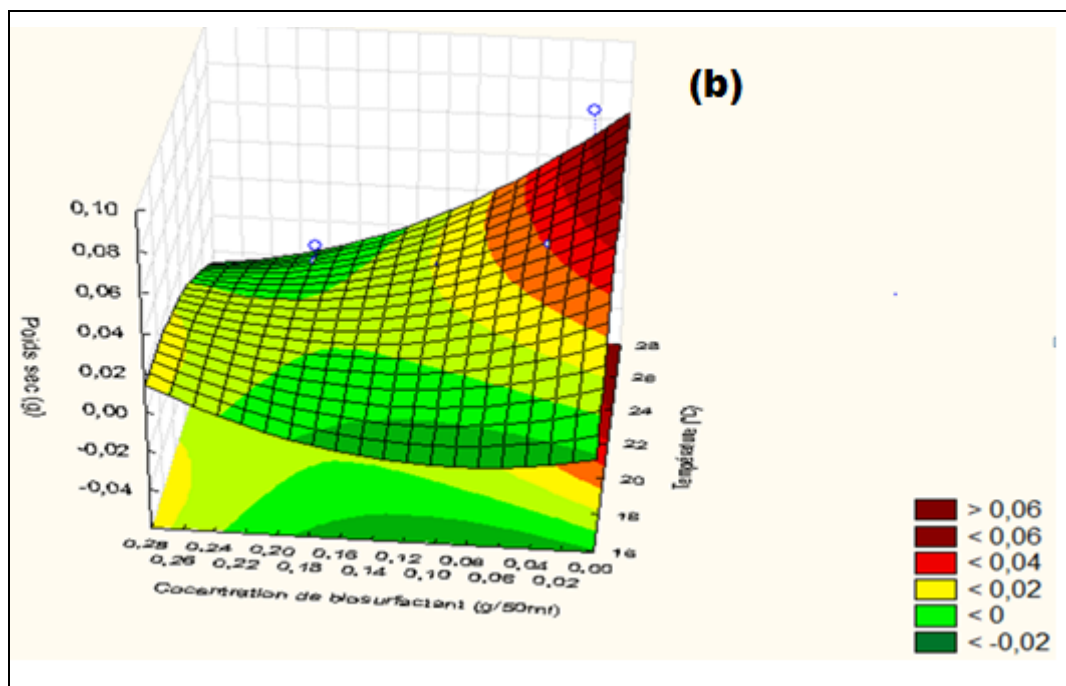


Figure 29 : Représentation des surfaces de réponse associées à la réponse Y1.

La surface de réponse est représentée en trois dimensions dans la **figure 29 (a)** avec la variation de deux paramètres à la fois (température et pH), la réponse étant le poids sec de la

plante après séchage. La partie rouge du graphe correspond aux valeurs maximales de la réponse.

Un maximum de réponse pour un poids sec compris entre 0,04g et 0,08 g est enregistré pour des valeurs de température comprises entre 22°C et 28°C et de pH allant de 6 à 10 (**figure 29 c**).

LA **figure 29 (b)**, représente la surface de réponse pour la variation des deux facteurs ; la concentration du biosurfactant et la température. Un maximum de réponse de 0,04g à 0,08g est enregistré a des concentrations de biosurfactant comprise entre 0,01 et 0,10 g/50ml et des valeurs de température allant de 21°C à 28 °C.

figure 29 (c), traduit l'effet des variations de la concentration du biosurfactant et du pH sur le poids sec de la plante. Une réponse de 0,06 g à 0,10g (réponse maximale) ont été enregistré à des concentrations en biosurfactant allant de 0,01 à 0,08 g/50 ml et des pH compris entre 6 et 10.

V-6-2- Analyse de la réponse Y2

V-6-2-1-Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y2 (hauteur de la plante en cm)

Les résultats rapportés dans le (**tableau XII**) montrent que seul le facteur X1 (température) semble exercer un effet linéaire significatif sur la réponse Y2 avec une p-value est de 0,088689 (<0.1). Alors que, le reste des facteurs n'ont pas d'effet significatif sur la réponse Y2.

Tableau XII : Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y2.

Facteur	La hauteur en cm					
	Effet	Erreur standard	T	P	-95% Cnf.Limt	+95% Cnf.Limt
Constante d'ordonnée à l'origine	-0,25284	0,528797	-0,47815	0,716059	-6,97185	6,466160
Température linéaire X1	3,32489	0,466218	7,13163	0,088689	-2,59896	9,248753
Température quadratique X ²	0,82898	0,527938	1,57023	0,361012	-5,87910	7,537070
pH X2	0,43536	0,464447	0,93738	0,520571	-5,46600	6,336726
pH quadratique X2 ²	1,53628	0,519439	2,95757	0,207569	-5,06382	8,136368
Concentration du biosurfactant X3	-2,70599	0,449624	-6,01835	0,104822	-8,41901	3,007017
Concentration du biosurfactants quadratique X3 ²	2,99309	0,523425	5,71827	0,110216	-3,65766	9,643837
Interaction X1 X2	1,46250	0,600000	2,43750	0,247847	-6,16122	9,086223
Interaction X1 X3	-1,46854	0,530000	-2,77083	0,220496	-8,20283	5,265747
Interaction X2 X3	-1,09312	0,530000	-2,06250	0,287404	-7,82741	5,641164

Si $P < 0,1$ l'effet est significatif

➤ Le diagramme de Pareto

Les effets standardisés des trois facteurs sur la réponse Y2 sont représenté dans le diagramme de Pareto (**Figure 30**).

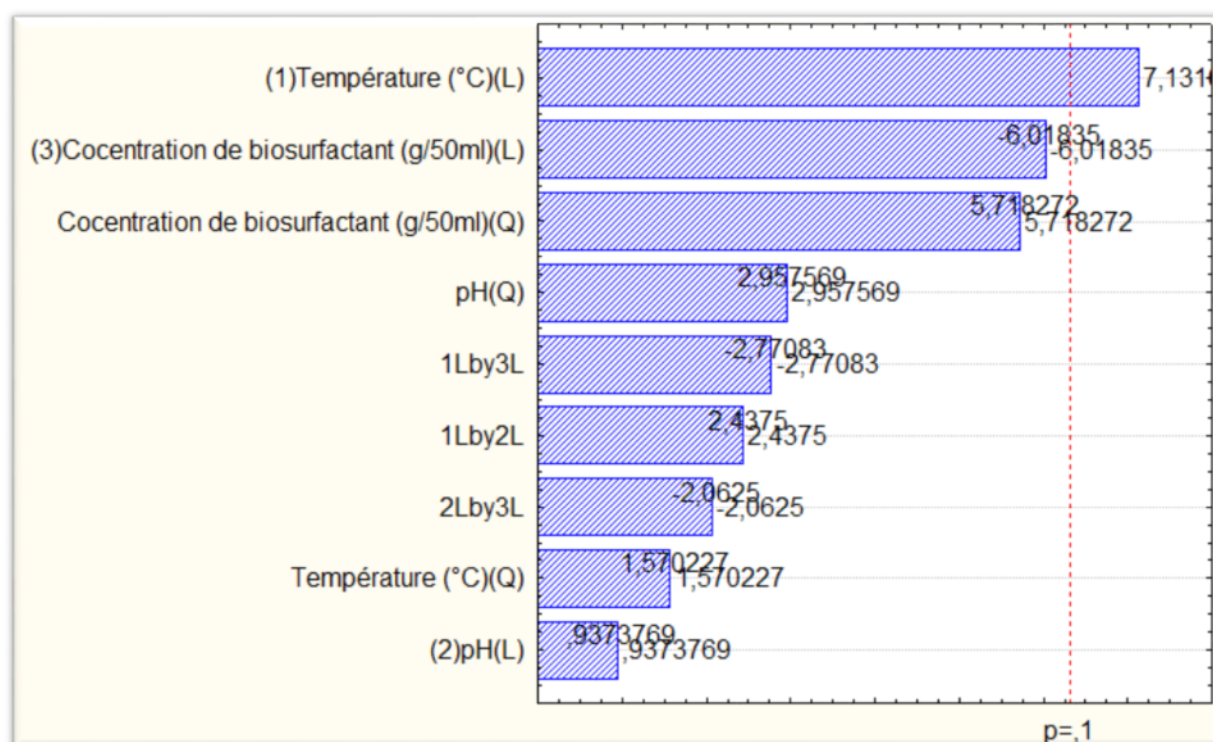


Figure 30: Diagramme de Pareto des effets des trois facteurs X1, X2, X3, sur la réponse Y2 (hauteur moyenne de la plante)

D'après le diagramme nous constatons que seul l'effet linéaire du premier paramètre X1 (température) qui est de l'ordre 7,13 exerce un effet positif significatif important sur la réponse Y2, plus nous augmentons la température plus nous avons une croissance importante (hauteur importante) de notre plante. Comme nous le montre l'essai 07représenté dans le (Tableau IX) qui est de (12 cm) par rapport aux autres essais.

