République Algérienne Démocratique Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA
Faculté de la Technologie
Département de Génie des Procédés et Environnements

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par :

TAANE Meriem
GUERROUAMSSA Batoul

En vue de L'obtention du Diplôme de master en Génie des Procédés

Option : Bioprocédés pharmaceutiques

Dirigé par :

Dr. BENKIAR Amina

Thème

OPTIMISATION D'UN MILIEU DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DE KERATINASE ISSUE DE LA SOUCHE *BACILLUS CIRCULANS*

Soutenu le 10 Juin 2017 devant le jury composé de :

Dr. FERHAT Samira	Présidente de jury
Dr. KERMET said Hadjira	Examinatrice de jury

Promo 2016-2017

الملخص

السلالة البكتيرية البروتينية العصوية DZ100 معزولة من نفايات المسلخ البليدي بالبليدة، قمنا بإعادة تنشيطها و زرعها لتسليط الضوء على قوتها البروتينية و الكيراتينية. **الإنتاج المثالي لـ** 2327 U/mL **بعد** 36 ساعة و محيط بـ 37 درجة مئوية في وسط سائل منشط بقاعدة الكازين و الصويا ببتون.

هذا البروتين يتميز بخصائص كبيرة مقابل الأسس البروتينية والأسس الكيراتينية. من جهة أخرى، الكيراتيناز التي تفرزها السلالة البكتيرية DZ100 تقدم سمات خاصة التي يمكنها تقديم المزيد في عديد التطبيقات البيو تكنولوجية لا سيما في مجال استعادة النفايات التي ترتكز على الكيراتين.

كلمات مفتاحية:نشاط كيراتيني، العصوية الدائرية، كيراتيناز، بروتياز

Résumé

La souche bactérienne protéolytique de Bacillus circulants DZ100 nouvellement isolée à partir des effluents de l'abattoir municipal de la wilaya de Blida, à été réactivé et cultivé pour mettre en évidence son pouvoir protéolytique et kératinolytique. La production est optimale de 2327 U/mL après 36 h de culture à 37 °C sur le milieu liquide optimisé à base de caséine et peptone de soja.

Cette protéase se distingue par une large spécificité vis-à-vis les substrats protéiques et surtout les substrats kératinolytiques. Par ailleurs, la kératinase sécrétée par la souche de Bacillus Circulants DZ100 présente des caractéristiques particulières qui lui confère plusieurs applications biotechnologiques notamment dans la valorisation des déchets a base de kératine.

Mots clé : Activité kératinolytique, Bacillus circulants, kératinase, Protéase

Abstract

The newly isolated Bacillus circulating Bacillus bacterial strain DZ100 from effluent from the municipal slaughterhouse of the Blida wilaya was reactivated and cultivated to demonstrate its proteolytic and keratinolytic potency. The optimum production is 2327 U / mL after 36 h of culture at 37 ° C. on the optimized liquid medium based on casein and soybean peptone.

This protease is distinguished by a wide specificity with respect to protein substrates and especially keratinolytic substrates. Moreover, the keratinase secreted by the strain of Bacillus Circulants DZ100 has particular characteristics which gives it several biotechnological applications, especially in the recovery of keratin-based waste.

Keywords : Keratinolytic activity, circulating Bacillus, keratinase, Protease

REMERCIEMENT

Nous remercions tout d'abord notre DIEU Allah tout puissant de nos avoir données la persévérance et l'obstination de parcourir notre chemin.

Nous souhaite remercions **Mme BENKIAR Amina** notre promotrice pour ses remarques précieuses, pour son aide, leur soutiens et leur encouragements. Quoi que nous disons, les mots ne sauraient exprimer nos profondes gratitudes pour avoir dirigé ce mémoire, qu'il trouve ici l'expression de notre respect..

Nous exprimons également notre vive reconnaissance à **Mme FARHAT Samira** pour avoir accepté de présider le jury de notre soutenance. Et aussi Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à **Melle KARMAT SAID Hadjira**, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire, qu'elle trouve ici nos sincères remerciements.

Nous tenons à remercier l'ensemble du personnel du hall technologique de l'université **YAHIA FARES de MEDEA** le directeur, les ingénieurs des laboratoires et les agents…etc. Pour leurs aide et surtout leurs disponibilité.

Sans oublier l'ensemble d'enseignements qui ont contribué à notre formation

Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui nos ont aidé de prés ou de loin durant l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mon père :

Mr. **TAANE Lakhder** en signe de reconnaissance de l'immense bien que vous avez fait pour moi concernant mon éducation, qui aboutit aujourd'hui a la réalisation de cette étude. Recevez à travers ce travail, toute ma gratitude et mes profonds sentiments. Que Dieu le tout puissant soit à vos côtés et vous accorde une meilleure santé (amin).

A ma mère :

Mme. **TAANE Zohra** pour m'avoir

Donnée la vie et la joie de vivre.

Ta bonne éducation, tes conseils et tes bénédictions n'ont jamais fait défaut,

Que Dieu le tout puissant t'accorde son paradis éternel (Amin).

Toutes ces années ; vous étiez toujours présente quand j'avais besoin de vous.

A tous mes grands père et mère

A mes chères frères: Tarek, Abdelwahab, Mohammed

A ma chère sœur: Marwa

A mes belles sœurs: Naima et Amel

A ma nièce : Maram

A toutes ma famille: TAANE et SELLAMI

A ma chère jumeau: Batoul

A mes amies les plus chère

Et a tous les amis sans exception.

Meriem...

Je dédie ce travail :

A mon père :

Mr **GUEROUAMSSA Fodil** en signe de reconnaissance de l'immense bien

Que vous avez fait pour moi concernant mon éducation

Qui aboutit aujourd'hui a la réalisation de cette étude. Recevez à travers

Ce travail, toute ma gratitude et

Mes profonds sentiments. Que Dieu le tout puissant

Soit à vos côtés et vous accorde une meilleure santé (amin).

A la mémoire de ma mère :

Mme **GUEROUAMSSA Amina** pour m'avoir

Donnée la vie et la joie de vivre.

Ta bonne éducation, tes conseils et tes bénédictions n'ont jamais fait défaut,

Que Dieu le tout puissant t'accorde son paradis éternel (amen).

A ma chère grande mère: (MANI) et mes grands père

A ma sœur: Loubna

A mon frère: Med Islem

A toutes ma famille: GUEROUAMSSA et RAHMANI

A ma chère jumeau: Meriem

A mes chères amis

Batoul...

Table de Matières

RESUME

REMERCIEMENT

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FUGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ANNEXES

ABREVIATIONS ET UNITES UTILISEES

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale……..1

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les Protéases .....……...……3

I.1. Introduction .....…….…….3

I.2. Classification des enzymes protéolytique……..…….....……3

I.2.1 Protéases à sérine……..…….....…..……3

I.2.2 Protéases à cystéine ou à thiol.…….....…….4

I.2.3 Protéases acides…….....……..…6

I.2.4 Métalloprotéases…….....……....6

I.2.5 Peptidases à thréonine…….....……6

I.3 Origines des enzymes protéolytiques……...…….....7

I.3.1 Protéases d'origine végétale……...…….....7

a. La papaïne…..…….....7

b. kératinase…….....…...7

c. Ficine……..…….....……8

I.3.2 Protéases d'origine animale……..……..…….....……..8

a. La trypsine…….....……..8

b. La chymotrypsine……..…….....……8

c. La chymosine…….....……8

d. la pepsine…….....……..8

e. la rénnine……..…….....…….9

I.3.3 Protéases d'origine microbienne…….....……..9

a. Protéases bactériennes…….....……..9

b. Protéases fongiques…….…….....……9

II. Les kératines et kératinases…….....…….....…….11

II.1. Les substrats kératiniques…….....…11

II.1.1. Les kératines α…….....11

II.1.2. Les kératines β……..…….12

II.2. Plumes……..….....13

II.2.1. Origines des plumes……..…….....…..……13

II.2.2. Types de plumes……...……..13

II.3. Composition des plumes…….....…..14

II.4. Kératinases……14

II.4.1. Kératinases bactériennes……14

II.4.2. Kératinases fongiques……15

II.5. Applications des kératinases…….17

II.5.1. Valorisation des plumes……...…….....17

II.5.2. Traitement de la chevelure……....18

II.5.3. Traitement du cuir…….……19

II.5.4. Traitement des films photographiques……..……19

II.5.5. Traitement des rejets industriels……..……..……20

II.5.6. Traitement de la soie……..……...…….20

II. 5.7. Industrie pharmaceutique……..……21

II.5.8. Industrie agroalimentaire……21

II.6. Conclusion……..22

MATERIELS ET METHODES

II. Matériels et Méthodes……23

II.1. Introduction…….23

II.2. Matériels ……..23

II.2.1 Matériels biologique……...……23

a. Souche de « Bacillus circulans DZ100 »….…….23
b. Plumes..……24

II.2.2. Produits chimiques et réactifs utilisés……24

a : Farine de plumes…….25

b: Milieu LB ……..…….....25

c : Milieu nutritif au ……25

d : Milieu solide d'isolement de bactéries kératinolytiques (GNFP)…….25

e : Milieu initiale de dosage de l'activité protéolytique…….26

II.2.3.Tampons et Solutions……26

II.3. Les Méthodes……26

III.3.1-La réactivation de la souche de *Bacillus circulans* DZ100……26

III.3.2-Méthode d'incubation……26

II.3.3. Dosage de l'activité protéolytique……27

II.3.4-Dosage de l'activité kératinolytique …….29

II.3.5 : Optimisation de la production de la kératinase par la souche ***BACILLUS CIRCULANS*** …….30

a. Effet de différentes sources de carbone sur la production de kératinase ……30
b. Effet de concentrations croissantes de caséine sur la production de kératinase..31
c. Effet de différentes sources d'azote sur la production de kératinase……...31

d. Effet de concentrations croissantes de peptone de soja sur la production de kératinase ……..31

e. Effet des composantes du milieu sur la production de kératinase ……31

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. Résultats et Discussions……32

III.1. Introduction ……..……32

III.2. Réactivation de la souche bactérienne « *Bacillus circulans* DZ100 »…….32

III.3. Vérification du pouvoir protéolytique de la souche de *Bacillus circulans* DZ100…….33

III.4. Optimisation des conditions de production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100 ……..……34

III.4.1. Effet de différentes sources de carbone sur la production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100……..35

III.4.2. Effet de la concentration de la caséine sur la production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100.……36

III.4.3. Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100……37

III.4.4. Effet de la concentration de peptone de soja sur la production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100……38

III.4.5. Effet de différentes concentrations de différentes sources d'oligo-éléments sur la production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100……..39

III.5. Mise an évidence du pouvoir kératinolytique de la protéase sécrété par la souche de Bacillus Circulans ……..44

III.5.1. Etalement sur milieu à base de kératine (GNFP) ……..……..44

III5.2. Dosage de l'activité kératinolytique……..45

III.6. Conclusion ……..45

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale .....……..46

REFERENCE S BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques ……...……..….....….48

Liste des figures

Figure I-2-1 : Mécanisme des peptidases à sérine 4

Figure I-2-2: Mécanisme des peptidases à cystéine 5

Figure II.1 : Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure primaire de l'**α-kératine** de la chevelure 12

Figure II.2 : Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure secondaire de la **β-kératine** et des ponts disulfures (S-S) de la chevelure humaine 12

Figure II.3 : Présentation schématique d'une plume 14

Figure III.1 : Aspect des cellules bactériennes de la souche *Bacillus Circulans* sous microscope optique G×100 24

Figure III.2 : Plumes de poulets 24

Figure III.3 : Les tubes au cours de la réaction 28

Figure III.4 : Les tubes après l'arrêt de la réaction (rajout de TCA) 28

Figure IV.1: réactivation de la souche de ***Bacillus circulans DZ100*** sur LB 33

Figure IV.2 : Mise en évidence d'activité protéolytique de la souche de ***Bacillus circulans* DZ100** sur GNL 34

Figure IV.3: Optimisation de la concentration de la caséine sur la production de protéase(s) par la souche ***Bacillus circulans* DZ100** 36

Figure IV.4 : Optimisation de la concentration de peptone de soja sur la production de protéase(s) par la souche ***Bacillus circulans* DZ100** 38

Figure IV.5 : Optimisation de la concentration de Sulfate de Magnésium sur la production de protéase(s) par la souche ***Bacillus circulans* DZ100** 40

Figure IV.6 : Optimisation de la concentration de Chlorure de Sodium sur la production de protéase(s) par la souche ***Bacillus circulans* DZ100** 41

Figure IV.7 : Optimisation de la concentration de Chlorure de Calcium sur la production de protéase(s) par la souche ***Bacillus circulans*** **DZ100** 42

Figure IV.8 : Optimisation de la concentration de KH_2PO_4 sur la production de protéase(s) par la souche ***Bacillus circulans*** **DZ100** 43

Figure IV.9 : Mise en évidence d'activité kératinolytique de la souche de ***Bacillus circulans*** **DZ100** sur GNFP 44

Liste des tableaux

Tableau IV.1: Effet de différentes sources de carbone sur la production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100 35

Tableau IV. 2. **:** Effet de la variation de la concentration de la caséine sur le rendement de production de protéase sécrété par la souche de *Bacillus circulans* DZ100.....37

Tableau IV.3 : Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100 37

Tableau IV.4: Effet de la variation de la concentration de peptone de soja sur le rendement de production de protéase sécrété par la souche de *Bacillus circulans* ….…..….....39

Tableau IV.5 : Effet de la variation de la concentration de Sulfate de Magnésium sur le rendement de production de protéase sécrété par la souche de *Bacillus circulans* DZ100 40

Tableau IV.6 : Effet de la variation de la concentration de Chlorure de Sodium sur le rendement de production de protéase sécrété par la souche de *Bacillus circulans* DZ100 ...41

Tableau IV.7 : Effet de la variation de la concentration de Chlorure de Calcium sur le rendement de production de protéase sécrété par la souche de *Bacillus circulans* DZ100…….....42

Tableau IV.8 : Effet de la variation de la concentration de KH_2PO_4 sur le rendement de production de protéase sécrété par la souche de *Bacillus circulans* DZ100.....43

Abréviations

Aa : Acide aminé

Cys (C) : Cystéine
°C : Degré Celsius
Da :Dalton (Da, KDa)
DO : Densité optique
EC : Enzyme commission
EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EGTA : Acide éthylène glycol-bis-(β-aminoethyl éther)-N,N-tétra-acétique
Gly (G) : Glycine
GNL : Gélose nutritive au lait
GNFP : Gélose nutritive à base de farine de plume
h : Heure
His (H) : Histidine
L : Litre (L, mL, µL)
LB : Milieu Luria Bertani
Leu (L) : Leucine
Lys (K) : Lysine
m : Mètre (mm, µm, nm)
min : Minute
Phe (F) : Phénylalanine
Pro (P) : Proline
rpm : Rotation par minute
SAPDZ : «Serine alkaline protease from *Bacillus circulans* DZ100»
SAPB : «Serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS»
Ser (S) : Serine
TCA : Acide trichloroacétique
Thr (T) : Thréonine
Trp (W) : Tryptophane
Tyr (Y) : Tyrosine
U : Unité enzymatique internationale
U.V. : Ultra-violet
w/v : Masse/volume
v/v : Volume/volume

INTRODUCTION GENERALE

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION GENERALE

Chaque année, l'industrie avicole génère des millions de tonnes de plumes de volailles. Ces sous-produits, riches en protéines (90 % de kératine), sont peu valorisés en alimentation animale en raison de la faible digestibilité de leur principal constituant : la kératine.