Alors que, le reste des facteurs ainsi que les différentes interactions ont un effet non significatif sur la réponse Y2.

V-6-2-2- Modélisation de la réponse Y2

L'estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y2 est donnée dans le (Tableau XIII).

Tableau XIII : Estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y2.

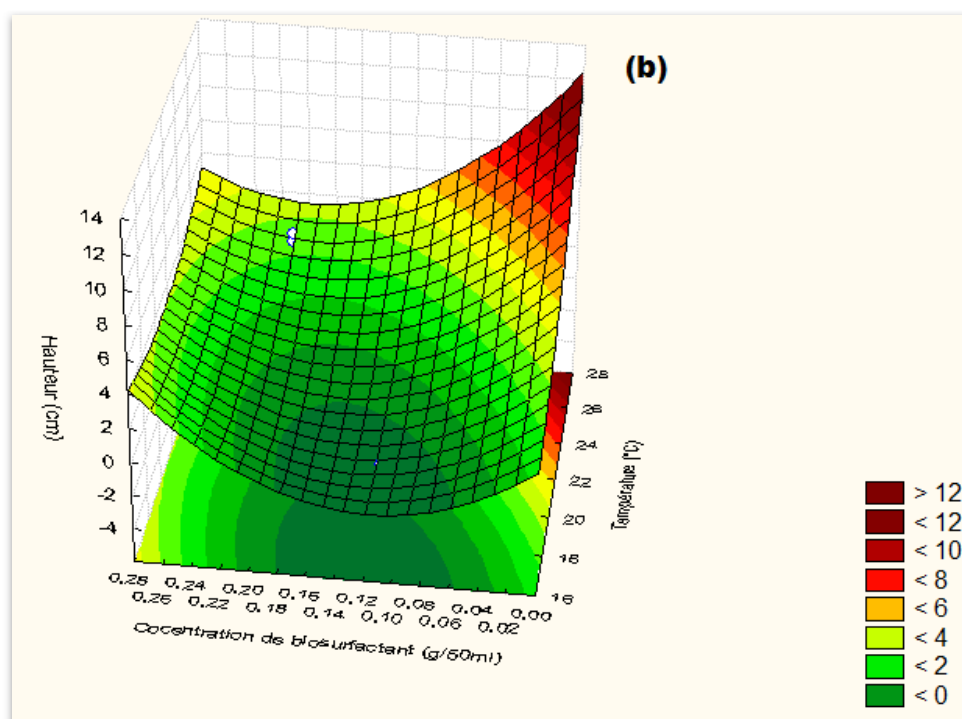
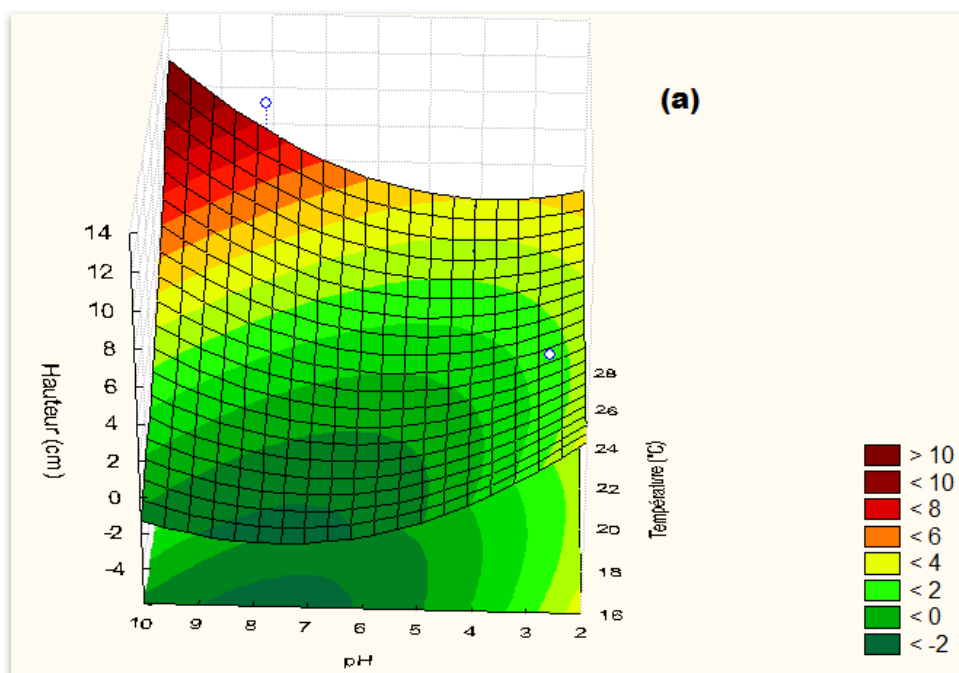
Facteurs	Hauteur moyenne
	Coefficient de régression
Constante (ordonnée à l'origine)	27,0360
X ₁ linéaire	-1,8325
X ₁ quadratique	0,0461
X ₂ linéaire	-4,4626
X ₂ quadratique	0,1920
X ₃ linéaire	14,2723
X ₃ quadratique	236,7856
Interaction entre X ₁ et X ₂	0,1219
Interaction entre X ₁ et X ₃	-3,0787
Interaction entre X ₂ et X ₃	-3,4375

Les valeurs de ces coefficients sont utilisées pour établir le modèle mathématique du second degré associé à la réponse Y2. L'équation du modèle s'écrit comme suit (**Equation 5**):

$$Y2 = 27,0360 - 1,8325 X_1 + 0,0461 X_1^2 - 4,4626 X_2 + 0,1920 X_2^2 + 14,2723 X_3 + 236,7856 X_3^2 + 0,1219 X_1 X_2 - 3,0787 X_1 X_3 - 3,4375 X_2 X_3$$

V-6-2-3- Représentation graphique des surfaces de réponses associée à la réponse Y2

Les surfaces de réponses sont représentées par des variations d'une réponse donnée en fonction de deux facteurs à la fois (**Figure 31**).



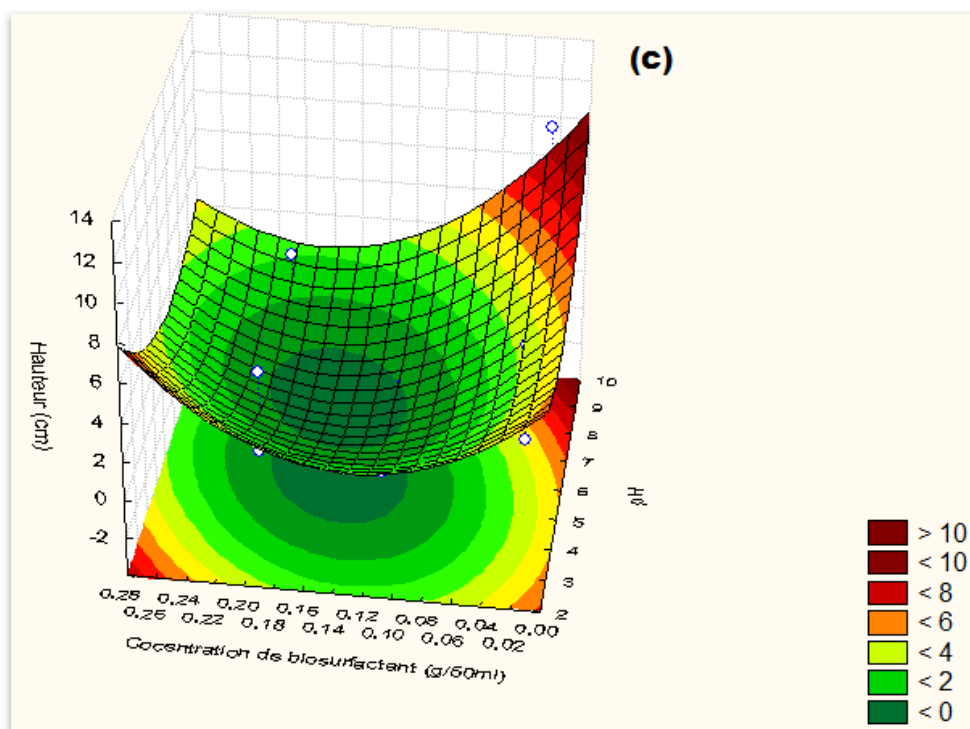


Figure 31 : Représentation graphique des surfaces de réponse associées à la réponse Y2.

La **Figure 31 (a)** représente la surface de réponses des variations de température et de pH. La réponse étant la hauteur moyenne de la plante, son maximum 10 à 14 cm représenté en rouge, est enregistré à des valeurs de température comprises entre 24°C et 28°C à des pH allant de 6.5 à 9.

La **Figure 31 (b)**, représente la surface de réponse des variations de la concentration en biosurfactants et la température. Une de **réponse maximale** pour la hauteur moyenne (Y2) qui est de 9 à 12 cm est observée à des valeurs de températures allant de 23°C à 28°C, et des concentrations de biosurfactant comprises entre 0,01 et 0,10g/50ml.

Figure 31 (c), exprime la variation des deux facteurs : concentration de biosurfactants et du pH, le une hauteur moyenne maximale de 9 à 13 cm est enregistré à des pH compris entre 7 et 10 et des concentrations de biosurfactants allant de 0,01g/50 ml à 0,06g/50 ml.

V-6-3-Analyse de la réponse Y₃V-6-3-1- Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y₃ (pourcentage de germination)

Les résultats rapportés dans le (**Tableau XIV**) montrent que seul le facteur X₃ (concentration en biosurfactant) semble exercer un effet linéaire significatif négatif sur la réponse Y₃ avec une p-value ($P < 0,1$) qui est de 0,074164. Le reste des facteurs ont un effet non significatif.

Tableau XIV : Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y₃.

Facteur	Pourcentage de germination					
	Effet	Erreur standard	T	P	-95% Cnf.Limt	+95% Cnf.Limt
Constante d'ordonnée à l'origine	17,1589	2,934824	5,84665	0,107843	-20,1316	54,44936
Température linéaire X ₁	3,9329	2,587509	1,51994	0,370464	-28,9446	36,81027
Température quadratique X ₂ ²	-15,2775	2,930055	-5,21405	0,120632	-52,5073	21,95243
pH X ₂	-3,5215	2,577683	-1,36614	0,402264	-36,2740	29,23110
pH quadratique X ₂ ²	1,5552	2,882884	0,53946	0,685056	-35,0753	38,18571
Concentration du biosurfactant X₃	-21,3236	2,485412	-8,54511	0,074164	-53,0308	10,38365
Concentration du biosurfactants quadratique X ₃ ²	2,7426	2,905010	0,94410	0,518300	-34,1690	39,65428
Interaction X ₁ X ₂	0,0000	3,330000	0,00000	1,000000	-42,3117	42,31166
Interaction X ₁ X ₃	-0,0044	2,941500	-0,00150	0,999044	-37,3797	37,37088
Interaction X ₂ X ₃	-8,8333	2,941500	-3,00300	0,204642	-47,2086	28,54197

Si $P < 0,1$ l'effet est significatif

➤ Le diagramme de Pareto

Les effets standardisés des valeurs numériques des trois facteurs sur la réponse Y3 sont représenté dans le diagramme de Pareto (**Figure 32**).

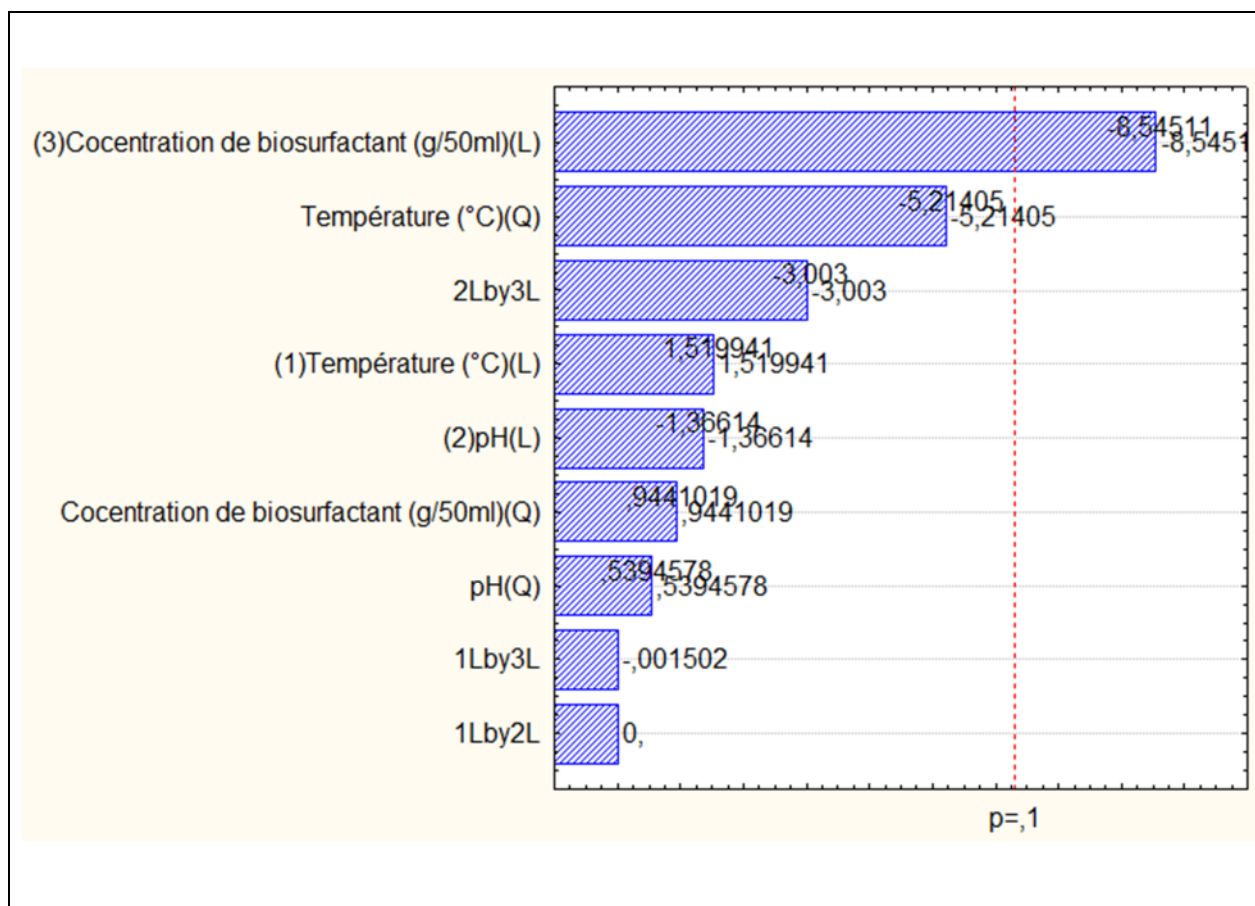


Figure 32 : Diagramme de Pareto des effets sur la réponse Y3

D'après le diagramme de Pareto nous observons une forte influence de la concentration en biosurfactant X 3 qui exerce un effet significatif négatif linéaire important, de l'ordre (-8.54511) sur la réponse Y3, puisqu'elle est supérieure à la valeur seuil de 0,1. C'est-à-dire, que la croissance de la plante est favorisée à des faibles concentrations en biosurfactants, avec un taux de germination favorable, comme nous le montre l'essai 07 représenté dans le (**tableau IX**) qui est de 33.33% de même avec la valeur du témoin.

Le reste des facteurs ainsi que les différentes interactions n'ont pas eu d'effet sur la réponse Y3.

D'après le diagramme de Pareto, nous remarquons que le facteur X3 exerce un effet significativement négatif sur la réponse Y3 (le pourcentage de germination), c'est-à-dire que : plus concentration du biosurfactant augmente plus le pourcentage de germination diminue.

V-6-3-2- Modélisation de la réponse Y3

L'estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y3 est donnée dans le (Tableau XV).

Tableau XV : Estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y3.