A son état natif, cette protéine est non dégradable par un ensemble d'enzymes protéolytiques telles que la trypsine, la pepsine et la papaïne. Pour augmenter la valeur nutritionnelle des protéines kératiniques, ces dernières doivent être dégradées par des traitements thermiques, chimiques et/ou enzymatiques.

Les enzymes actives sur les kératines sont appelées kératinases. L'activité kératinolytique a été mise en évidence chez plusieurs bactéries du genre *Bacillus* tels que *Bacillus* sp. FK46 **[1]** et *B. licheniformis* PWD-1 **[2].** Il existe également différentes espèces de champignons pouvant dégrader les kératines de plumes tels que *Aspergillus fumigatus* **[3]** et *Doratomyces microsporus* **[4].**

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources locales riches en protéines et dans la nécessité de substituer des produits importés (comme les hydrolysats protéiques et les extraits de levures) par des produits locaux et bon marché et a pour objet la valorisation des déchets kératiniques (plumes de volailles, laines, cheveux …).

Les hydrolases sont les plus utilisées dans le secteur industriel. Parmi elles les protéases, enzymes qui catalysent la coupure des liaisons peptidiques des protéines et des peptides, sont les plus vendues dans le monde **[5].** Les protéases sont utilisées en brasserie, en tannerie, en panification, en alimentation animale, en textile, en fromagerie, en industrie pharmaceutique, en médecine, en détergence,...

Les protéases sont largement répandues dans le monde animal et végétal, ainsi que chez les microorganismes. Cependant, l'incapacité des protéases d'origines animale et végétale à subvenir au besoin mondial de plus en plus croissant, a conduit à une augmentation de l'intérêt des enzymes microbiennes. Les microorganismes représentent une source excellente d'enzymes grâce à leur vaste diversité biochimique et leur susceptibilité aux manipulations génétiques **[6],** d'autant plus que les protéases microbiennes sont préférées aux protéases animales et végétales puisqu'elles possèdent à peu près toutes les caractéristiques pour les applications biotechnologiques **[6].** Environ 70% de la production mondiale des protéases sont assurés par des microorganismes [3], notamment par les champignons du genre *Aspergillus*, mais surtout par les bactéries des genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Lactococci*,… **[5]**

Les hydrolysats protéiques de kératine pourraient trouver des applications dans divers secteurs notamment l'alimentation animale. En effet, l'incorporation de kératinase dans la ration alimentaire contenant de la kératine (issue de plumes de volailles notamment) augmenterait la digestibilité de la protéine. Ces hydrolysats protéiques pourraient être également utilisés en microbiologie appliquée comme substrats azotés et/ou carbonés aussi bien pour la croissance des microorganismes que la production de métabolites. La production de peptides à activités biologiques (facteurs de croissance, bactériostatique, anti-oxydante …) pourrait être également envisagée.

Ce présent manuscrit s'articule autour de trois parties :

La première partie est une approche bibliographique succincte a été faite sur les protéases, leur classification et origine. Egalement, nous traitons ici les kératinases en tant que biomolécules d'intérêt et, surtout leurs applications en technologie industrielle.

Nous présentons dans la deuxième partie de ce manuscrit le matériel et la méthode utilisée pour concrétiser l'expérimentation avec une description détaillée de différents protocoles expérimentaux a été aussi effectuée.

La troisième partie présentera les résultats obtenus ainsi que les interprétations et discussions qu'ils peuvent susciter. Cette partie renferme les résultats relatifs à la réactivation de la souche bactérienne de *Bacillus circulans* DZ100 et aussi a la vérification du pouvoir protéolytique de la souche sujette de notre travail. Puis nous présentons les conditions optimales de production de la protéase sécrétée par notre souche. Nous clôturons cette partie par la mise an évidence du pouvoir kératinolytique de la protéase sécrété par la souche de *Bacillus circulans* DZ100.

Enfin, en guise de conclusion générale nous synthétisons les résultats acquis et dégagerons les perspectives de la poursuite de ce travail de recherche.

I. LES PROTEASES

I.1. Introduction

Les protéases figurent parmi les enzymes hydrolytiques les plus importantes et les plus largement étudiées depuis l'avènement de l'enzymologie. Ces enzymes catalysent des réactions d'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines et des peptides **[7].**

Les protéases peuvent être classées en deux grandes catégories : les protéases extracellulaires qui catalysent l'hydrolyse des protéines en petits peptides facilement assimilables par les cellules et les protéases intracellulaires qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des processus cellulaires et métaboliques.

Les protéases présentent une très large diversité ; paradoxalement, elles peuvent être dotées d'une très grande spécificité d'action. Cette caractéristique a rendu leurs exploitations et leurs applications physiologiques et biotechnologiques intéressantes **[7].**

I.2. Classification des enzymes protéolytiques

Les protéases possèdent des activités exoprotéasiques ou endoprotéasiques. Les exoprotéases sont classées en aminopeptidase, dipeptidyl peptidase, tripeptidyl peptidase, carboxypeptidase et peptidyl dipeptidases **[8].**Tandis que, les endoprotéases hydrolysent les protéines au niveau de sites spécifiques internes. La spécificité de la réaction est basée sur la nature des acides aminés de l'enzyme qui forment la poche catalytique et donc, qui interagissent avec les acides aminés du substrat.

Ainsi, les protéases sont subdivisées en cinq sous groupes selon la nature du site catalytique et l'ion métallique présent dans le site actif : protéases à sérine, protéases à thiol, protéases acides, protéases à thréonines et métalloprotéases **[7 , 9 , 10].**

I.2.1. Protéases à sérine

Les protéases à serine sont très répandues dans la nature et forment une famille d'enzymes apparentées entre elles. Ces enzymes possèdent une triade catalytique qui est définie par les acides et la structure primaire ("trypsine"-H-E-S ; "subtilisine"-E-H-S) permet de différencier ces deux groupes de protéases. Le mécanisme catalytique est le même dans les deux groupes. Le groupement hydroxyle de la sérine agit comme un site nucléophile en initiant la formation de l'acétyle-enzyme qui sera hydrolysé par l'intervention d'une molécule d'eau.

Les protéases à sérine sont inhibées de manière irréversible par le 3,4-dichloroisocoumarine (3,4-DCI), le diisopropylfluorophosphate (DFP) et le phénylméthylsulphonyl fluoride (PMSF). Certaines protéases à sérine sont également inhibées par les réactifs à thiol tel que le p-chloromercuribenzoate (pCMB) du fait de la présence d'un résidu cystéine à proximité du site catalytique **[7].**

Les protéases à sérine sont, généralement, neutres ou alcalines avec un pH optimum d'activité situé entre 7 et 11. Leurs masses moléculaires varient entre 18 et 35 kDa **[8].**

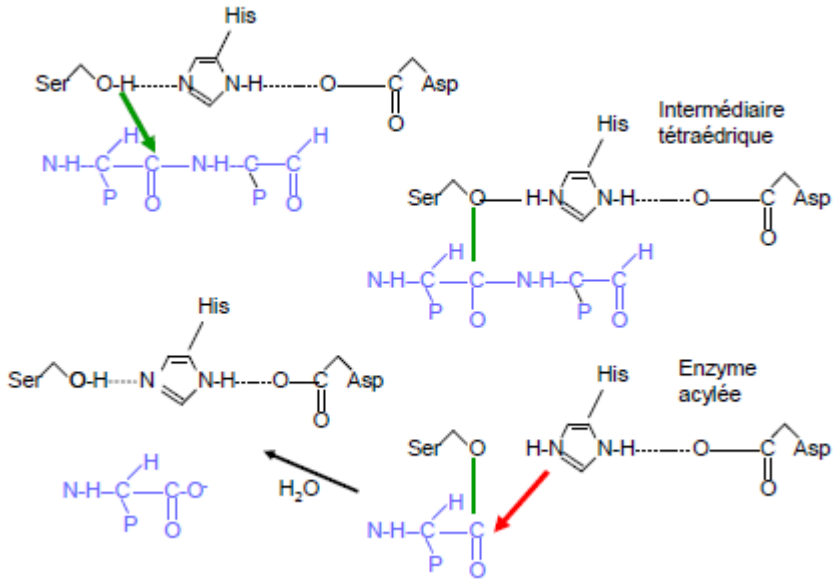


Figure I-2-1 : Mécanisme des peptidases à sérine. Le polypeptide (bleu) s'insère dans la protéase (noir) à sérine de telle manière que le groupement carbonyle soit proche de la sérine. Le groupement OH de la sérine attaque le groupement carbonyle et l'azote de l'histidine accepte le OH de la sérine (vert). Une association enzyme-substrat intermédiaire tétraédrique se forme. Puis, l'enzyme est acylée et le premier produit d'hydrolyse est libéré (flèche rouge). Dans une réaction finale l'enzyme est déacylée et l'extrémité C-terminale est libérée **[11].**

I.2.2. Protéases à cystéine ou à thiol

Ces protéases sont présentes aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Leur activité dépend de la présence de la diade catalytique cystéine et histidine. Il existe deux types de protéases à cystéine :

- Les protéases à cystéine "papaïn-like" qui disposent d'une diade catalytique composée d'une cystéine et d'une histidine ;

- Les protéases de type chymotrypsine qui se caractérisent par une triade catalytique analogue à celle des protéases à sérine où le résidu sérine est remplacé par une cystéine.

Généralement, les protéases à thiol sont inhibées par le p-chloromercuribenzoate (pCMB), l'iodoacétamide et la N-éthylmaléimide, mais elles ne sont pas affectées par la présence d'agents chélateurs**[12].**

Leur pH optimum d'activité se situe au voisinage de la neutralité. La papaïne est l'une des protéases à thiol les plus connues **[7].**

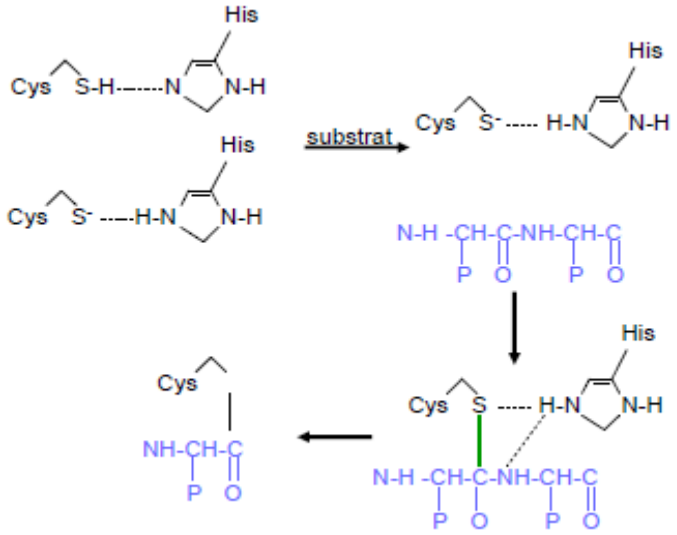


Figure I-2-2: Mécanisme des peptidases à cystéine : Le premier pas du mécanisme catalytique est la déprotonisation d'un groupement thiol dans le site actif de l'enzyme (noir) réalisé par un acide aminé adjacent possédant une chaîne latérale basique (souvent c'est une histidine). Le deuxième pas consiste en une attaque nucléophile du soufre anionique de la cystéine sur le groupe carbonyle du substrat (vert). Dans ce pas, un fragment du substrat (bleu) est libéré. L'histidine dans la protéase est restaurée sous sa forme deprotonisé et un intermédiaire thioesther lie l'extrémité carboxy-terminale du substrat à la cystéine. La liaison thioesther est hydrolysée pour générer un acide carboxy-terminal et l'enzyme est restaurée **[13]**.

I.2.3. Protéases acides

Cette classe est composée de protéases dont le site catalytique est formé de deux résidus d'acide glutamique. L'hydrolyse protéolytique découle d'une réaction acido-basique. Contrairement aux deux classes précédentes, le mécanisme de coupure protéolytique ne nécessite pas le passage par un intermédiaire enzymatique acylé.

Les protéases acides microbiennes peuvent être divisées en deux groupes :

- Les enzymes "pepsin-like" produites par *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* et *Neurospora* ;
- Les enzymes "rennin-like" produites par *Endothia* et *Mucor* sp. **[7].**

Ces protéases sont inhibées par la pepstatine **[14]** et le diazo-acétyl-norleucine-méthyl-ester **[15].**La meilleure activité des protéases acides est obtenue à un pH compris entre 3 et 4 **[16],** leurs points isoélectriques sont compris entre 3 et 4,5 et leurs masses moléculaires varient de 30 à 45 kDa **[8].**

I.2.4. Métalloprotéases

Les métalloprotéases représentent le groupe d'enzymes le plus diversifié. Elles se caractérisent par la présence, au niveau du site catalytique, un ion divalent souvent le Zn^{2+}**[17].** Par ailleurs, au moins une histidine (H) et un acide glutamique (E) sont impliqués dans la réaction catalytique. L'histidine permet la coordination de l'ion métallique qui conduit à l'attaque nucléophile pendant laquelle l'acide glutamique a un rôle de donneur d'électron **[10].**

Les métalloprotéases sont divisées en quatre sous groupes : les métalloprotéases neutres, les métalloprotéases alcalines, les métalloprotéases de *Myxobatcer* I et celles de *Myxobacter* II. Ces enzymes sont inhibées par les agents chélateurs tels que l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA), l'o-phénanthroline et la 8-hydroxyquinone.

Les métalloprotéases étudiées sont actives dans des conditions légèrement alcalines de pH 7 à 9 et leurs masses moléculaires sont comprises entre 35 et 45 kDa.

I.2.5. Peptidases à thréonine

Les protéases à thréonine sont des peptidases dont le résidu d'acide aminé nucléophile de la triade catalytique est une thréonine. Les sous-unités catalytiques du protéasome sont le prototype de cette famille d'enzymes, mais les acyltransférases ont fait l'objet d'une convergence évolutive vers le même type de géométrie et de mécanisme réactionnel de leur site actif.

Les protéases à thréonine utilisent l'alcool secondaire de leur thréonine N-terminale comme résidu nucléophile nécessaire à la catalyse**[18 , 19]**. Ce résidu doit être N-terminal car l'amide terminal agit comme base en polarisant une molécule d'eau qui déprotone l'alcool secondaire et accroit sa réactivité comme nucléophile**[20 , 21]**.

La catalyse intervient en deux temps :

- Le résidu nucléophile attaque le substrat pour former un intermédiaire acyl-enzyme covalent, ce qui libère le premier produit ;
- L'intermédiaire est hydrolysé pour libérer le second produit et régénérer l'enzyme libre.

Ce type de mécanisme réactionnel est commun aux enzymes dont le site actif utilise une triade catalytique.

I.3. Origines des enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques sont ubiquitaires parmi tous les organismes vivants, elles peuvent être d'origines végétale, animale ou microbienne.

I.3.1. Protéases d'origine végétale

Les protéases d'origine végétale les plus connues sont :

- **La papaïne**

Cette protéase a été isolée et caractérisée pour la première fois aux Etats Unis (USA) à partir du latex d'une plante équatoriale et tropicale **(*Carica papay)* Broméline :** Extraite à partir de l'ananas (*Ananas comosus merr*). C'est une protéase à cystéine active à des pH allant de 5 à **[22].**

- **Kératinase**

Certains des groupes botaniques des plantes produisent des protéases qui dégradent les cheveux. Ainsi, la digestion des cheveux et de la laine peut servir pour la production des acides aminés essentiels comme la lysine et la prévention du colmatage des systèmes du traitement des eaux usées**[7].**

- **Ficine**

Issue des figues (*Ficus carica latex* et *Ficus glabrata*)**[23 , 24 , 25]**. Cette enzyme est utilisée dans l'industrie alimentaire, dans l'industrie de textile, en pharmacologie, en cosmétologie et en immuno-hématologie pour la recherche d'anticorps irréguliers**[26].**

I.3.2.Protéases d'origine animale

Les protéases les plus connues de cette famille sont :

- **La trypsine**

Elle est d'origine pancréatique et est responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires au niveau de l'intestin. Sa masse moléculaire est de 23 kDa. Son pH optimum d'action est de 8. C'est la protéase à sérine la plus spécifique des protéases connues, elle coupe après la lysine ou l'arginine. La trypsine est utilisée pour la préparation des hydrolysats de caséine (Tryptone) ajoutés dans les milieux bactériologiques.

- **La chymotrypsine**

C'est une protéase à sérine de 24 kDa, extraite de pancréas d'animaux. Elle coupe après les acides aminés arômatiques : la phénylalanine, la tyrosine ou le tryptophane.
La chymotrypsine est synthétisée au niveau du pancréas sous forme d'un précurseur inactif, le chymotrypsinogène qui est activé par la trypsine par hydrolyse de deux dipeptides (les acides aminés 14 et 15 et les acides aminés 147 et 148) donnant lieu à trois chaînes peptidiques A, B et C liées par deux ponts disulfures.

- **La chymosine**

C'est une protéase aspartique extraite des caillettes de veaux et elle est utilisée dans la fabrication du fromage **[15].** Elle a une action spécifique sur la caséine : elle hydrolyse la liaison 105-106 entre la phénylalanine et la méthionine de la caséine, provoquant la coagulation du lait.

- **La pepsine**

C'est une protéase acide de 35 kDa, qu'on trouve dans l'estomac de presque tous les mammifères. L'optimum de son activité est situé entre pH 1 et 2 et elle est complètement inhibée à partir de pH 6. La pepsine hydrolyse les liaisons peptidiques qui se trouvent entre deux acides aminés hydrophobes. Elle est thermosensible en solution à des températures supérieures à 55°C. Elle peut être utilisée en brasserie, au cours de la stabilisation colloïdale et dans la préparation du fromage.

- **La rénnine**

Elle est produite sous forme de précurseur inactif (prorénnine) dans l'estomac des nourrissons de mammifères. Elle devient active après action de la pepsine ou par autolyse. Sa masse moléculaire est de l'ordre de 37 kDa. Elle est largement utilisée en industrie laitière pour produire un lait caillé.

I.3.3 Protéases d'origine microbienne

Vu leur grande nécessité dans la physiologie des organismes vivants, les protéases sont ubiquitaires et ont une large variété d'origine, notamment, les microorganismes et particulièrement les bactéries. On distingue ainsi :

a. Protéases bactériennes

Ces dernières représentent la source enzymatique la plus intéressante puisqu'elles ont une croissance rapide, un espace de culture limité et une manipulation génétique facile permettant de générer de nouvelles activités enzymatiques désignées pour des applications variées. La majorité des protéases commercialisées, neutres et alcalines, sont produites par des bactéries du genre *Bacillus*. Les deux protéases très connues et bien caractérisées sont : la subtilisine Carlsberg produite par *B. licheniformis* utilisée dans les détergents **[27]** et la subtilisine commerciale BPN' produite par *B. amyloliquefaciens* **[28].**

b. Protéases fongiques

Les champignons produisent un spectre d'hydrolases plus large que les bactéries. Par exemple, *A. oryzae* produit des protéases acides, neutres et alcalines **[7].**

Les protéases fongiques acides présentent un pH optimum d'activité compris entre 4 et 4,5 et elles sont stables à des pH allant de 2,5 à 6. Ces enzymes sont particulièrement utilisées dans l'industrie fromagère.

Les protéases fongiques neutres sont des métalloprotéases actives à un pH avoisinant 7. Elles sont utilisées pour renforcer l'action des protéases végétales, animales et bactériennes et réduire le goût amer des hydrolysats protéiques alimentaires.

Les protéases fongiques alcalines sont aussi utilisées dans la modification des protéines alimentaires. Cependant, ces protéases ont un rendement réactionnel et une thermo-tolérance plus faible que les protéases bactériennes **[7].**

II. LES KERATINASES

II.1. Les substrats kératiniques

Les kératines ou substrats kératiniques sont des protéines fibreuses hautement spécialisées connues sous le nom des scléroprotéines qui appartiennent à la famille la plus complexe de filaments intermédiaires des cellules animales, en particulier les épithéliums. Les kératines sont regroupées en kératines dures (plumes, poils, sabot et ongles) et en kératines molles (peau et les cals) en fonction de leur teneur en soufre. Elles sont connues pour leur grande stabilité, insolubilité et leur résistance à la lyse protéolytique d'ou leurs fonctions mécanique et protectrice **[29 , 30 , 31].** Il existe deux types de kératines :

II.1.1. Les kératines α

Elles constituent presque la totalité du poids sec des plumes, des cheveux, des ongles, des écailles, de la laine, des sabots, de la carapace des tortues et d'une grande partie de la couche externe de la peau. Cette protéine est riche en résidus hydrophobes Phe, Ile, Val, Met et Ala. La kératine α a une structure hélicoïdale simple avec un pas à droite**(figure II.1).** La résistance de cette protéine est amplifiée par l'enroulement de multiples brins hélicoïdaux en une super hélice appelée protofibrille. L'enroulement hélicoïdal des super-enroulements possède un pas à gauche c'est-à-dire un sens opposé à celui de l'enroulement des hélices polypeptidiques individuelles, conformation qui permet le tassement le plus serré possible des multiples chaînes polypeptidiques. La résistance de ces fibres est également augmentée par des liaisons covalentes entre les chaînes polypeptidiques à l'intérieur des "cordes" formées de plusieurs hélices et entre des cordes adjacentes. La résistance de cette protéine à l'hydrolyse enzymatique est due essentiellement à la présence de nombreux ponts disulfures qui sont les principaux responsables du maintien de sa structure tertiaire. Dans les kératines α, les plus résistantes et les plus solides telles que celles de la carapace de la tortue et des cornes de rhinocéros, jusqu'à 18 % des résidus sont des résidus cystéine impliqués dans des ponts disulfures **[32].**

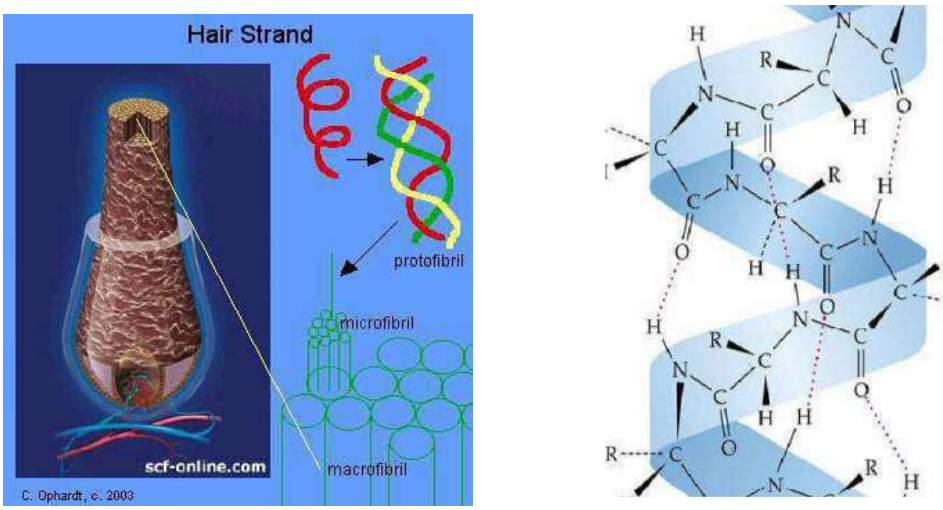


Figure II.1 : Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure primaire de l'**α-kératine** de la chevelure humaine.

II.1.2. Les kératines β

Elles sont plus flexibles et plus molles que les kératines α. Les kératines β, telles que la fibroïne de la soie et la toile d'araignée sont riches en résidus Gly et Ala. L'organisation structurale des kératines β est explorée par analyse aux rayons X. Dans la conformation β, le squelette de la chaîne polypeptidique s'étend en zigzag**(figure II.2).** Dans la fibroïne, les chaînes polypeptidiques en zigzag sont disposées côte à côte pour former une structure qui ressemble à une série de plis, une telle structure est appelée feuillet β plissé. Des liaisons hydrogène peuvent être soit intra ou inter-chaînes entre les liaisons peptidiques de chaînes polypeptidiques adjacentes **[32].**

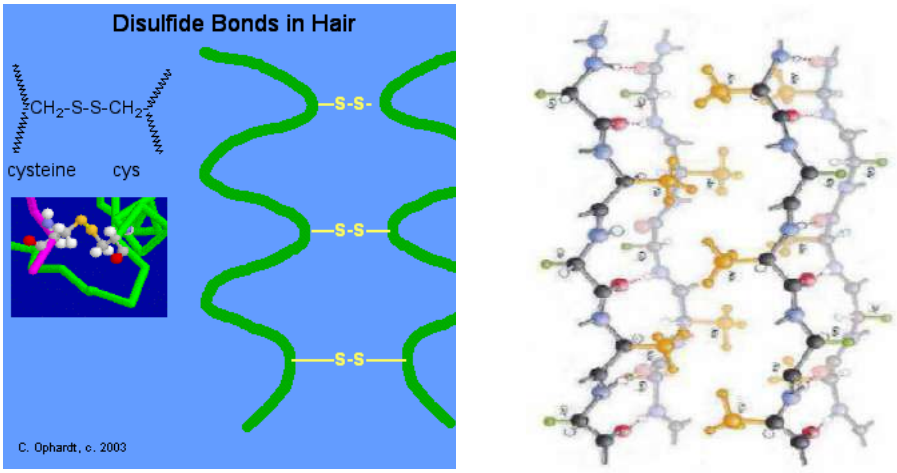


Figure II.2 : Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure secondaire de la **β-kératine** et des ponts disulfures (S-S) de la chevelure humaine.

II.2. Plumes

Une plume élément caractéristique de la classe des oiseaux, est une production tégumentaire complexe constituée de **β-kératine**. Comme les poils, les écailles, les ongles, les griffes, ou les sabots, les plumes sont des phanères.

L'ensemble des plumes, généralement plusieurs milliers, forme le plumage, dont les fonctions sont de protéger le corps de l'oiseau du milieu, notamment contre l'eau et le froid (phénomène de thermorégulation), de permettre le vol, de se camoufler. Mais il a aussi une fonction sociale et reproductive. Les plumes des oiseaux sont des exaptations : elles sont apparues comme des adaptations, jouant probablement un rôle initial de thermorégulation chez les dinosaures.