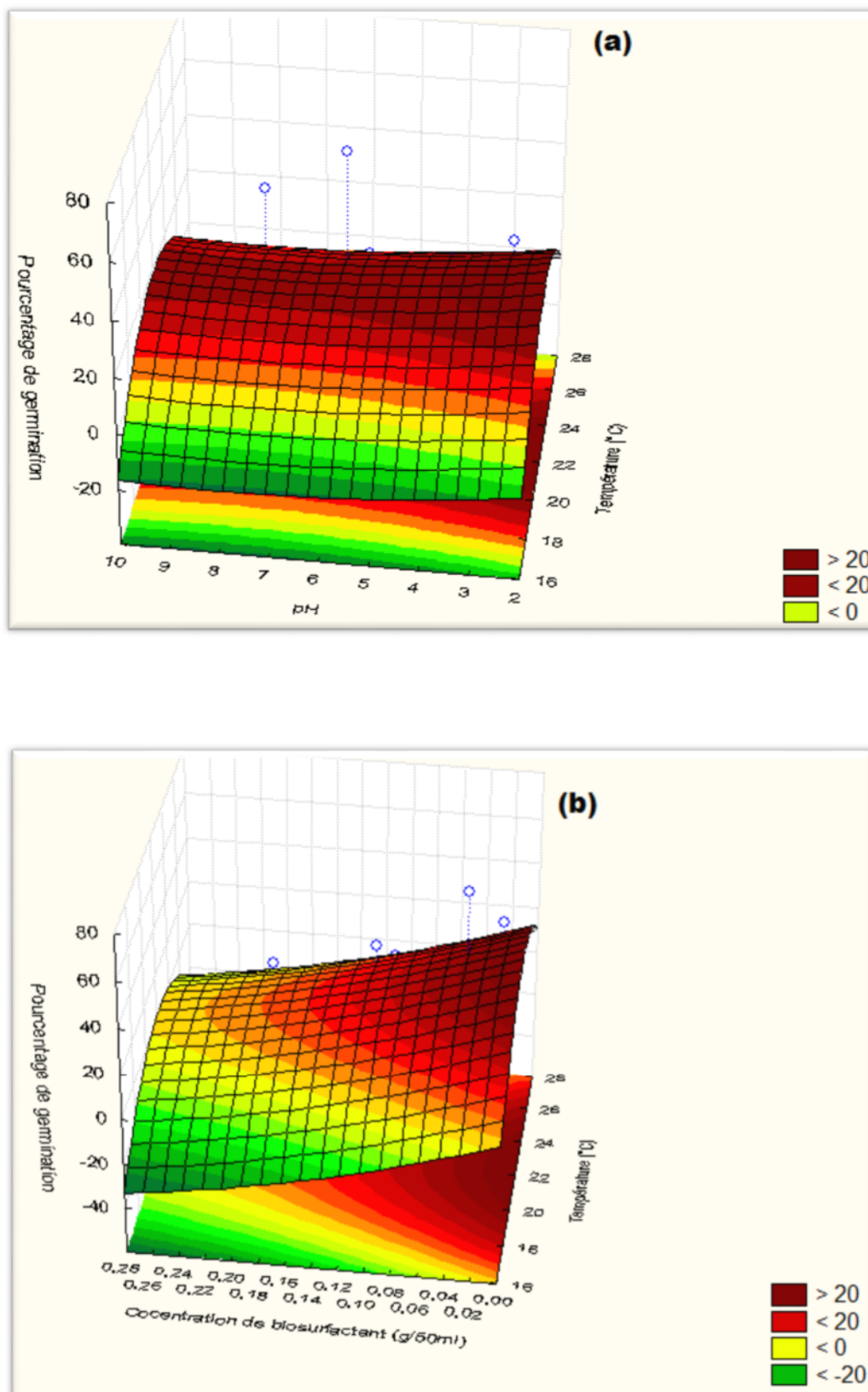
Facteur	Pourcentage de germination
	Coefficient de régression
Constante (ordonnée à l'origine)	-396,572
X1 linéaire	38,001
X1 Quadratique	-0,849
X2 linéaire	0,134
X2 Quadratique	0,194
X3 linéaire	-19,530
X3 Quadratique	216,971
Interaction X1 X2	0,000
Interaction X1 X3	-0,009
Interaction X2 X3	-27,778

Les valeurs de ces coefficients sont utilisées pour établir le modèle mathématique du second degré associé à la réponse Y3. L'équation du modèle s'écrit comme suit (**Equation 6**):

$$Y3 = -396,572 + 38,001 X1 - 0,849 X1^2 + 0,134 X2 + 0,194 X2^2 - 19,530 X3 + 216,971 X3^2 - 0,009 X1 X3 - 27,778 X2 X3$$

V-6-3-3- Représentation graphique des surfaces de réponses associée à la réponse Y3

Les surfaces de réponses sont représentées par des variations d'une réponse donnée en fonction de deux facteurs à la fois (**Figure 33**).



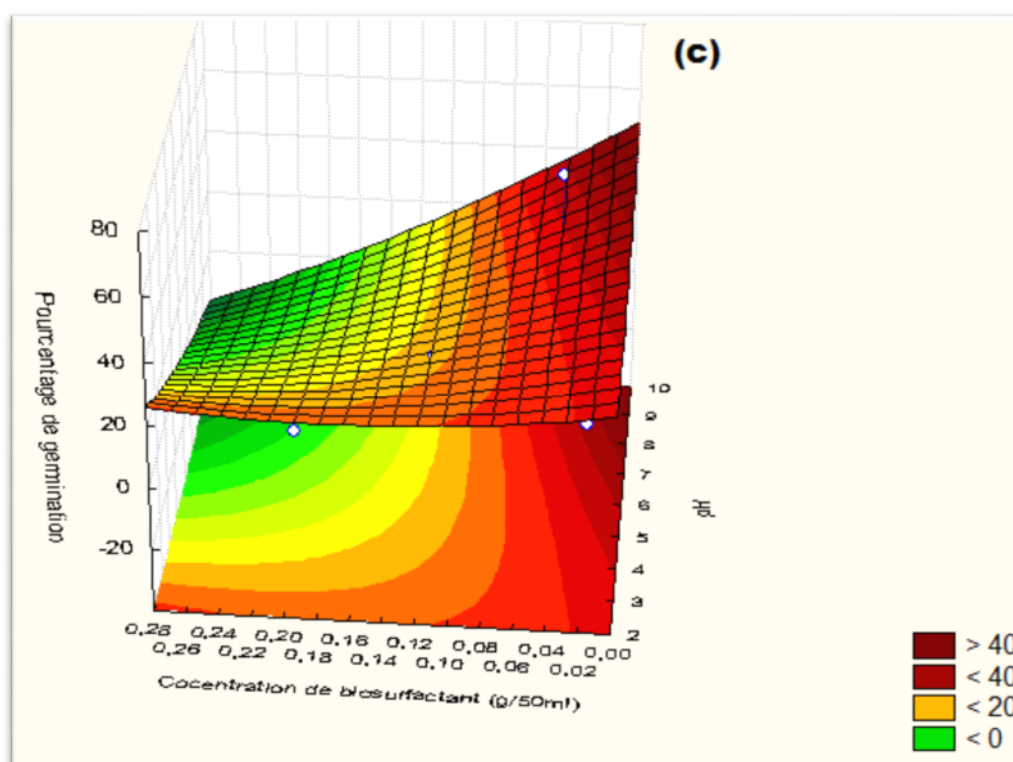


Figure 33 : Représentation des surfaces de réponse associées à la réponse Y3.

La **figure 33** représente les surfaces de réponses Y3 (le pourcentage de germination). La variation des deux facteurs température et pH sont représenté dans la **figure 33 (a)** ou nous observons un maximum de réponse de 30%, représenté sur le graphe en rouge a des valeurs de température de 24 °C à 28°C et des pH entre 3 et 10.

La **figure 33 (b)** représente les variations des températures et les concentrations de biosurfactants, ou nous observons un pourcentage de germination de 40% (zone rouge) à des valeurs de température supérieure à 22 °C et à des concentration de biosurfactants inférieur 0,15g/ 50 ml.

La **figure 33 (c)** représente la variation des deux facteurs pH et concentration en biosurfactant, le pourcentage de germination est à son maximum (60%) lorsque les valeurs de pH sont supérieures à 4 et les concentrations de biosurfactant inférieure à 0,08g /50 ml.

Sachant qu'il n' y a pas beaucoup d'études portant sur les applications des biosurfactants en tant que biostimulateur de croissance des plantes, nous avons porté notre discussion sur l'effet du pH et la température sur cette dernière.

D'après les études entreprises par LIU-WU-TING *et al.* (2011), les pH acides peuvent inhiber les activités enzymatiques dépendantes du pH, affectant ainsi la germination de la plante « *Lens culinaris Medik* », et les paramètres associés, ainsi que l'assimilation des nutriments par les racines tels que le phosphore l'azote et le calcium. Ces résultats coïncident avec les nôtres, à savoir que les faibles valeurs de pH semblent inhiber la croissance de la plante. D'après l'Agence Canadienne d'inspection des aliments (ACIA., 2014) les pH de 6 à 8 sont les plus adéquats pour la croissance de *Lens culinaris*.

SINSAWAT *et al.* (2004) ET ROY *et al.* (2012) ont rapporté que les valeurs de température optimales de la croissance de *Lens culinaris*, sont de 18°C et 30°C. Ces résultats coïncident avec les nôtres, où nous avons obtenu une croissance maximale représentée dans les surfaces de réponses pour des intervalles de température comprises entre 22°C et 28°C.

L'influence des biosurfactants sur la croissance des plantes, a été décrite par SACHDEV et CAMEOTRA (2013). Ces auteurs ont rapporté la capacité des biosurfactants à faciliter l'absorption des nutriments et les engrais par les racines des plantes, et ce, à côté de leurs activités insecticides.

Pour des faibles concentrations de biosurfactant, une croissance importante de la plante a été observée, et ce, en comparaison avec le témoin négatif. De ce fait, nous pouvons déduire que le biosurfactant testé semble influencer positivement la croissance de la plante *Lens culinaris*.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de notre étude est l'optimisation de l'effet des biosurfactants produits par une souche de *Pseudomonas* sur la croissance de *Lens culinaris* Medik, par la variation des paramètres (variables) suivants : température, pH et concentration de biosurfactant, et ce, en appliquant la méthode de surfaces de réponses et en considérant les variables de sortie (réponses) suivantes : la longueur de la tige, le poids sec du végétal ainsi que le pourcentage de germination.

La souche bactérienne décrite dans notre étude semble produire un biosurfactant appartenant à la classe des glycolipides. Ces propriétés rendent son utilisation possible dans plusieurs domaines tel que : le traitement des sols contaminés par les hydrocarbures, le nettoyage et la biorémediation des sites contaminés par l'huile ainsi que dans le domaine agricole.