L'observation d'une plume ou du plumage peut permettre de déterminer l'espèce, le sexe, l'âge ou la santé d'un oiseau.

II.2.1. Origines des plumes

Les plumes de récupération : Proviennent de la collecte des textiles usagés ayant contenu des plumes (oreillers, coussins, couettes, anoraks, ...) effectuée par les entreprises de récupération de textile.

Les plumes et duvets neufs : proviennent de l'élevage et de l'abattage des volailles (poulets, dindes, pintades), des palmipèdes (canards et oies) ou des oiseaux terrestres. Elles sont collectées auprès des abattoirs industriels ou artisanaux.

II.2.2. Types de plumes

Les plumes d'oiseaux terrestres représentent, en poids sec, 5-7 % du poids vif de l'animal **[33].** La consommation de poulets dans le monde est estimée à 400 millions de poulets par semaine, ce qui correspond à une masse de 3000 tonnes de plumes **[8].**

On distingue plusieurs types de plumes, notamment les plumes de couverture et les pennes. Les premiers recouvrent le corps de L'oiseau, délimitent son contour et maintiennent sa température interne. Les deuxièmes sont celles qui permettent à l'oiseau de voler. Les plumes sont formées de trois parties : le rachis, les barbes et les barbules **(figure II.3).**

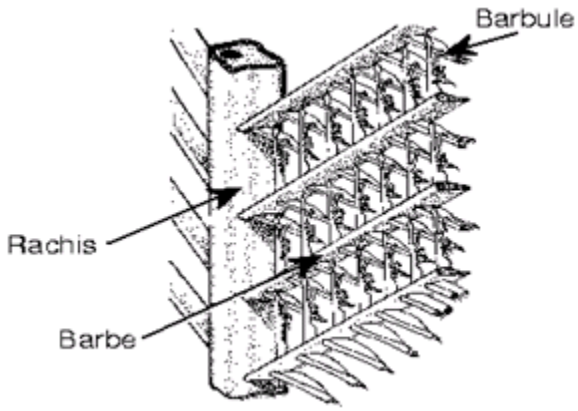


Figure II.3 : Présentation schématique d'une plume

Les oiseaux sont également pourvus de semi-plumes et de duvet formant une couche à la fois protectrice et isolante.

II.3. Composition des plumes

La composition des plumes varie selon leurs origines. Les plumes d'oiseaux terrestres sont composées d'une partie protéique (kératine α) de l'ordre de 90 % et d'une partie non protéique qui inclut des pigments, des polysaccharides, des nucléotides (adénine, guanine), de la xanthine de l'acide urique, du glucose et du ribose **[34].**

II.4. Kératinases

Les kératinases représentent l'un des plus importants groupes d'enzymes protéolytiques qui ont un grand intérêt industriel et des applications dans différents secteurs, ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser les kératines efficacement que d'autres protéases. Ce sont des enzymes qui dégradent facilement la kératine des plumes, de laine et des cheveux ainsi que d'autres protéines fibreuses (l'élastine et le collagène) et d'autres non fibreuses (la caséine, la gélatine et l'albumine) avec un haut degré de spécificité.

Du fait de leur intérêt dans diverses applications, les Kératinases de plusieurs souches bactériennes et fongique sont été purifiées et caractérisées.

II.4.1. Kératinases bactériennes

L'application des kératinases dans le domaine médical et dans l'alimentation animale a incité les chercheurs à purifier ces enzymes. En effet, une kératinase produite par *B. licheniformis PWD-1* a été purifiée pour être utilisée dans l'hydrolyse de la kératine. La purification de cette enzyme a été réalisée en trois étapes qui sont : ultrafiltration sur membrane ayant un seuil de séparation de 10 kDa, chromatographie échangeuse d'ions CMC

et gel filtration Sephadex G-75. Le facteur de purification final de cette enzyme est de 70. L'analyse par SDS-PAGE et la chromatographie sur G-75 montrent que cette enzyme est monomérique et sa taille est approximativement de 33 kDa. Son pH optimum et son point isoélectrique sont, respectivement, de 7,5 et 7,25. Sa température optimale d'activité est de 50°C**[35].**

La kératinase à sérine de la souche kératinolytique *Streptomyces pactum DSM 40530* à été purifiée en une seule étape par chromatographie d'affinité. Cette enzyme a une masse moléculaire de 30 kDa et un point isoélectrique de 8,5. Elle a une activité optimale à des pH allant de 7 à 8 et à une température de 55°C**[36].**

Une autre kératinase à sérine produite par la souche *Streptomyces albidoflavus* K1-02, cultivée sur milieu à base de farine de plumes, a été purifiée par **Bressollier *et al.* en 1999 [37]**. Sa masse moléculaire est de 18 kDa et son maximum d'activité est obtenu dans une gamme de pH et de températures allant respectivement de 6 à 9,5 et de 40 à 70°C. Son action est très spécifique pour les substrats insolubles comme la kératine, l'élastine ou le collagène comparée à la protéase de la souche *Streptomyces griseus***(*SGPB*).**

Plus récemment, **Suh et Lee(2001) [38]** ont purifié une enzyme kératinolytique produite par la souche *B. subtilis KS-1*. La purification de cette enzyme a été réalisée par ultrafiltration suivie par une chromatographie sur DEAE-Sephadex et une filtration sur G-100. L'activité spécifique de l'enzyme purifiée est de 538,2 U/mg et sa taille est de 25,4 kDa. Elle est inactivée totalement par le PMSF, il s'agit donc d'une protéase à sérine. Son activité est augmentée en présence du dithiotreitol (DTT) (5 mM) et elle est capable d'hydrolyser aussi bien la caséine que les plumes.

II.4.2. Kératinases fongiques

En 1968, la purification de la kératinase alcaline de *Trichophyton mentagrophytes* a été réalisée par **Yu *et al*.[39]**. La culture de ce champignon a été menée sur milieu contenant comme source de carbone les poils de cheval et une faible quantité de glucose. La culture a été réalisée à 25°C pendant cinq jours. La protéase a été purifiée à partir du surnageant par une chromatographie échangeuse d'anions diéthylaminoéthyl (DEAE) cellulose suivie d'une chromatographie sur gel carboxyméthyl cellulose (CMC) puis par filtration sur Sephadex (G-100). La masse moléculaire de cette kératinase a été estimée par chromatographie sur G-100 à 48 kDa **[39].**

La kératinase acide de *Trichophyton mentagrophytes* a été purifiée en **1989** par **Tsuboi *et al.*** Cette souche a été collectée d'un patient infecté par *Tinea pedis*. Pour induire la production de kératinases par ce champignon, la kératine en poudre d'épiderme humain a été ajoutée dans le milieu de culture. Après cinq jours de culture, le surnageant contenant les deux types de kératinases acide et alcaline, a été concentré par ultrafiltration, dialysé, centrifugé et déposé sur DEAE-Sepharose (CL-6B).La masse moléculaire de cette protéase a été estimée à 38 kDa par gel filtration et à 41 kDa par SDS-PAGE. Son pH optimum est de 4,5 sur la kératine et de 5,5 sur l'hémoglobine. Elle hydrolyse les constituants de la peau et constitue un facteur important de virulence en dermatologie **[40].**

Une autre souche kératinolytique identifiée comme *Xanthomonas maltophilia*(*POA-1*), cultivée dans un bouillon à base de farine de plumes et utilisant la kératine comme source unique de carbone et d'azote, sécrète quelques peptidases extracellulaires. La principale enzyme, une sérine peptidase, a été purifiée selon un processus à cinq étapes. La pureté de l'enzyme a été évaluée par électrophorèse. Cette enzyme a une masse moléculaire de 36 kDa, un pH optimal de 9 et une température optimale de 60°C. En utilisant les inhibiteurs des protéases, il s'est avéré que cette enzyme est une sérine endopeptidase. Elle est active sur des substrats autres que la kératine comme l'azo-kératine, l'azo-caséine et les substrats peptidiques fluorogènes suivants : Abz-Leu-Gly-Met-Ile-Ser-Leu-Met-Lys-Arg-Pro-Gln-EDDnp, Abz-Lys-Leu-Cys(SBzl)-Gly-Pro-Lys-Gln-EDDnp et Abz-Lys-Pro-Cys(SBzl)-Phe-Ser-Lys-Gln-EDDnp **[41].**

Deux protéases kératinolytique de *Microsporum canis*, une à sérine "subtilisine-like" et l'autre métalloprotéase, ont été purifiées respectivement par **Mignon *et al.* (1998) et Brouta *et al.* (2001) [42],[43]**. Les deux kératinases ont été produites sur milieu contenant la kératine comme seule source de carbone. Leur purification a été réalisée par chromatographie d'affinité sur agarose-bacitracin, comme première étape, suivie par filtration sur gel pour la protéase à sérine subtilisine-like et par chromatographie hydrophobe sur agarose-octyl pour le cas de la métalloprotéase. La première kératinase a une masse moléculaire de 31,5 kDa et une activité optimale à pH 9 et à une température de 55°C. Alors que la taille de la deuxième kératinase a été estimée à 43,5 kDa et son optimum d'activité est obtenu à pH 8 et à 55°C. Les treize acides aminés du côté N-terminal de cette métalloprotéase mature présente 60 % d'homologie avec la métalloprotéase extracellulaire d'*Aspergillus fumigatus* **[44].**

Dernièrement, une métalloprotéase kératinolytique produite sur milieu à base de plumes par *A. oryzae* a été purifiée. La purification de cette enzyme a été réalisée par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (75-85 %) suivie d'une chromatographie sur Sephadex G-75. Le facteur de purification obtenue à la fin de cette étape est de 11,30. L'électrophorèse dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE) de cette enzyme montre qu'il s'agit d'une enzyme monomérique de masse moléculaire de 60 kDa. L'enzyme purifiée est capable d'hydrolyser différents substrats tels que le sérum albumine bovine (BSA), la caséine, la kératine, les plumes de volaille, le collagène et la laine de mouton. Elle a une activité optimale à 50°C et à pH 8. Cette kératinase retient 42,05 % de son activité après incubation à 70°C pendant 60 min. Elle est activée par le calcium et le barium est inhibée par l'EDTA **[45].**

II.5. Applications des kératinases

Les protéases couvrent 40 % du marché total des enzymes. Toutefois, cette part des protéases dans le marché des enzymes est essentiellement dominée par les protéases alcalines (30 %), enzymes actives et stables à des pH alcalins **[5].**

Les protéases à activité kératinolytique peuvent être utilisées dans la valorisation des plumes (préparation d'hydrolysats protéiques pour l'alimentation animale et dans le traitement de la chevelure), le traitement du cuir, le traitement des films photographiques, le traitement des rejets industriels et le traitement de la soie.

II.5.1. Valorisation des plumes

- **Alimentation animale**

La forte teneur en protéines de la plume confère à la farine de plumes une valeur marchande proche de celle de la farine de soja **[46].** En effet, les plumes ont été valorisées depuis longtemps par solubilisation totale de la kératine pour produire un concentré protéique destiné essentiellement à l'alimentation animale. La méthode traditionnelle de solubilisation de la kératine requiert l'utilisation des agents réducteurs tels que le mercapto-acétate, l'alkylation par l'acide iodoacétique, le sulfate de cuivre, l'ammoniaque et le sulfate de sodium **[47].** Cependant, cette approche est inadéquate pour l'application à grande échelle et pour l'utilisation d'hydrolysat protéique dans l'alimentation animale. Pour cela, une méthodologie basée sur l'hydrolyse enzymatique, qui semble être très prometteuse et en

accord avec les exigences actuelles (protection de l'environnement, richesse en protéines et acides aminés essentiels) a été mise au point par **Dalev** en **1990**.

La combinaison de l'action des trois facteurs : prétraitement alcalin, désintégration mécanique en milieu liquide et action enzymatique, a permis d'avoir une solubilisation totale des plumes. Alors que l'application de chaque facteur à part n'a permis de solubiliser qu'un faible pourcentage de plumes.

Le processus d'hydrolyse proposé par **Dalev(1990)** comporte un prétraitement alcalin avec l'hydroxyde de sodium 0,2 N à une température de 75°C pendant 30 min et une hydrolyse enzymatique par la protéase alcaline B 72 produite par *B. subtilis* à une température de 55°C et un pH de 8. L'enzyme est utilisée à raison de 0,5 g par 100 g de plumes. L'hydrolyse est réalisée dans un réacteur thermostaté couplé à un agitateur qui permet la désintégration des plumes. Après 4 heures d'incubation, 94 % des plumes sont solubilisées et le produit final d'hydrolyse ne contient que des polypeptides de tailles comprises entre 10 et 50 kDa **[47].**

De même, **Cheng et al. (1995),[48]**ont rapporté l'utilisation de la protéase alcaline de *B. licheniformis* PWD-1 dans l'hydrolyse de la kératine de plumes de volailles en vue de l'obtention d'un concentré utilisable pour l'alimentation animale.

D'autres souches du genre *Bacillus* isolées et identifiées par **Dakrong** et **Worapot (2000), [49]**secrètent des kératinases capables de dégrader les plumes et de produire des protéines facilement digestibles.

II.5.2. Traitement de la chevelure

Les hydrolysats de kératine et, en particulier, ceux contenant une grande proportion d'oligopeptides présentent un vif intérêt dans l'industrie cosmétique par leur action positive sur les cheveux ou sur la peau. En effet, **Braumer et al.(1978**), **[50]**ont montré que l'hydrolysat de kératine peut être utilisé dans le traitement de la chevelure, par exemple la teinture et la décoloration. L'action des oligopeptides réside en particulier dans l'amélioration de la souplesse et de la résistance des cheveux ; les extrémités des cheveux ne se fendent plus et les cheveux prennent un beau brillant. De même, le traitement à l'aide des hydrolysats de protéines conduit à une croissance plus rapide des cheveux.