En présence du milieu de glucose utilisé comme unique source de carbone et d'énergie, une production appréciable de biosurfactants (9,24g / L) a été obtenue.

Les résultats de l'optimisation de l'effet du biosurfactant sur la croissance de *Lens culinaris* montrent que le biosurfactant produit exerce un effet positif mais à des faibles concentrations. Les valeurs moyennes de températures et des pH basiques proches de la neutralité semblent également influencer positivement la croissance de la plante considérée.

Pour ce qui est du test de l'effet antibactérien du biosurfactant produit, une concentration de 0.06g/ml a été testée sur les souches *E. coli*, *Staphylococcus*, *Klebsiella* et *Bacillus*. Il semble que ce biosurfactant n'exerce pas d'effet antibactérien avec des faibles concentrations sur ces souches-là.

À la lumière des résultats obtenus, il est souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies, à savoir :

- L'étude du mécanisme par lequel les biosurfactants agissent sur la croissance de la plante.
- Étude de l'effet antibactérien par différentes concentrations en biosurfactant.
- Utiliser des approches plus moléculaires pour identifier les souches productrices de biosurfactants.
- Faire varier d'autres paramètres d'optimisations à côté des concentrations en biosurfactant en utilisant la méthode de surface de réponse.

- Il est souhaitable d'exploiter la production de biosurfactant dans des bioréacteurs afin d'améliorer les rendements de production.
- Une approche moléculaire par le séquençage de l'ARN 16S de nos souches isolées aiderait à déterminer de façon précise leur affiliation phylogénique.

Références Bibliographiques

A

ABDEL-MAWGOUD. A.M., LEPINE. F., DEZIEL. E .,(2010),). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles *Appl. Microbiol. Biotechnol* **86**: 1323.

ADAMCZAK M., et BEDNARSKI. W., (2000). Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antartica*. *Biotechnol. Lett.*,22(4): 313-316.

AL-ARAJI1L., ABD RAHMAN R. N. Z. R., BASRI, SALLEH. M. A. B., (2007). Minireview: Microbial Surfactant. (*AsPac*) *J. Mol. Biol. Biotechnol.*, **Vol. 15** No.3, p. 99-105.

ALEJANDRO C.S., HUMBERTO H.S., et MARIA J.F,(2011). Production of glycolipids with antimicrobial activity by *Ustilago maydis* FBD12 in submerged culture. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5: 2512-2523.

AMARAL P.F.F., DA SILVA J.M., M. LEHOCKY, A.M.V. BARROS-TIMMONS, M.A.Z. COELHO, I.M. MARRUCHO et J.A.P. COUTINHO, (2006). Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowialipolytica*. *Process Biochem.*, 41: 1894-1898.

AN CJ, HUANG GH, WEI J, YU H (2011).Effect of short-chain organic acids on the enhanced desorption of phenanthrene by rhamnolipid biosurfactant in soil water environment. *Water Res* 45: 5501-5510.

ANZAI Y., KIM H., PARK,J-Y., WAKABAYASHI H., et OYAIZU, H., (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1563–1589

ARINO S., MARCHAL R., et VANDECASTELLE. J.P, (1996). Identification and production of rhamnolipidic biosurfactant by *Pseudomonas* species. *Applied. Microbiology. Biotechnology.* 45: 162-168.

B.

BAI G., BRUSSEAU M. L., et MILLER R. M., (1998). Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilization and mobilization of residual hydrocarbon by biosurfactant, *J. Contam. Hydrol.*, 30 : 265-279.

BANAT I.M., (1995). Characteristics of biosurfactants and their use in pollution removal-state of art. *Acta Biotechnol.* 15: 251–267.

BANAT I. M., (1995). Biosurfactants production and possible uses enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review, *Bioresource Technology*, 51: 1-12.

BANAT I.M., FRANZETTI A., GANDOLFI I., BESTETTI G., et MARTINOTTI M.G., (2010) . Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 87: 427-444.

BANAT M., MAKKAR R. S., et CAMEOTRA S S., (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 : 495-508.

BERGSTRÖM S., THEORELL H., DAVIDE H., (1946a). Sur un produit métabolique de *Pseudomonas pyocyane* . Acide pyolipique, actif contre *M. tuberculosis* . *Arkiv Chem Mineral Geol.* ; 23A (13): 1-12.

BENERJEE S., (1991). Biosurfactant for desludging crude fuel oil storage tank. *Chemical industry digests.* 4 : 75-78.

BENINCASA M., ABALOS A., OLIVEIRA I., et MANRESA ., (2004). Chemical structure, surface properties, and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soap stock. *Antonio van Leeuwenhoek*, 85: 1-8.

BOSSIS E., LEMANCEAU P., LATOUR X., et GARDAN L., (2000). The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63

BOCCHETTA M., CECCARELLI E., CRETI R., SANANGELANTONI A.M., TIBONI O., et CAMMARANO P., (1995) . Arrangements and nucleotide sequence of the gene (fus) encoding elongationfactor G (EF-G) from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex pyrophilus* : phylogenetic depth of hyperthermophilic bacteria inferred from analysis of the EFG/fus sequence. *J. Mol. Evol.*, 41: 803-812.

BOTELHO G. R., et LEDA C. M., (2006). Fluorescent *Pseudomonad* associated with the rhizosphère of Crops – an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 401-416.

BUSTARD K., et GUPTA R.S., (1997). The sequences of heat shock protein 40 (DnaJ) homologs provide evidence for a close evolutionary relationship between the *Deinococcus* group and cyanobacteria..*J. Mol. Evol.*, 45: 193-205.

C.

CAMEOTRA S. S., SINGH P., (2009). Synthesis of Rhamnolipid Biosurfactant and Mode of Hexadecane Uptake by *Pseudomonas* Species, *Microb Cell Fact.* **Vol. 8**, No.16.

CASAS J.A., DE LARA S.G., et GARCIA-OCHOA F., (1997). Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enzyme Microb. Technol.*, 21: 221-229.

CEDOU C., (2013). Mobilisation des lentilles de flottant (HC) par biolavage, *GTS, Intersol*, : 5.

.

CHAMPION J. T., GILKEY J. C., LAMPARSKI H., RETTERER J. et MILLER R. M., (1995), Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmiun and octadecane. *J .Environ .Qual.*, 24 : 19-28.

CHANDRAN P., et DAS N., (2010). Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Int. J. Eng. Sci. Technol.*, 2: 6942-6953.

CHRISTOFI N., et IVSHINA I.B., (2002), A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93 : 915-929.

CIANDRINI E., CAMPANA R., CASETTARI L., PERINELLI DR., FAGIOLI A., MANTI A., PALMIERI GF., PAPA S., BAFFONE W., (2016) Characterization of biosurfactants produced by *Lactobacillus* spp. and their activity against streptococci biofilm, *Applied Microbiology and Biotechnology*.100, pp. 6767-6777.

COLWELL R.R., et MANDEL M., (1964).Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of some Gram-negative bacteria. *J.Bacteriol.* **87**: 1412–1422.

D

DADRASNIA A., et ISMAIL S., (2015). Biosurfactant Production by *Bacillus salmalaya* for Lubricating Oil Solubilization and Biodegradation. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12(8): 9848–9863.

DANIELS C. J., HOFMAN J. D., MACWILLIAMS J. G., DOOLITTLE W. F., WOESE C. R., LUEHRSEN K. R. et FOX. G. E., (1999). Sequence of 5S ribosomalRNA gene regions and their products in the archaebacterium *Halobacterium volcanii*.*Molecular Gene Genetics.*, 198: 270-274.

DAS K., et MUKHERJEE A. K., (2007a).comparaison de production de biosurfactants lipopeptides par des souches de *Bacillus Subtillus* dans des systèmes de fermentation immergés et à l'état solide utilisant une source de carbone bon marché : certaines applications industrielles de biosurfactants. *Process Biochem.*42 :1191–1199.

DAS K., et MUKHERJEE A. K., (2007b).Efficacité de biodégradation du pétrole et du pétrole brut des souches *Bacillus subtilis* et *pseudomonas aeruginosa* isolées d'un sol

contaminé par l'huile de pétrole du nord-est de l'Inde. *Bioresour. Technol.* 98, 1339–1345.
Doi:10.1016/j.biortech.2006.05.032

DEB MRIDU., MANDAL NAMRATA., SATHIAVELU MYTHILI., et ARUNACHALAM SATHIAVELU (2006) :Application and Future Aspects of Microbial Biosurfactants – Review : 2803.

DESAI J. D., et BANATI.M., (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential, *microbiology and molecular biology reviews*, 61: 47-64.

DESANTO K., (2008). Rhamnolipid-based formulations (WordPatent 2008/013899). Aurora Advanced Beauty Labs, St. Petersburg, FL

DUHOUX E., NICOLE M., (2004). Biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes. Eds. IRD.Montpellier. pp : 1-18.

E

EDWARDS J. R., HAYASHI J. A., (1965) Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 111 415

F.

FAKRUDDIN, M.D. (2012). Biosurfactant: Production and Application. *Pet. Environ. Biotechnol.*, 3(4): 1-5.

FRACCHIA L., CERESA C., FRANZETTI A., (2014) Biosurfactants: production and utilization processes, technologies, and economics. In: Kosaric N, Sukan FV, editors. *Surfactant science series, industrial applications of biosurfactants*. Boca Raton, FL: CRC Press. Chapter 12 : 245–260.

FREITAS DE OLIVEIRA D. W., FRANC I. W. L., FELIX, A. K. N., MARTINS J. J. L., GIRO M. E. A., MELOB V. M. M., et GONCALVES L. R. B. (2013). Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. *ColloidsSurf. B Biointerfaces* 101, 34–43. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.06.011.

G.

GABET S., (2004). Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse se doctorat de l'université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de L'eau, p. 177.

H.

HABA E., PINAZO A., JAUREGUI O., (2003) Physicochemical characterization and antimicrobial properties of the rhamnolipids products by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIMB 40044. *J. Surfact. Deterg.* 6: 155–161

HAIGH S.D., (1996). A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *The Science of the Total Environment*, 185: 161-170.

HABA E., PINAZO A., JAUREGUI O.,(2003).Physicochemical characterization and antimicrobial properties of the rhamnolipids products by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIMB 40044. *J. Surfact. Deterg.* 6: 155–161

HEALY M.G., DEVINE C.M., et MURPHY R., (1996), Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling*, 18 : 41-57.

HISATSUKA K.I., T. NAKAHARA., SANO N.,et YAMADAK., 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agric. Biol. Chem.*, 35: 686-692.

I.

IKEMOTO S., KURAISHI H., KOMAGATA K., AZUMA R., SUTO T., et MUROOKA H., (1978). Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 24: 199-213

INES M., et DHOUHA G., (2015). Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*. 71:100-112.

INSTITUT TECHNIQUE DES GRANDES CULTURES (ITGC). 2006 Culture de *Lens culinaris* Medik,

ISHIGAMI Y., GAMA Y., NAGAHORA H., YAMAGUCHI M., NAKAHARA H., et KAMATA T., (1987). The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant, *Chemistry Letters* :763-766.

J.

JADHAV M., KALMES., TAMBOLI D., et GOVINDWAR., (2011). Rhamnolipid from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM-2112 and its role in the degradation of Brown 3REL. *J. Basic Microbiol.*,51: 385-396.

JARVIS F. G., JOHNSON M. J., CHEM J. AM.,(1949).Structure of a rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* .*Archives of Biochemistry and Biophysics* :415-421

JOHNSON J.L., et ORDAL E.J., (1968) . Desoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. *J. Bacteriol.* **95**: 893–900

K.

KERSTERS K., LUDWIG W., VANCANNEYT M., DEVOS P., GILLIS M., et SCHLEIFER K.H., 1996. Recent changes in the classification of pseudomonads: an overview.*Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 465–477.

KEDDOU I., (2015). Isolement de souches bactériennes productrices de biosurfactants à

partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures, Mémoire d'Ingéniorat d'Etat en Génie de l'Environnement, Ecole Nationale Polytechnique d'Alger

KIM S.Y., OHD.K., LEE K.H., et KIMJ.H., (1997). Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. Applied Microbiol. Biotechnol., 48: 23-26.

KIM H., YOON B., LEE C., SUH H., OH H., KATSURAGI T., TANI Y .,(1997) Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. J Ferment Bioeng 84: 41-46.

KLECKNER V., et KOSARIC N., (1993).Biosurfactants for cosmetics. In:Biosurfactants: Production, Properties, Applications (Kosaric, N., ed), pp. 329–389Marcel Dekker New York

KOLWZANB MOZLIWOSCI WYKORZYSTANIA., (2014)biosurfaktantów w technologiach oczyszczania środowiska gruntowo-wodnego, *Ochrona Środowiska (2014)* vol. 36 (3) : 3-18.

KONISHI M., FUKUOKAT., MORITAT., IMURA T., et KITAMOTOD., (2008). Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. J. Oleo Sci., 57: 359-369.

L

LADIZINSKY G., BRAUN D., GOSHEN D., ET MUEHLBAUER, F. J. (1984). The biological species in the genus *Lens* L. Bot. Gaz.145:253-261.

LAHOUSSINE V., (1999). Dégradation des hydrocarbures par les bactéries isoléesdes eaux superficielles du bassin parisien. CRECEP RES N° 92 Ecol 6.

LAI C.C., HUANGY.C., WEI Y.H., et CHANGJ.S., (2009). Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. J. Hazard. Mater., 167: 609-614.

LANG S., et WULLBRANDT D., (1999). Rhamnose lipids biosynthesisMicrobial Production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 22-3

LATOUR X., et LEMANCEAU P., (1997). Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp., *Agronomie*,:17 427–443.

LAURILA M. A., (1985). Biosurfactants production by mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Thèse. Doctorat. Department of biotechnology*, Swiss Federal Institute of technology Zurich, Switzerland., : 1-10 (p117).

LEAHY J. G., et COLWELL R. R., (1990). Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Rev.*, 54: 305-315.

LIU-WU-TING., (2011). Effect of calcium on seed germination, seedling growth and photosynthesis of six forest tree species under simulated acid rain. 2011, Oxford University Pre

M.

MAIER R.M., et SOBERON-CHAVEZ G., (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 625–633

MAKKAR R. S., CAMEOTRA S. S., et BANAT I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *Appl Microbiol Biotechnol Express* 2011, 1:5. doi: 10.1186/2191-0855-1-5

MARQUES A.M., PINAZO A., FARFAN M., ARANDA A. J., TERUEL J. A., ORTIZ A., MANRESA A., ESPUNY M. J., (2009). The Physicochemical Properties And Chemical Composition Of Trehalose Lipids Produced By *Rhodococcus erythropolis* 51T7, *Chem. Phy. Lip.* Vol. 158 : 110-117.

MANAIA, C.M. and MOORE, ERB. 2002. *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., thermotolerant species of the genus *Pseudomonas* «sensu stricto». *J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 2203-2209.

MAIER R.M. et SOBERON-CHAVEZ, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 625–633

MARMUR J., DOTY P. (1961) Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol.* 3:585-94.

MEDEIROS CAMPOS JENYFFER., MONTENEGRO STAMFORD TANIA LUCIA., SARUBBOLEONIE ASFORA., DE LUNAJULIANA MOURA., et RUFINORAQUEL DINIZ., IBRAHIM M. BANAT (2013) Microbial Biosurfactants as Additives for Food Industries. in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

MEGHDAS IDIR., HAMZE MONZER., DABBOUSSI FOUAD., BAIDANADER et IZARDDANIEL. (2004), taxonomie du genre *pseudomonas* rétrospective et actualité *Lebanese Science Journal*, Vol. 5, No. 1, 2004.

MEHDI H., GITI E., (2008). Investigation Of Alkane Biodegradation Using The Microtiter Plate Method And Correlation Between Biofilm Formation, Biosurfactant Production And Crude Oil Biodegradation, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 62, No. 2 , :170-178

MEYLHEUC T., HERRY J.M., BELLON-FONTAINE M.N., (2001). Les biosurfactants, des Biomolécules A forte Potentialité D'application, *J. Sciences des aliments* Vol. 21, N° 6 : 591-649.

MEAR J-B., (2014). Étude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Thèse de doctorat. Université Lille nord de France, France.

MOSS C.W., SAMUELS S.B., et WEAVER R.E., 1972. Cellular fatty acid composition of selected *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.*, 24: 596-598.

MILENA G., RIKALOVIĆ1 ., MIROSLAV M., VRVIĆ1 et IVANKA M., KARADŽIĆ (2015), Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* – from discovery to application in contemporary technology

MULLIGAN C. N., (2009). Recent advanced in the environmental applications of biosurfactants.,*Curr Opin Colloid Interface Science.*, 14: 372-378

MULLIGAN C.N., (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*. 133(2):183-198.

MULLIGAN C.N., YONG R.N.,et GIBBSB.F., (2001) . Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: An evaluation. *Eng. Geol.*, 60: 193-207.

MUTHUSAMY K., GOPALAKRISHNANS., RAVI T.K., et SIVACHIDAMBARAMP., (2008) . Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Curr. Sci.*, 94: 736-747.

N.

NERURKAR A.S., HINGURAO K.S., et SUTHARH.G., (2009). Bioemulsifiers from marine microorganisms. *J. Sci. Ind. Res.*, 68: 273-277.

NDLOVU T., KHAN S., KHAN W ., (2016) Distribution and diversity of biosurfactant-producing bacteria in a wastewater treatment plant. *Environ Sci Pollut Res*. 23(10): 9993–10004. 5.