II.5.3. Traitement du cuir

La méthode traditionnelle utilisée dans le traitement du cuir implique l'utilisation du sulfide d'hydrogène et d'autres composés chimiques qui sont chers et polluants. Le biotraitement du cuir utilisant l'approche enzymatique est nettement plus favorable ; ce qui permet le contrôle facile du processus, la réduction du coût du traitement et la protection de l'environnement **[51].**

Les protéases, qui présentent une activité kératinolytique et élastinolytique, peuvent être utilisées dans le processus de traitement des cuirs. Ces protéases sont employées dans les trois étapes du processus : trempage, épilage et confitage **[5].**

Le traitement enzymatique permet :

- La destruction des protéines interfibrillaires facilitant le trempage ;
- La dégradation des protéines au niveau des follicules des cheveux accélérant leur épilages ;
- L'assouplissement des cuirs au cours de l'étape de confitage pour améliorer leur tannage.

Traditionnellement, l'étape de trempage est réalisée par des protéases pancréatiques. Cependant, ces enzymes sont coûteuses et peu disponibles **[47].** Pour ces raisons les protéases des microorganismes, qui sont plus abondantes et plus performantes, ont été appliquées dans ce type de traitement.

Hameed *et al.* (1996, 1999), [53] ont utilisé la protéase alcaline produite par *B. subtilis* K_2 dans le traitement du cuir.

II.5.4. Traitement des films photographiques

Les films photographiques sont formés de polyester, comme matière de base, enveloppé par une couche de gélatine et une couche d'argent (1,5 à 2 % par unité de masse). La gélatine, protéine fibreuse formée par des fibrilles de collagène raccourcies par chauffage intense, n'est pas dégradable par la plupart des protéases. Cependant, cette activité a été détectée pour les protéases kératinolytique. En effet, ces dernières jouent un rôle critique dans la récupération de l'argent qui recouvre les films photographiques.

Conventionnellement, l'argent est récupéré par traitement thermique des films, à l'origine de pollution et d'émanation indésirable. De plus, cette méthode ne permet pas la récupération du polyester (matière de base du film). Néanmoins, le traitement protéolytique de la couche de gélatine permet l'extraction de l'argent délimité par cette couche de protéine

et le recyclage du film de polyester. Plusieurs protéases ont été utilisées dans ce type d'application, telle que la protéase alcaline de *B. subtilis*. Celle-ci permet la décomposition de la couche de gélatine et la récupération de l'argent à la suite d'une incubation à 50-60°C pendant 30 min **[54].**

Des souches du genre *Bacillus* produisant des protéases gélatinolytiques ont été isolées par d'autres chercheurs **[55 , 56 , 57].**

II.5.5. Traitement des rejets industriels

Récemment, l'utilisation des protéases alcalines dans le traitement des déchets d'industries alimentaires et des activités ménagères a ouvert le champ à diverses applications des protéases**. Dalev(1994)** a utilisé la protéase alcaline de *B. subtilis* pour le traitement des plumes de volailles qui représentent une source de protéine importante pour l'alimentation.

L'utilisation des protéases kératinolytiques dans le traitement des déchets de volailles **[58]** et comme agent de nettoyage des conduites bouchées a été rapportée **[59].**Un produit contenant des enzymes protéolytiques de *B. subtillus*, *B. amyloliquefaciens* et *Streptomyces* sp. et des agents réducteurs (Thiaglycolate) permettant de dégrader les cheveux susceptibles d'obstruer les canalisations, a été décrit par **Jacobson *et al.* (1985), [27].**

II.5.6. Traitement de la soie

Les protéases ont été bien exploitées dans les industries de textile **[60]** notamment, dans le traitement de la soie.

Les fibres de séricine, représentant 25 % de la masse de la soie brute, couvre les fibres de soie et leur donnent une structure rigide. La séricine est ordinairement éliminée par immersion des fibres dans l'eau chaude savonneuse et légèrement alcaline. Étant donné que ce processus est généralement coûteux et diminue le rendement en soie, l'utilisation des préparations protéolytiques, comme l'alcalase de Novo, capable de dégrader ce type de fibres, a été mise au point **[61].**

Un traitement efficace des fibres de soie par une protéase alcaline produite par *Bacillus* sp. RGR-14 a été étudié. Les résultats sont analysés par gravimétrie (réduction en masse des fibres) et par microscope électronique (SEM). Après cinq heures d'incubation des fibres avec la protéase de *Bacillus* sp. une diminution de 7,5 % en masse de celles-ci a été

enregistrée. L'observation microscopique de ces fibres montre qu'il y a eu dispersion des amas fibreux par rapport aux fibres non traitées qui sont compactes **[62].**

II. 5.7. Industrie pharmaceutique

Les protéases sont aussi utilisées dans le développement de produits d'intérêt médical. Kudrya et Simonenko ont exploité en 1994 l'activité élastase de *B.subtilis* 316 M pour la préparation d'élastotérase qui est utilisée dans le traitement des brulures, de plaies infectées, des furoncles et des abcès. **Kim *et al*(1996)** ont, quant à eux, rapporté l'utilisation de protéases alcalines de *Bacillus sp,* ayant une activité fibrinolytique, dans le traitement des thromboses **[63, 64].**

De plus, diverses protéases sont utilisées pour la production d'agents à usage thérapeutiques. En effet, l'administration orale des protéases Luzym et Nortase produites par *Aspergillus oryzae* permet de corriger le syndrome lié aux déficits en enzymes lytiques. De même, la collagénase clostridiale est utilisée en combinaison avec un large spectre d'antibiotiques dans le traitement des brulures et des blessures**[5].**

II.5.8. Industrie agroalimentaire

Les protéases bactériennes sont traditionnellement exploitées dans divers secteurs de l'industrie alimentaire. En fait, la fonction principale des protéases est l'hydrolyse protéique qui a été exploitée pour la préparation des hydrolysats protéiques de haute valeur nutritionnelle. Ces hydrolysats présentent des avantages qui découlent d'une amélioration des propriétés fonctionnelles par rapport aux protéines non-hydrolysées**[47].** Ces hydrolysats protéiques sont introduits dans la formulation des produits alimentaires pour nourrissons, dans des produits thérapeutiques spécifiques des régimes alimentaires et dans la fortification des jus de fruits et des boissons non alcoolisées **[48].**

II.6. Conclusion

Les Enzymes seront évidemment plus largement utilisées dans l'avenir et cela sera reflété dans le nombre d'enzymes disponibles à l'échelle industrielle (et de recherche), la variété des réactions catalysées et la gamme de conditions environnementales dans lesquelles ils opèrent. Des enzymes seront mis à de nouveaux usages et de nouvelles enzymes, découvertes dans leurs niches biologiques ou produites par des organismes vivants, seront appliquées dans différents domaines industriels afin de généraliser l'utilisation des méthodes biologiques.

Aujourd'hui, certaines protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et utilisé en biotechnologie industrielle et d'autres sont de merveilleux outils dans la recherche. On commence également à extraire des enzymes plus stables dans des environnements physico-chimiques extrêmes. Il s'agit donc d'un thème à la fois très intéressant et prometteur au point de vue économique.

MATERIELS & METHODES

III. MATERIELS & METHODES

III.1. Introduction

Le présent travail s'articule autour des points suivants :

- Réactivation de la souche de *Bacillus circulans* DZ100 dans le milieu LB ;
- Culture de la souche de *Bacillus circulans* DZ100 sur les milieux GNL et GNFP pour mettre en évidence son pouvoir protéolytique et kératinolytique ;
- Optimisation de la production de la kératinase sécrété par la souche sujette de notre travail.

III.2. Matériels

III.2.1 Matériels biologique

a. Souche de « Bacillus circulans DZ100 »

La souche de *Bacillus circulans* DZ100 a été isolée à partir des effluents de l'abattoir municipal de la wilaya de Blida. Par ailleurs, elle a été identifiée en utilisant des approches de la taxonomie classique (Galerie API CH 50) et complémentée par la technique de biologie moléculaire (la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal, ARNr 16S) **[65].** Cette souche a été retenue pour sa capacité de produire une protéinase alcaline prometteuse d'intérêt industriel.

En 1890, *Bacillus circulans* a été découverte et nommé circulans parce que l'intérieur des colonies coulait dans un schéma circulaire. *Bacillus circulans* est une espèce de bactéries dans la famille des *Bacillaceae* **[66].** La bactérie est une cellule à Gram-positive, en forme de tige, et mobile par des flagelles peritrichous **[66, 67].** Les cellules ont une taille de 2,0-4,2 x 0,5-0,8 µm. *Bacillus circulans* se trouve dans le sol, les eaux usées, les aliments et la bile infantile **[67].** Cette bactérie est également isolée de l'intestin des larves d'abeilles **[67].** Bacillus circulans est un pathogène connu; Causant une septicémie mortelle chez un patient immunodéprimé en 2011 **[66].** Elles sont aérobies ou aéro-anaérobies facultatives, et tirent leur énergie par respiration ou fermentation.



Figure IUI.1 : Aspect des cellules bactériennes de la souche *Bacillus Circulans* sous microscope optique G×100.

b : Plumes

Les plumes utilisées dans ce travail sont celles qui recouvrent le corps des poulets et délimitent son contour. Elles sont de couleur blanche et issue d'un poulailler local (figure1).



Figure III.2 : Plumes de poulets

III.2.2. Produits chimiques et réactifs utilisés

Les produits utilisés pour la préparation des solutions et des tampons lors de la réalisation de ce travail sont fournit par :

- CALTIMED ;
- Riedel-de Haën ;
- SIGMA-ALDRICH ;
- Fluka ;
- CHEM-LAB CL ;
- VWR CHEMICALS.

a : Farine de plumes

Le processus de préparation de la farine de plumes passe par les étapes suivantes :

- nettoyage des plumes par élimination des saletés et lavages successifs à l'eau de robinet. La dernière étape de lavage se fait avec de l'eau distillée ;
- séchage des plumes par un séchoir (KRUPS) ;
- broyage des plumes séchées au moyen d'une moulinette de type Moulinex.

Ce processus conduit à l'obtention de plumes finement broyées, homogènes et insolubles appelée farine de plume

b: Milieu LB

La composition du milieu LB (Miller, 1972) utilisé pour la préculture est la suivante :

- Peptone : 10 g/L ;
- Extrait de levures : 5 g/L ;
- NaCl : 5 g/L.

Le pH du milieu est ajusté à 7. Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20 min.

C : Milieu gélose nutritive au lait

Le milieu gélose nutritive au lait (GNL) est composé de :

- Peptone : 5 g ;
- Extrait de levure : 3 g ;
- Agar : 15 g ;
- Eau distillée : 750 mL.

Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH à une valeur désirée. Le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 min. ensuite, 250 mL du lait écrémé est stérilisé à 114 °C pendant 15 min.

d : Milieu solide d'isolement de bactéries kératinolytiques (GNFP)

La composition du milieu à base de farine de plumes utilisé pour l'isolement de bactéries productrices de kératinases est la suivante :

- Farine de plumes : 5 g/L ;
- NaCl : 0,5 g/L ;
- $MgSO_4$ (7 H_2O) : 0,1 g/L;
- KH_2PO_4 : 0,7 g/L;

- K_2HPO_4 : 1,4 g/L;
- Agar : 30 g/L.

Le pH du milieu est ajusté à 11 puis est stérilisé à 120°C pendant 20 min.

e : Milieu initiale de dosage de l'activité protéolytique

Ce milieu est composé de :

- Source de carbone : 5g/L (caséine, glucose, saccharose, amidon, maltose, glycérol)
- Source d'azote : 2g/L (urée, peptone de soja, extrait de levure, chlorure d'ammonium, sulfate d'ammonium)
- Cacl2 : 2g/L
- K_2HPO_4 et KH_2PO_4 :0.5g/L

III.2.3.Tampons et Solutions :

- **Tampon A :** solution de Glycine (0.2M) :15g/L
- **Tampon B :** solution de Glycine-NaOH (0.2M) : 50mL de la solution A + Volume de la solution B jusqu'à pH =10
- **Tampon C :** Glycine-NaOH-Caséine : 100ml de glycine-NaOH +1g de caséine
- **Tampon D :** 100 mM de KCl +5 mM CaCl2 jusqu'à pH=12.5
- **Solution de TCA (20%)**

III.3. Les Méthodes

III.3.1-La réactivation de la souche de *Bacillus circulans* DZ100

La réactivation de la souche de *Bacillus circulans* DZ100 ce fait dans un milieu LB solide coulé dans les boites de pétri stériles et incubé dans l'étuve pendant 48 h à une température de 37 C°.

III.3.2-Méthode d'incubation

Cette méthode consiste à étaler la souche sur les milieux GNL et GNFP coulés en boites de Pétri stériles puis incuber 48 h à une température de 37 C° dans l'étuve.

En effet, l'étalement de la souche sur milieu GNL c'est un test semi-qualitatif qui repose sur le fait que les protéases, secrétées par les souches protéolytiques, vont diffuser dans le milieu gélosé environnant et vont aussi hydrolyser les protéines du lait (caséines).

En plus, Le milieu GNFP est utilisé pour l'isolement et le criblage des clones producteurs des kératinases. La technique de diffusion dans l'agar est mise en œuvre pour la détection de l'activité kératinolytique.