NITSCHKE M., COSTA SG., et CONTIERO J., (2010) Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. *Appl Biochem Biotechnol*. 160(7):2066-74

NOHA H. YOUSSEF ., KATHLEEN E. DUNCANA., DAVID P. NAGLEA., KRISTEN N. SAVAGEA., ROY M. KNAPPB., MICHAEL J. MCINERNEYA., (2004): Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms *Journal of Microbiological Methods* 56 : 339– 347

O.

OCHSNER, U. A., A. K. KOCH, A. FIECHTER ET J. REISER (1994 a). "Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Bacteriology* **176**: 2044-2054.

OCHSNER U. A., FIECHTER A., et REISER J., (1994 b)."Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rh/AB* genes encoding arhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis." *Journal of Biological Chemistry* **269**: 19787-19795

OCHSNER U. A., et REISER J., (1995 a)."Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proceeding of the National Academy of Sciences* **92**: 6424-6428.

OCHSNER U. A., REISER J., FIECHTER A., et WITHOLT B., (1995 b). "Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts." *Applied Environmental Microbiology* **61**: 3503-3506.

P.

PACWA-PLOCINICZAK M., PLAZA GA., PIOTROWSKA-SEGET Z., (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int J Mol Sci*;12:633–654.

PALLERONI, N.J., (1984) . genus *i. pseudomonas* *migula* 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, : 141–171.

PANCHAL C., et ZAJIC J., (1978) . Isolation of emulsifying agents from a species of *Corynebacterium*. *Developments in Industrial Microbiology*. **19**:569-576.

PARRA J. L., GUINEA J., MANRESA M. A., ROBERT M., MERCADE M. E., COMELLES F., et BOSCH M. P., (1989). Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants, *J.A.O.C.S.*, **66** (1): 141-145.

PEYPOUX F., BONMATIN J. M., et WALLACH J., (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin, mini review, *App. Microbiol. Biotechnol.* **51** : 553-563.

PILJACT., et PILJAC G., (1999). Use of rhamnolipids inwound healing, treating burn shock, atherosclerosis,organ transplants, depression, schizophrenia and cosmetics (European Patent 1(889 623). Paradigm Biomedical Inc., New York

PORE J., (1992). Emulsions, microémulsions, émulsions multiples, Editions Techniques et Industries des Corps Gras, : 270.

POREMBA K., GUNKEL W., LANG S., et WAGNERF., (1991). Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 6: 157-163.

PROMMACHAN O. (2002). Production And application Of Biosurfactant From Bacillus MUV4, Master of science thesis of biotechnology, Prince of songkla university, Thailland, 70 p. PDF/Nature of biosurfactants.

R.

RAHMAN K.S.M., GAKPE E., (2008). Production, characterization, and application of Biosurfactants-Review. *Biotechnol.*,7(2): 360-370.

RASHEDI H., JAMSHIDI E., MAZAHERIASSADI M., BONAKDAR B.,(2005)Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil, Vol. 2, No. 2: 121-127.

RAZA Z A., REHMAN A., KHAN M.S. et KHALID Z.M., (2007). Improved production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. *Biodegradation*, 18:115-121.

RODRIGUES L., BANAT I. M., TEIXEIRA. J., OLIVEIRA R., (2006). Biosurfactants: Potential applications in medicine. *Journal. Antimicrobial. Chemoter.* 57:609-618.

ROSENBERG E., et RON E. Z., (1999). High- and low- molecular- mass microbialsurfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 154-162.

ROY C. D., TARAFDAR S., DAS M., ET KUNDAGRAMI S., (2012). Screening lentil (*Lens culinaris* Medik.) germplasms for heat tolerance. *Trends Biosci.* 5 : 143–146.

RUFINO R.D., SARUBBO L.A., et CAMPOS-TAKAKIG.M., (2007) . Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 729-734.

S.

SACHDEV DHARA P., ET CAMEOTRA SWARANJIT S., (2013) : Biosurfactants in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:1005–1016

SAMADI N., ABADIAN N., AKHAVAN A., FAZELI M. R., TAHZIBI A., JAMALIFAR H. (2007). Biosurfactant Production By The Strain Isolated From Contaminated Soil, *J. Biol. Sci.* Vol. 7, N°. 7 :1266-1269.

SANTOS D. K. F., RUFINO R. D., LUNA J.M., SANTOS V. A., et SARUBBO L. A., (2016). Biosurfactants: biomolécules multifonctionnelles du 21 ème siècle. *Int. J.Mol. Sci.* 17:401. Doi: 10.3390/ijms17030401

SARUBBO L.A., FARIAS C.B.B., et CAMPOS-TAKAKIG.M., (2007). Co-Utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr. Microbiol.*, 54: 68-73.

SASKATCHEWAN PULSE GROWERS. (2000). Pulse production manual. Saskatchewan Pulse Growers, Saskatoon SK

SASKATCHEWAN AGRICULTURE AND FOOD. (2000). Lentil in Saskatchewan. Saskatchewan Agriculture and Food, Regina.

SATPUTE S.K., BANPURKAR A.G., DHAKEPHALKAR P.K., BANAT I.M., et CHOPADE B.A. (2010).Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30(2):127-144.

SHREVE. G. S, INGUVA. S, GUNNAM. S,(1995) . *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **4** 331

SILVA RCFS, ALMEIDA DG, LUNA JM, et al. (2014)Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *Int J Mol Sci.*15:12523–12542.

SHARMA D., SAHARAN BS., KAPIL S., (2016).Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria, Springer Briefs in Microbiology : 47-58..

SINGH A., VAN HAMME JD., WARD OP., (2007).surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. application aspects. *biotechnol adv.*;25:99–121.

SINSAWAT V., LEIPNER J., STAMP, P., et FRACHEBOUD Y., (2004). Effect of heat stress on the photosynthetic apparatus in maize (*Zea mays* L.) grown at control or high temperature. *Environ. Exp. Bot.* 52 :123–129.

SOBERON-CHAVEZ G., MAIER R.M., (2011).biosurfactants a general overviewIn *Biosurfactants*; Soberón-Chávez, G., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany,pp. 1–11.

SPOECKNER S., WRAY V., NIMTZ M., et LANG S., (1999). Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *App. Microbiol.Biotechnol*, 51: 33-39.

SRIRAM MI., KALISHWARALAL K., DEEPAK V., GRACEROSEPAT R., SRISAKTHI K.,(2011).L'inhibition d'un biofilm et l'action antimicrobienne du biosurfactant lipopeptide produit parla souche tolérante aux métaux lourds *Bacillus cereus* NK1. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 85: 174-181.

STANIER R.Y., PALLERONI N.J., et DOUDOROFF M., (1966). The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271

STEAD D.E.,(1992) . Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. By using cellular fatty acid profiles. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42 : 218-295.

T.

TAMAOKA J., HA D-M., et KOMAGATA K., (1987). Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosterone* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 52–59

THANOMSUB B., WATCHARACHAIPONGT., CHOTELERSAKK., ARUNRATTIYAKORNP., NITODA T., et KANZAKIH., (2004) . Monoacylglycerols: Glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. *J. Applied Microbiol.*, 96: 588-592.

TULEVAA BK., IVANOV GR., CHRISTOVAA NE., (2002). Biosurfactant Production by a New *Pseudomonas putida* Strain, pp.356-360.

U.

UZOIGWE C., BURGESS J.G., ENNIS C.J., RAHMAN P.K., (2015) . Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*. 6:245.

V.

VANDECASTEELE J. P., (2008). Petroleum Microbiology, Editions TECHNIP, Paris, :816 .

VANDENBERG A. et SLINKARD A. E. (1990). Genetics of seed coats color and pattern in lentil. *J. Hered.* 81:484-488.

VAN HAMME JD., SINGH A., WARD OP., (2006). Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol Adv* 24: 604-620.

VISCA P., IMPERI F., et LAMONT I.L., (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* **15**: 22–30.

W.

WALWORTH J., BRADDOCK J., et WOOLARDC., (2001), Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soils. *Cold regions science&technology.* **32** : 85-91.

WERTZ J-L., (2012). Aperçu sur les biotensioactifs et les biosolvants, *Document ValBiom-Gembloux Agro-Bio Tech.,* : 9-10.

WEST C. C. et HARWELL J.H., (1992). Surfactants and sub-surface remediation, *Environ. Sci. Technol.,* **36** (12) : 2324-2330.

WHANG L.M., LIU P.W.G., MA C.C., CHENG S.S., (2008) Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.* **151**, 155–163.

WILLEMS A., BUSSE J., GOOR M., POT B., FALSEN E., JANTZEN E., HOSE B., GILLIS M., KERSTERS K., AULING G., et DE LEY J., (1989) . *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov.(formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and “*Pseudomonas carboxydoflava*”), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 319–333.

WOESE C.R., STACKEBRANDT E., WEISBURG W.G., PASTER B.J., MADIGAN M.T., FOWLER V.J., HAHN C.M., BLANZ P., GUPTA R., NEALSON K.H., et FOX, G.E., (1984) . The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**: 315–326.

Z.