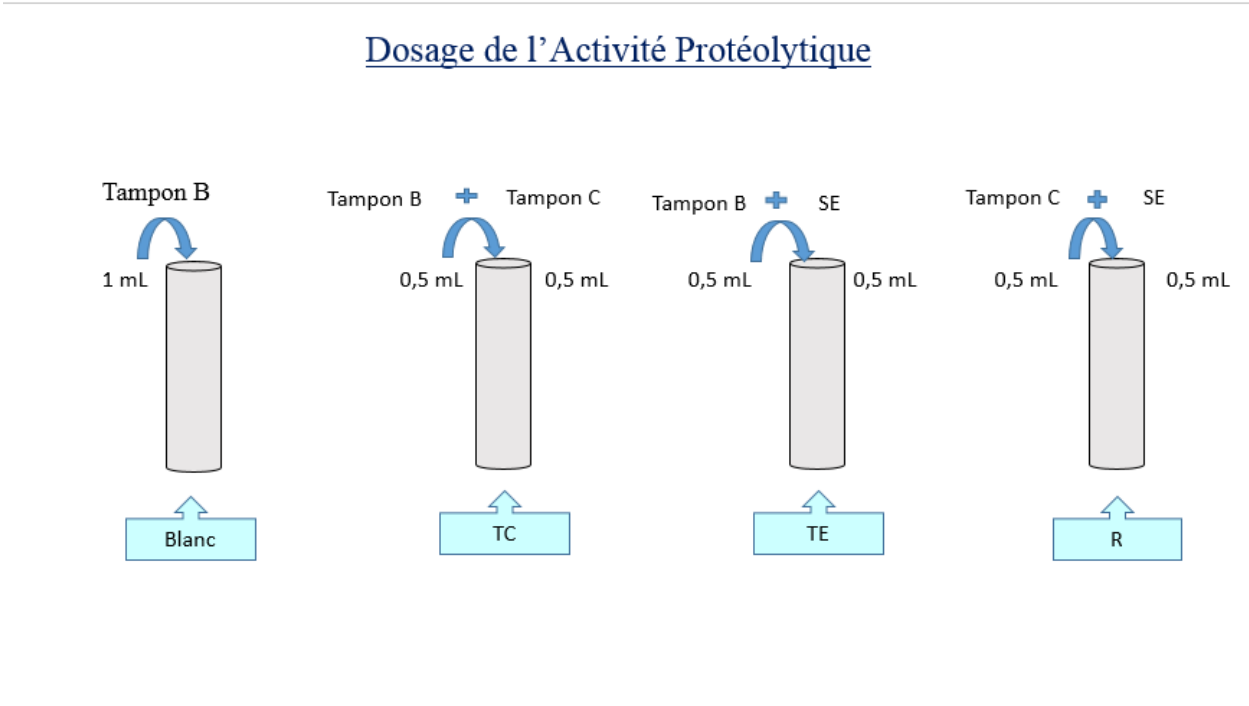
III.3.3. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique particulièrement l'activité caséinolytique, est mesurée dans le surnageant, en déterminant la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloro-acétique (TCA) à la concentration finale de 200g/L **[68].**

L'activité protéolytique est déterminée selon le protocole suivant :

- Mélanger 0,5 mL d'une solution de caséine (10 g/L) dans un tampon désiré avec 0,5 mL de la solution enzymatique préalablement diluée ;
- Incuber la réaction enzymatique à une température appropriée pendant 15 min ;
- Arrêter la réaction par addition de 0,5 mL de TCA à 200 g/L (le TCA précipite la caséine non hydrolysée) ;
- Incuber à température ambiante pendant 15 min ;
- Centrifuger le milieu réactionnel à 15000 rpm pendant 15 min ;
- Mesurer l'absorbance à 280 nm (correspond au maximum d'absorbance des aa AR).

Protocole de dosage :



- **Blanc** : 1mL de tampon B;
- **TC** : 0.5 mL de tampon B + 0.5 mL de tampon C ;
- **TE** : 0.5 mL de tampon B + 0.5 mL de la solution enzymatique ;
- **R** : 0.5 mL de tampon C + 0.5mL de la solution enzymatique.



Figure III.3 : Les tubes au cours de la réaction

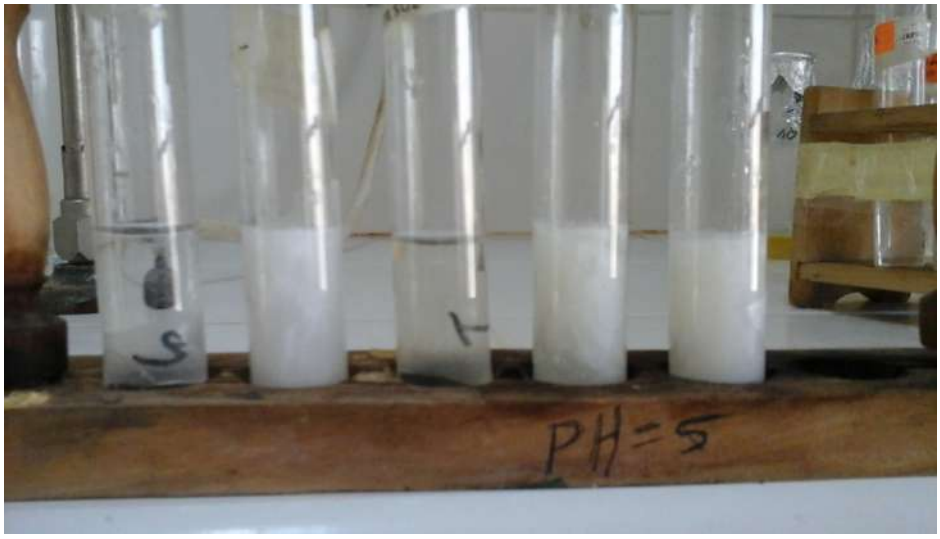


Figure III.4 : Les tubes après l'arrêt de la réaction (rajout de TCA)

Une unité (1 U) d'activité caséinolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1µg de tyrosine/ml/min dans ces conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage, de 0 à 100 µg/mL, de tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions à partir de laquelle nous avons déduit que 1 µg/ml de tyrosine correspond à une $DO_{280\ nm}$ de 0,055

$$\textbf{Activité(U/mL)} = \frac{\textbf{DO} \times \textbf{D} \times \textbf{d}}{\textbf{t} \times \textbf{0,0055}}$$

d : dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel.
D : dilution de l'enzyme.
t : temps de la réaction en minutes.
DO : densité optique

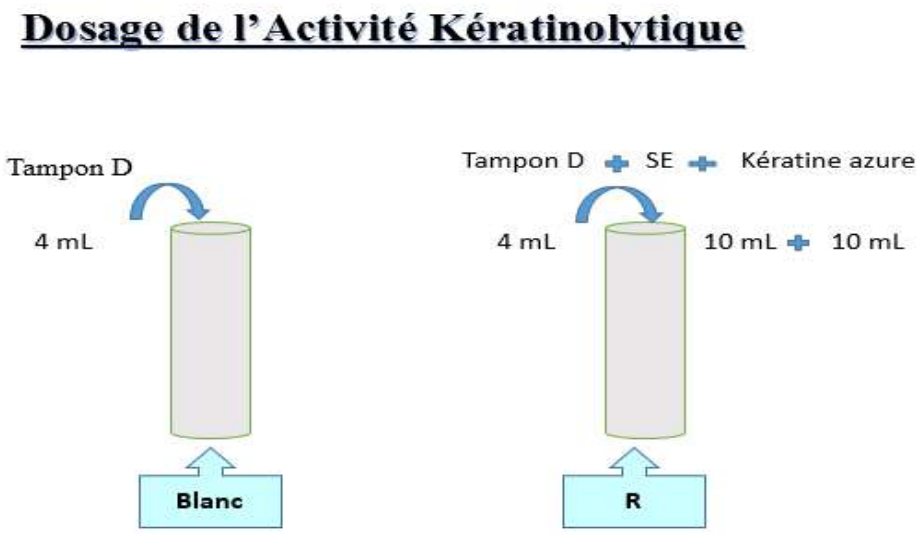
III.3.4-Dosage de l'activité kératinolytique

L'activité kératinolytique a été mesurée dans le surnageant de culture obtenue après centrifugation de 20 min à 5000 rpm en utilisant la kératine-azure comme substrat. L'activité kératinolytique est estimée selon le protocole modifié de **[69]** qui consiste à :

- Mélanger 1 ml du surnageant, 1 mL du tampon KCl-NaOH (100 mM) additionnée de 5 mM $CaCl_2$ à pH 12,5 et 1 mL de kératine-azure finement découpée en raison de 10 g/L ;
- Incuber 20 min à une température 85 C° appropriée sous une agitation de 250 rpm ;
- Arrêter la réaction par incubation dans la glace pendant 5 min ;
- Centrifuger le milieu réactionnel à 5000 rpm pendant 20 min ;
- Mesurer l'absorbance à 440 nm.

Une unité (1 U) d'activité kératinolytique est définie comme étant l'augmentation de la DO_{440} de 0,1.

Protocole de dosage :



Blanc : 4 mL de tampon D

R1 : 4 mL de tampon D +10 mL Solution enzymatique +10 mL kératine azure

L'activité kératinolytique (U/mL) est déduite à partir de l'équation ci-dessous :

Activity (U/mL/min) = $\frac{DO_{440} \times V_{ET} \times d}{t \times V_E \times 0.0022}$

V_{ET} : VET : Correspond au volume total de l'enzyme.
V_E : Correspond au volume de l'enzyme.
d: dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel.
t:. temps de la réaction en minutes.

III.3.5 : Optimisation de la production de la kératinase par la souche *BACILLUS CIRCULANS*

a. Effet de différentes sources de carbone sur la production de kératinase

La production de kératinase par la souche de *Bacillus circulans* DZ100 a été testée sur le milieu initiale **[70]** contenant : 0,5 g/L KH_2PO_4, 0.5 g/L K_2HPO_4, 2g/L $CaCl_2$ et 2g/L source d'azote additionné de différentes sources de carbones : caséine, amidon, maltose, saccharose et glucose (5 g/L). Le pH du milieu est ajusté à 7.

b. Effet de concentrations croissantes de caséine sur la production de kératinase

La culture de *Bacillus circulans* DZ100 a été réalisée sur le milieu initial additionné de différentes concentrations de caséine variant de 5 à 30 g/L.

c. Effet de différentes sources d'azote sur la production de kératinase

La production de kératinase par la souche *Bacillus circulans* DZ100 a été étudiée par culture sur le milieu initiale contenant: 0,5 g/L KH_2PO_4, 0.5 g/L K_2HPO_4, 2g/L $CaCl_2$ et 5g/L source de carbone additionné de différentes source d'azote : extrait de levures ; chlorure d'ammonium ; peptone de soja ; urée, sulfate d'ammonium (2 g/L).

d. Effet de concentrations croissantes de peptone de soja sur la production de kératinase

La culture de *Bacillus circulans* DZ100 a été réalisée sur le milieu initial additionné de différentes concentrations de peptone allant de 2.5 jusqu'à 15 g/L.

e. Effet des composantes du milieu sur la production de kératinase

L'effet de chaque composante du milieu (7,5 g/L farine de plume ; 0,5 g/L NaCl ; 0,7 g/L KH_2PO_4 ; 1,4 g/L K_2HPO_4 ; 0,1 g/L $MgSO_4$ (7 H_2O) et 2 g/L extrait de levures) sur la production de kératinase a été étudié par son élimination du milieu de culture.

RESULTATS & DISCUSSIONS

IV : Résultats & Discussions

IV.1. Introduction

Le défi consiste, actuellement, à découvrir des enzymes qui répondent convenablement aux contraintes techniques et économiques des procédés de biocatalyse industrielle moderne à s'avoir des enzymes plus stables dans des conditions extrêmes (pH alcalins, températures élevées, pression, présence d'agents dénaturants, de détergents, solvants organiques, etc.), et qui soient les plus actives, stables et sélectives possible. La diversité microbiologique est en fait la majeure ressource pour les processus de production biotechnologiques. Ceci est dû à la diversité physico-chimique des habitats des microorganismes. Donc, la recherche de microorganismes producteurs d'enzymes, pouvant présenter des caractéristiques innovantes et nouvelles, est de plus en plus importante.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence le pouvoir protéolytique d'une souche bactérienne *Bacillus circulans* DZ100 à produire des protéases alcaline et optimisés les conditions de productions de cette dernière. Par la suite, on a déterminé la nature de la protéase secrété par la souche de *Bacillus circulans* DZ100.

IV.2. Réactivation de la souche bactérienne « *Bacillus circulans* DZ100 »

L'échantillon de la souche de *Bacillus circulans* DZ100 conservé à -20 °C a été étalés sur milieu LB et incubé à 37 °C pendant 48 h afin de s'assure que la souche conservé est toujours active.



Figure. IV.1: Mise en évidence l'activation de la souche de ***Bacillus circulans DZ100*** sur LB.

IV.3. Vérification du pouvoir protéolytique de la souche de *Bacillus circulans DZ100*

Après avoir vérifié que la souche de *Bacillus circulans* DZ100 conservé est active, on est passé à la mise en évidence de ces propriétés protéolytique. Ceci par étalement sur milieu GNL (milieu utilisé pour déceler les activités protéolytiques extracellulaires) et incubation pendant 36 à 48 h à 37°C. Ce test qualitatif et semi-quantitatif est visualisé par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie et se traduit par la diffusion des protéases secrétées dans la gélose environnante tout en hydrolysant les protéines du lait (notamment les caséines).



Figure IV.2 : Mise en évidence d'activité protéolytique de la souche de ***Bacillus circulans DZ100*** sur GNL.

IV.4. Optimisation des conditions de production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100

La production des protéases par les souches protéolytiques est influencée d'une part, par les conditions physiques à savoir la température, le pH et l'aération et d'autre part, par la composition chimique des milieux de culture **[71, 72].** En fait, un milieu de culture doit contenir une source de carbone, une source d'azote et des sels minéraux exigés pour la croissance et pour l'induction de l'enzyme **[73]**.

Il doit également contenir des substances inductrices de la production d'enzymes et des facteurs de croissance, susceptibles d'intervenir dans le métabolisme des substrats utilisés **[74, 75].**

Au cours de cette partie, nous nous sommes proposé d'évaluer la production de protéase(s) par la souche de *Bacillus circulans* DZ100 Au fait nous avons commencé par un milieu initial (non optimisé) composé de : 5 g/L source de carbone ; 2 g/L source d'azote ; 2 g/L $CaCl_2$; 0.5 g/L K_2HPO_4 et 0.5 g/L KH_2PO_4 à pH 7,4. A partir de ce milieu nous avons alors cherché à optimiser les différents composants.

IV.4.1. Effet de différentes sources de carbone sur la production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100

Afin d'obtenir une production maximale de protéases, il est également important de fournir aux micro-organismes une source de carbone adéquate. La production de protéases par la souche *Bacillus circulans* DZ100 a été testée sur le milieu de base additionné de différentes sources de carbone : caséine, glucose, saccharose ; maltose, glycérol ; et amidon de 5 g/L. Le niveau de production de protéases, de la croissance de la souche *Bacillus circulans* DZ100 ainsi que le pH final de la culture ont été déterminés et l'ensemble des résultats sont consignés dans le **(Tableau IV.1).**

Tableau IV.1: Effet de différentes sources de carbone sur la production de protéase(s) par la souche ***Bacillus circulans DZ100***

Source de carbone (5 g/L)	**Témoin sans addition**	**Caséine**	**Glucose**	**Saccharose**	**amidon**	**maltose**	**glycérol**
Activité (U/mL)	280	**1505.45**	814.54	869.09	1000	861.81	318
DO (280 nm)	0.077	**0.414**	0.224	0.239	0.250	0.237	0.0795

L'analyse des résultats présentés sur le **tableau IV.1,** met en évidence une meilleure production de protéase issue de la souche de *Bacillus circulans* DZ100 (environ 1500 U/mL). En effet, une croissance significative (absorbance à 280 nm de 0.4) est observée sur milieu à base de caséine. Par conséquent, la caséine constitue la meilleure source de carbone et d'énergie la plus adéquate pour une telle production. Ce qui nous amène à supposer l'existence de substances bioactives dans la caséine favorisant la production de protéases par la souche de ***Bacillus circulans DZ100.***

Par comparaison, la gélatine constitue la meilleure source de carbone et d'énergie la plus adéquate pour une telle production et croissance de ***Aeribacillus pallidus* VP3** avec une activité de 1400 U/mL

IV.4.2. Effet de la concentration de la caséine sur la production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100

Etant donné, que la meilleure production est obtenue sur le milieu initial additionné de la caséine, nous étions amenés à optimiser la concentration en caséine (de 0 à30 g/L) afin de déterminer la concentration optimale pour la production de protéase(s) sur milieu contenant : 2 g/L extrait de levure ; 2 g/L $CaCl_2$; 0.5 g/L K_2HPO_4 et 0.5 g/L KH_2PO_4 à pH 7,4 (**Figure IV.3**).

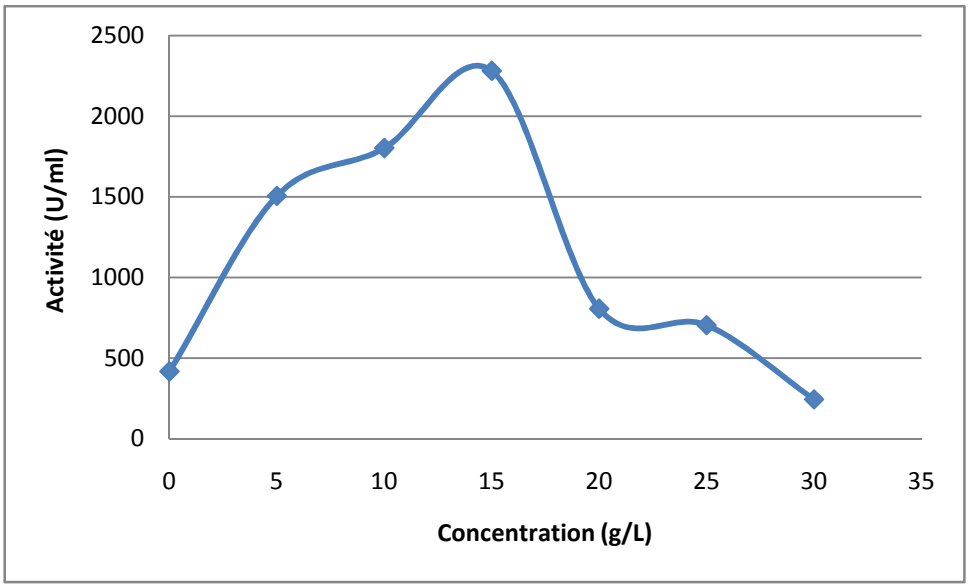


Figure IV.3: Optimisation de la concentration de la caséine sur la production de protéase(s) par la souche ***Bacillus circulans* DZ100**.

Les résultats présentés sur ce graphe montrent que la croissance bactérienne et la production de protéases augmentent avec la concentration en caséine jusqu'à 15 g/L. En effet, l'augmentation de la production est significative pour des concentrations supérieures à 5 g/L et atteint un maximum de 2280 U/mL à 15 g/L, au-delà duquel on assiste à une diminution. Et même résultats pour *Aeribacillus pallidus* VP3 avec une activité de 2756 U/mL

En tenant compte du rendement ainsi que du niveau de production de protéases par *Bacillus circulans* DZ100 une concentration en caséine de 15 g/L a été retenue pour la suite de notre travail.

Tableau IV. 2: Optimisation du rendement de la caséine pour la production de protéase par la souche ***Bacillus circulans*** **DZ100**.

Concentration de caséine (g/L)	**0**	**5**	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**
Activité (U/mL)	280	1505.45	1801.81	**2280**	805.45	704	244
Rendement (%)	2.2	66	79	**100**	35.3	30.8	10.7

IV.4.3. Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100

L'effet de différentes sources d'azote organique (extrait de levure, peptone de soja et urée) et inorganique [$(NH4)_3FeSO_3$ et $(NH4)_2SO_4$)] sur la croissance et la production de la protéase par la souche *Bacillus circulans* DZ100 a été étudié, à une concentration de 2 g/L, en comparaison à une culture témoin sans source d'azote. (**Tableau IV.3**).

Tableau IV.3 : Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéase(s) par la souche ***Bacillus circulans*** **DZ100**.

Source d'azote (1g/L)	Témoin sans ajout	Urée	Chlorure d'ammonium	Sulfate d'ammonium	**peptone de Soja**	Extrait de levure
Activité (U/mL)	180	327.27	152.72	71.45	**509.09**	489.27
D.O (280nm)	0.049	0.090	0.042	0.0205	**0.140**	0.134

L'analyse des résultats présentés sur le tableau III.3 montre que la meilleure production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100 (509.09 U/mL) est obtenue lorsque le peptone est utilisée comme source d'azote. Une production significative de 489.27 U/mL et de 327.27 U/mL est obtenue respectivement avec l'extrait de levure et l'urée. Cependant, cette production est diminuée par l'ajout de chlorure d'ammonium et elle est annulée en présence de sulfate d'ammonium. A la lumière de ces résultats, on constate que le peptone de soja s'avère être plus adéquate pour la production de protéases produites par *Bacillus circulans* DZ100. En fait, le peptone de soja est une source d'acides aminés et de facteurs de croissance pour la bactérie. Elles contiennent aussi des vitamines et des cofacteurs qui sont indispensables aussi bien pour le développement de la bactérie que pour la synthèse de métabolites. Par conséquent, on constate que la farine de soja s'avère être plus adéquate pour la production de protéases produites par *Aeribacillus pallidus* VP3 (2920U/mL)

Ainsi, le peptone de soja sera utilisée comme source d'azote dans la suite de ce travail.

IV.4.4. Effet de la concentration de peptone de soja sur la production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100

La concentration de peptone de soja comme source d'azote a été optimisée sur milieu initial à des concentrations allant de 0 à 15 g/L (**Figure IV.4**).

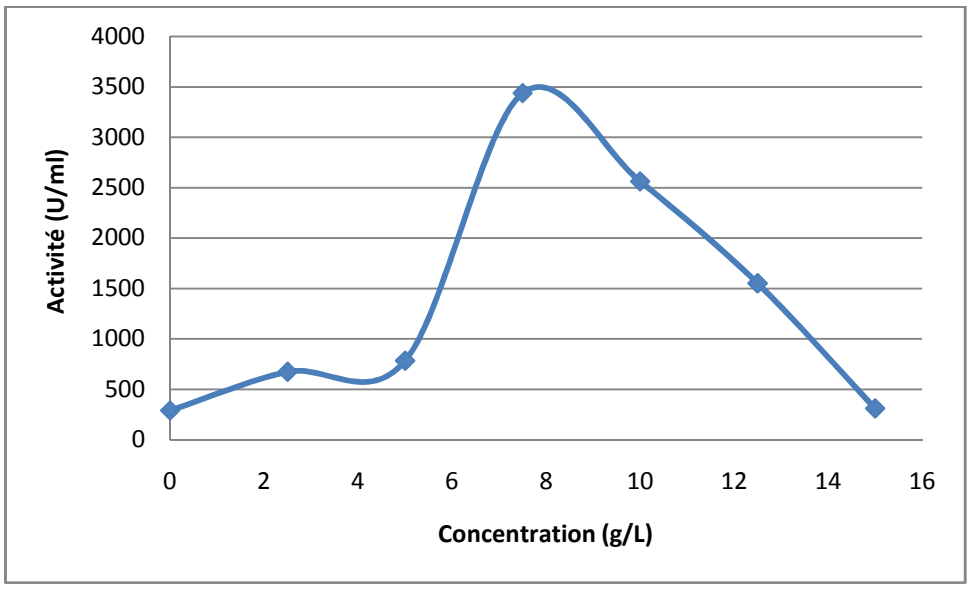


Figure IV.4 : Optimisation de la concentration de peptone de soja sur la production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

L'analyse des résultats montre qu'il ya une meilleure production de protéase(s) avec la concentration en peptone de soja et atteint 3436 U/mL pour une concentration de 7.5 g/L. Ces résultats montrent également une augmentation de la biomasse (DO à 280 nm = 0.945) avec la concentration en peptone de soja jusqu'à 7.5 g/L.

Par comparaison, les résultats obtenus pour la production de *Aeribacillus pallidus* VP3 montre que la meilleure production de protéase(s) avec la concentration en farine de soja et atteint 3000 U/mL pour une concentration de 2 g/L.

En tenant compte du rendement ainsi que du niveau de production de protéases par *Bacillus circulans* DZ100 une concentration en Peptone de soja de 7.5g/L a été retenue pour la suite de notre travail.

Tableau IV.4: Optimisation du rendement de peptone de soja pour la production de protéase par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

Concentration de peptone de soja(g/L)	**0**	**2.5**	**5**	**7.5**	**10**	**12.5**	**15**
Activité (U/mL)	280	672.7	781.8	**3436**	2561	1550	309
Rendement (%)	2.2	19.5	22.7	**100**	74.5	45.1	8.9

IV.4.5. Effet de différentes concentrations de différentes sources d'oligo-éléments sur la production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans* DZ100

Effet de différents source d'oligo-éléments : MgSO_4 ,7(H2O); CaCl_2 ; K_2HPO_4 kH_2PO_4 ; NaCl sur la croissance et la production de la protéase par la souche *Bacillus circulans* DZ100 a été étudié, à différentes concentration de chaque éléments.

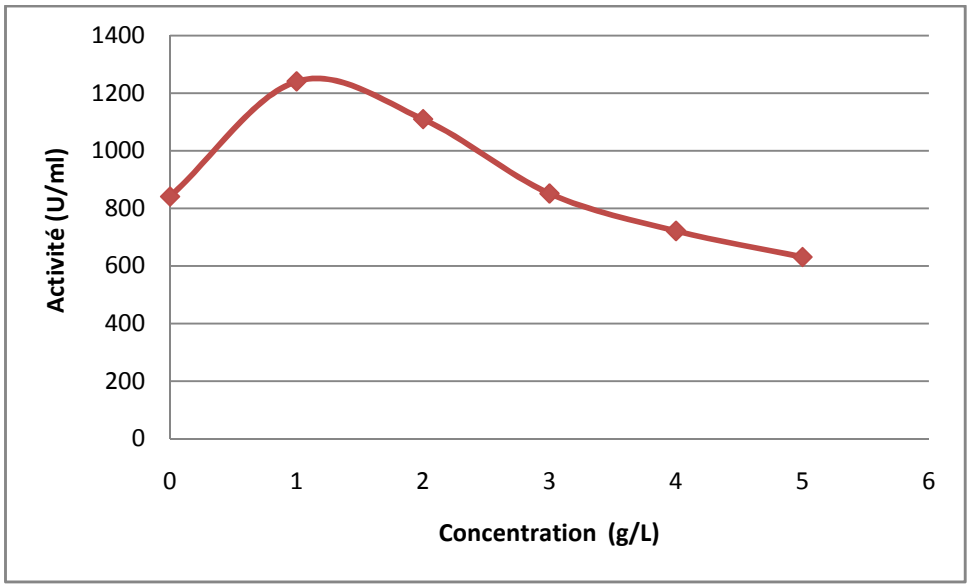


Figure IV.5 : Optimisation de la concentration de Sulfate de Magnésium sur la production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100

L'analyse des résultats montre qu'il ya une meilleure production de protéase(s) avec la concentration en MgSO4 et atteint 1240 U/mL pour une concentration de 1 g/L. Ces résultats montrent également une augmentation de la biomasse (DO à 280 nm = 0.341) . Ainsi que un meilleure rendement.