ZAICA LAURA .L .,(2007)spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination¹

ZHANG Y., MILLER RM., (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* 58: 3276–3282.

ZOHARY D., (1972). The wild progenitor and the place of origin of the cultivated lentil *Lens culinaris*. *Econ. Bot.* 26:326-332.

SITE UTILISER

FAO Stat, 2006 ([http:// faostat. fao. org/ site/ 567/ default. aspx#ancor](http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor))

BRINK M.ET BELAYG. K. P., (2006). *Vignasubterranea* (L.) Verdc.. Record from Protabase.

BIOLOGIE DU LENS CULINARIS MEDIKUS, (2014) . ([http:// www. inspection. gc. ca/ francais/ plaveg/ bio/ dir/ dir0312f..shtml#B1](http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/dir/dir0312f.shtml#B1))

Annexes

Annexe I

Le Bouillon cœur cerveau (BHIB)

Milieu polyvalent riche.

Composition

- Protéose-peptone : 10,0 g
- Infusion de cœur de bœuf : 5,0 g
- Chlorure de sodium : 5,0 g
- Hydrogénophosphate de sodium : 2,5 g
- pH = 7,4

Concentration finale

37,0 g / litre. Stérilisation classique.

Le bouillon nutritif (milieu liquide) (BN)

Composition

- Extrait de levure : 4,0 g ;
- Tryptone : 5,0 g ;
- Glucose : 50,0 g ;
- Dihydrogénophosphate de potassium : 0,55 g ;
- Chlorure de potassium : 0,425 g
- Chlorure de calcium : 0,125 g ;
- Chlorure ferrique 0,0025 g ;
- Sulfate de manganèse : 0,0025 g ;
- Vert de bromocresol : 0,022 g ;
- pH = $5,5 \pm 0.2$

Concentration finale

- Dissoudre 60,2 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et répartir.
- Stériliser 15 min à 121°C à l'autoclave.
- Le pH peut être ajusté à 6,5 par addition d'une solution à 1% de bicarbonate desodium.

Annexe II

La gélose nutritive

Milieu d'isolement non sélectif pour contrôler la pureté d'une souche ou pour purifier la souche bactérienne si elle est contaminée.

Composition

- Extrait de viande : 1,0 g/l ;
- Extrait de levure : 2,5 g/l ;
- Peptone : 5,0 g/l ;
- Chlorure de sodium : 5,0 g/l ;
- Agar : 15,0 g/l ;
- pH = 7,0

Concentration finale

- 28g/l (stérilisation à l'autoclave).

Le milieu Mueller-Hinton (MH)

Gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard.

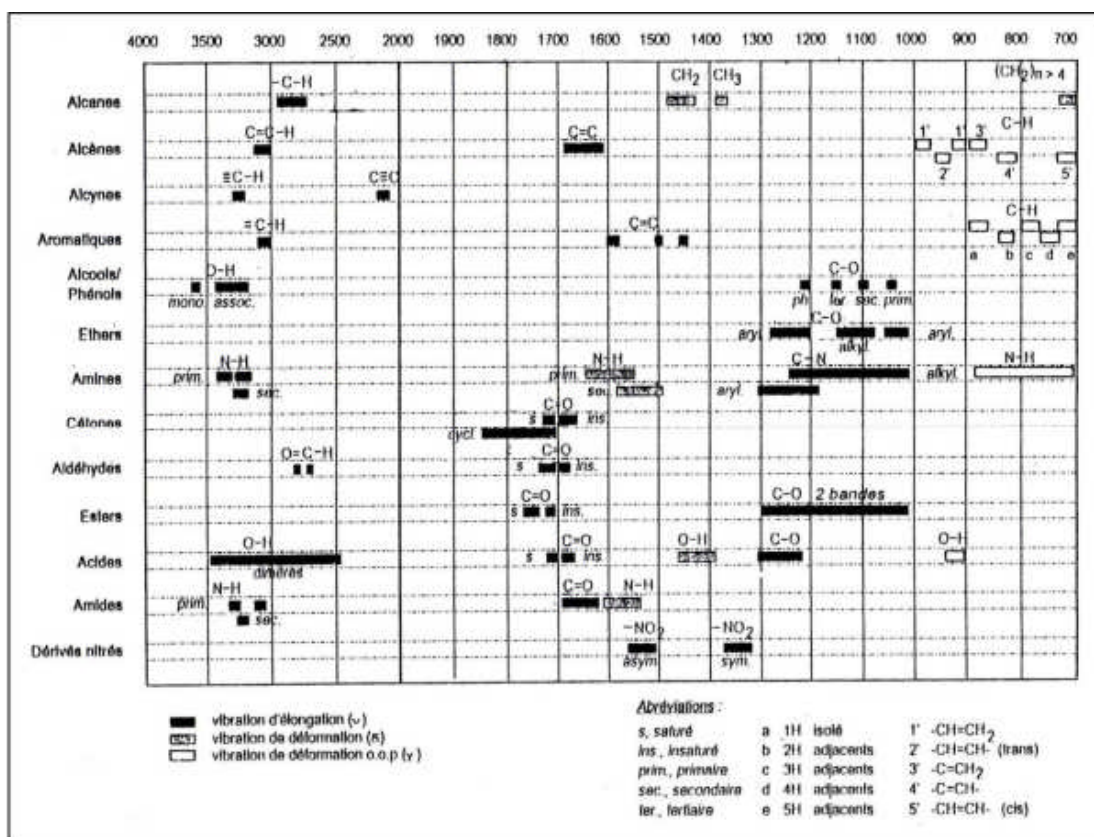
Composition

- Infusion de viande de bœuf : 300,0 ml
- Peptone de caséine : 17,5g
- Amidon de maïs : 1,5 g
- Agar : 17,0 g
- pH = 7,

Concentration finale

- 38,0 g/l homogénéisé puis chauffer en agitant, il faut porter à ébullition pendant environ 1 min.

Annexe III



Corrélation dans le moyen infrarouge entre structure et $\bar{\nu}$ de vibration (cm^{-1})

Résumé

Les surfactants microbiens ou biosurfactants sont des tensioactifs naturels produits par des bactéries, des levures ou des champignons. Ils possèdent une structure moléculaire amphiphile, constituée d'un domaine hydrophile (tête polaire), composé d'acides aminés, d'hydrates de carbone, d'alcool ou d'acide carboxylique suivi d'un domaine hydrophobe (chaîne non polaire) composé d'acides gras à longue chaîne ou d'acides gras hydroxylés. La réduction de la tension superficielle et interfaciale est l'une des propriétés la plus importante de ces biosurfactants.

L'objectif de notre étude est l'optimisation de l'effet des biosurfactants produits par une souche de *Pseudomonas* sp. sur la croissance de la plante *Lens culinaris* Medik, par la variation des trois paramètres suivants : température, pH et concentration du biosurfactant, en appliquant la méthode de surfaces de réponses associée aux trois réponses suivantes : la longueur de la tige, le poids de la végétale après séchage, et le pourcentage de germination.

Après expérimentation, nous avons obtenu un maximum de croissance avec une hauteur moyenne de 12 cm et un poids de 0.0876g à des concentrations faibles de biosurfactant et à une température de 25 °C et un pH basique proche de la neutralité en comparaison au témoin négatif où la hauteur moyenne ne dépasse pas 2.92 cm et un poids de 0.0267 g.

La caractérisation structurale par Infrarouge à Transformée de Fourier du biosurfactant produit, suggère son appartenance à la classe des glycolipides.

Mots clés : biosurfactants, *Lens culinaris* Medik, optimisation, *Pseudomonas* sp. , rhamnolipides.

Abstract

Microbial surfactants or biosurfactants are natural surfactants produced by bacteria, yeasts or fungi. They have an amphiphilic molecular structure, consisting of a hydrophilic domain (polar head) composed of amino acids, carbohydrates, alcohol or carboxylic acid followed by a hydrophobic domain (non polar chain) composed of long

chainfattyacids or hydroxylatedfattyacids. The reduction of surface and inter-facial tension is one of the most important properties of thesebiosurfactants.

The objective of ourstudyis to optimize the effect of biosurfactantsproduced by a strain of *Pseudomonas* sp. on the growth of the plant *Lens culinaris*Medik, by the variation of the threefollowingparameters: temperature, pH and concentration of the biosurfactant, by applying the method of surfaces of answersassociatedwith the followingthreeanswers: the length of the stem, the weight of the plant afterdrying, and the percentage of germination.

After experimentation, weobtained maximum growthwith an averageheight of 12 cm and aweight of 0.0876 g atlow concentrations of biosurfactant and at a temperature of 25 ° C and a basic pH close to neutralitycompared to the negative control. where the averageheightdoes not exceed 2.92 cm and a weight of 0.0267 g.

Fourier transforminfrared structural characterization of the biosurfactantproduct, suggestsitsmembership in the glycolipids class.

keywords : biosurfactants, *Lens culinaris*medik, optimization, *Pseudomonas*sp. , rhamnolipids