Tableau IV.5 : Optimisation du rendement de Sulfate de Magnésium sur la production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100

Concentration de MgSO4 (g/L)	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Activité (U/mL)	840	**1240**	1108.98	850.7	720.8	630.3
Rendement $(10^3 U/g)$	64.4	**100**	89.4	68.6	58.1	50.8

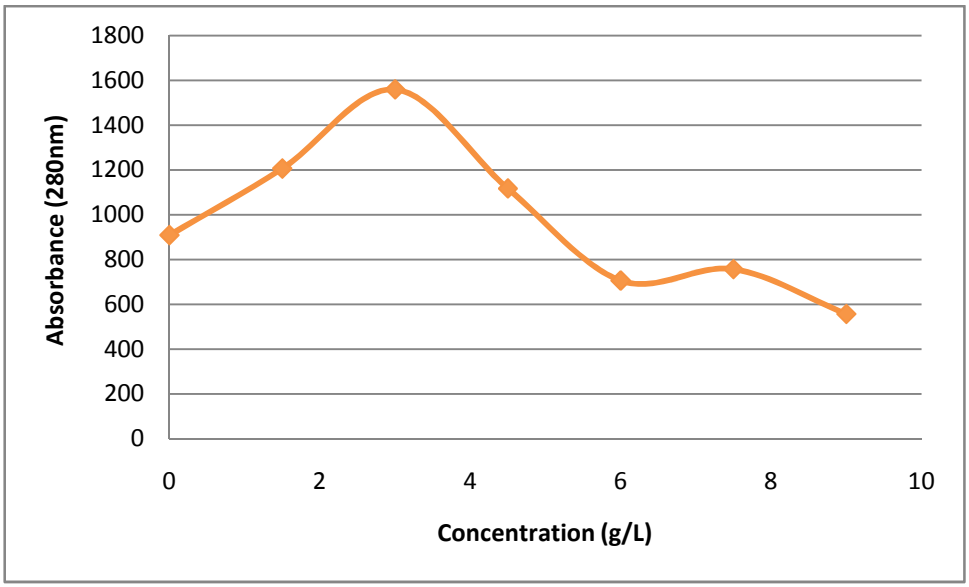


Figure IV.6 : Optimisation de la concentration de Chlorure de Sodium sur la production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

Les résultats présentés sur cette figure montrent que la croissance bactérienne et la production de protéases augmentent avec la concentration en NaCl jusqu'à 3g/l est atteint 1585 U/ml. Ces résultats montrent également une augmentation de la biomasse (DO à 280 nm=0.436). Ainsi que le rendement dans le tableau ci dessous:

Tableau IV.6 : Optimisation du rendement de Chlorure de Sodium sur la production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100

Concentration de NaCl (g/L)	**0**	**1.5**	**3**	**4.5**	**6**	**7.5**	**9**
Activité (U/mL)	908.03	1205.4	**1585.54**	1116.37	705.2	756.36	556.36
Rendement (%)	57.2	76.02	**100**	70.4	44.47	47.7	35.09

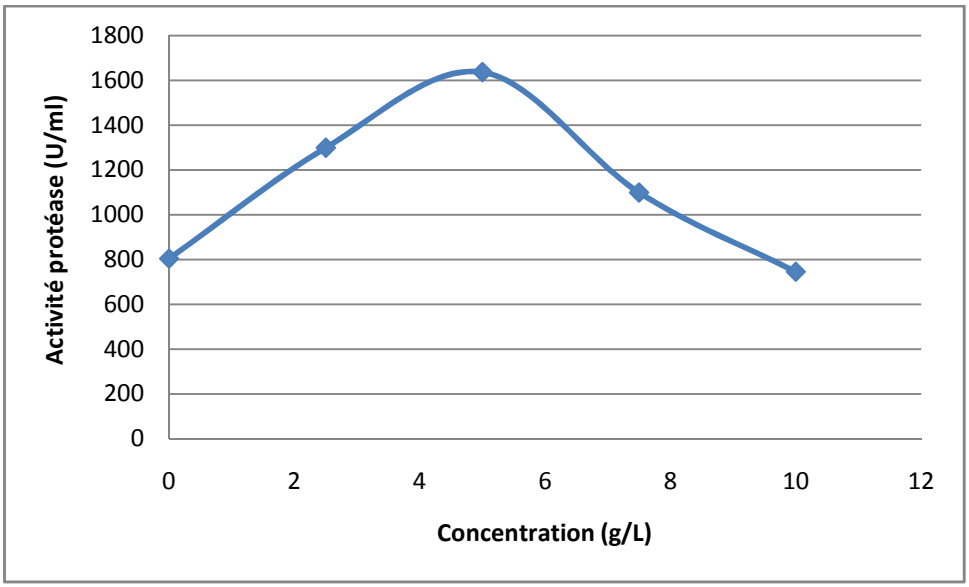


Figure IV.7 : Optimisation de la concentration de Chlorure de Calcium sur la production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

Cette figure montre que la meilleure production de protéase avec une concentration en **CaCl_2** est atteint 1636.3 U/ml et une absorbance augmente jusqu'à 0.450 à une langueur d'onde de 280 nm. Et voici les rendements correspondant sur le tableau suivant:

Tableau IV.7 : Optimisation du rendement de Chlorure de Calcium sur la production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100

Concentration de CaCl_2 (g/L)	**0**	**2.5**	**5**	**7.5**	**10**
Activité (U/mL)	804	1298.8	**1636.3**	1098.7	745.4
Rendement (%)	49.1	79.3	**100**	67.1	45.5

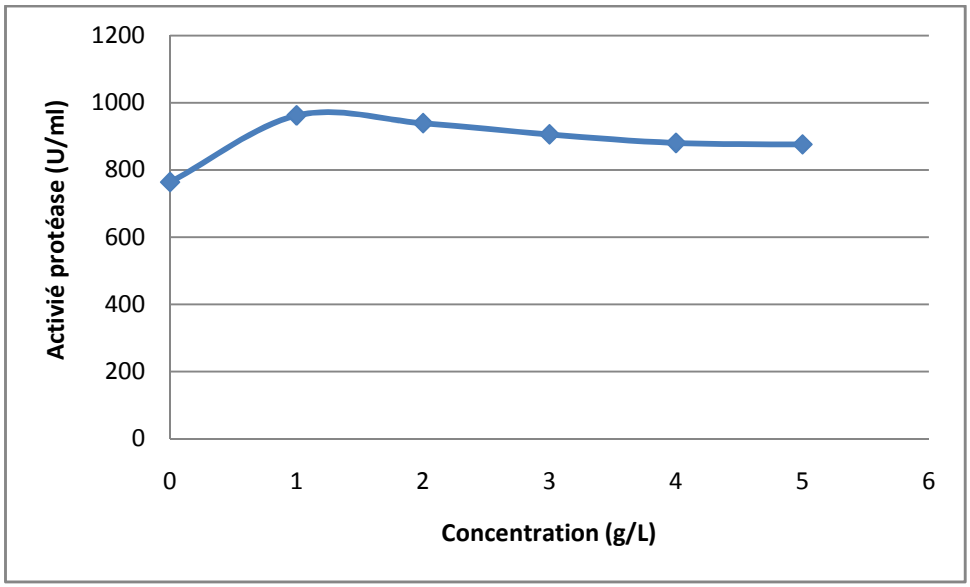


Figure IV.8 : Optimisation de la concentration de KH_2PO_4 sur la production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100

L'analyse des résultats montre qu'il ya une meilleure production de protéase(s) avec la concentration en $\boldsymbol{KH_2PO_4}$ et atteint 961.81 U/mL pour une concentration de 1g/L. Ces résultats montrent également une augmentation de la biomasse (DO à 280 nm = 0.265).

Tableau IV.8 : Optimisation du rendement de $\boldsymbol{KH_2PO_4}$ sur la production de protéase(s) par la souche *Bacillus circulans* DZ100

Concentration de (g/L) KH_2PO_4	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Activité (U/mL)	763.63	**961.81**	938.18	905.45	880	875.54
Rendement (%)	79.3	**100**	97.5	94.1	91.4	91

A la lumière de cette optimisation, un nouveau milieu de composition (en g/L) : 15 caséine ; 7.5 peptone de soja; 3 NaCl; 1 K_2HPO_4 ; 1 KH_2PO_4 ; 5 $CaCl_2$; 1 $MgSO_4$ .7H2O; et 1% (v/v) d'oligoéléments à pH 7,4 a été retenu pour la suite du travail puisqu'il permet une meilleure croissance (DO = 0.640) et une meilleure production de protéase(s) (2327 U/mL).

IV.5. Mise an évidence du pouvoir kératinolytique de la protéase sécrété par la souche de Bacillus Circulans

Dans le but de chercher de nouvelles activités kératinolytique, nous avons lancés un programme d'isolement de nouvelles souches productrices d'activités kératinolytiques. La sélection de cette souche kératinolytique a été réalisée sur gélose nutritive à base de farine de plumes (GNFP).

IV.5.1. Test sur GNFP

On a étalé l'échantillon sur le milieu GNFP et incubé à température 37°C pendant 36 h. Ce test semi-quantitatif qui repose sur le fait que les kératinases, secrétées par la souche de *Bacillus Circulans* DZ100, diffusent dans le milieu gélosé a base de farine de plumes environnant et hydrolysent ainsi les kératines. L'activité enzymatique se traduit par l'apparition d'halo transparent autour des colonies produisant des kératinases.



Figure IV.9 : Mise en évidence d'activité kératinolytique de la souche de *Bacillus circulans* DZ100 sur GNFP.

IV.5.2. Dosage de l'activité kératinolytique

Le surnageant de culture de 250 mL de la souche *Bacillus circulans* DZ100 après 48 h de croissance sur le milieu optimisé constitue l'extrait enzymatique brut. Ce surnageant présente une activité kératinolytique de 1180 (U/mL).

IV.6. Conclusion

Après la réactivation de la souche *Bacillus circulans* DZ100 et les mises en évidences du pouvoirs protéolytique et kératinolytique, on a optimisées le milieu de production à partir d'un milieu initial qui contient une source de carbone, une source d'azote et des oligo-éléments.

Le niveau de production sur le milieu optimisé est utilisé la caséine comme source de carbone et le peptone de soja comme source d'azote et 1% (v/v) d'oligoéléments à pH 7,4 a été retenu pour la suite du travail puisqu'il permet une meilleure croissance (DO = 0.640) et une meilleure production de protéase(s) (2327 U/mL), puis calculer l'activité kératinolytique qui est égale à 1180 U/mL.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

La grande quantité de plumes de volailles produite comme déchet constitue une source de pollution pour l'environnement. Ce type de déchet peut être valorisé et utilisé dans diverses applications (alimentation animale, usage scientifique et microbiologique, production de peptides à activités biologiques).

Les protéases microbiennes, en particulier celles produites par le genre *Bacillus* dominent le marché mondial des enzymes. Ces biocatalyseurs sont d'une grande importance économique, en considérant les applications industrielles multiples dans lesquelles elles sont impliquées. Les protéases impliquées dans la détergence et dans la synthèse peptidique forment le groupe d'enzyme le plus recherché grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques toxiques et la stabilité vis-à-vis divers solvants organiques. L'obtention de nouvelles protéases pourrait soit conduire à de nouvelles applications biotechnologiques, soit à une amélioration des performances des enzymes existantes.

L'application éventuelle de ces protéases intéressantes au niveau industrielle, passe par la mise au point d'un procédé de production économique et reproductible. Ceci sera possible par la construction de souches hyperproductrices de ces enzymes et par l'optimisation des conditions de production à l'échelle laboratoire puis en fermenteur. En plus, la pénurie mondiale en protéases capables d'assurer la synthèse peptidique à susciter le développement de la recherche des nouveaux protéases tolérantes aux solvants organiques capables d'assurer la synthèse, tout en assurant de bons rendements et en substituant les agents chimiques toxiques. Dans cet objectif, la production de la protéase alcaline extracellulaire par l'espèce bactérienne *Bacillus circulans* DZ100 isolée à partir d'effluents d'abattoir a été optimisée en utilisant plusieurs sources de carbone et d'azote de façon à obtenir la meilleure activité.

La première partie du travail a été porté sur la réactivation et la mise en évidence du pouvoir protéolytique de la souche de *Bacillus circulans* DZ100.

La deuxième partie a été consacrée à l'optimisation des conditions de production de protéase sécrétée par la souche de *Bacillus circulans DZ100*. Le niveau de production sur le milieu initial (non optimisé) composé de : 5 g/L source de carbone ; 2 g/L source d'azote ; 2 g/L CaCl2 ; 0.5 g/L K2HPO4 et 0.5 g/L KH2PO4 à pH 7,4 est de (869.09 U/mL). A partir de ce milieu nous avons alors cherché à optimiser les différents composants.

La troisième partie consiste à l'obtention d'une production maximale de protéases, il est également important de fournir aux micro-organismes une source de carbone adéquate et sa concentration optimale, ainsi que la meilleure source d'azote et sa concentration optimale, aussi la meilleure concentration des déférents oligo-éléments.

Le niveau de production sur le milieu optimisé à base de caséine comme source de carbone, peptone de soja comme source d'azote et en présence de 1g/L de K2HPO4 ;5g/L CaCl2 ; 1g/L MgSO4 .7H2Oet 1% (v/v) d'oligoéléments à pH 7,4 atteint une activité caséinolytique d'environ 2327 U/mL. Ce milieu optimisé a été retenu pour la suite d notre travail puisqu'il permet une meilleure production de protéase.

La dernière partie portée sur la vérification du pouvoir kératinolytique sur la souche de *Bacillus circulans DZ100* dans le milieu de GNFP, puis l'estimation de cette activité kératinolytique qui correspond à 1180 U/mL.

En perspectives, , la préparation protéolytique de la souche *Bacillus circulans DZ100* semble être intéressante et pourrait être utilisée avec succès dans des applications biotechnologiques, ce travail doit être développé afin de mieux connaitre les propriétés physicochimiques, le mode d'action et les applications dans d'autres domaines et secteurs technologiques de ces protéases.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **[1]-Suntornsuk W and Suntornsuk L. (2003).** Feather degradation by Bacillus sp FK 46 in submerged culture, Bioresource Technology 86: 239-243.

- **[2]-Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18: 6531–6535.

- **[3]Santos RMDB, Firmino AAP, deSa CM, Felix CR. (1996)** Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Curr Microbiol. ;33:364–370.

- **[4]-Friedrich, J., and S. Kern**. **(2003)**. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. J. Mol. Catal. B Enzymol. 21**:**35-37.

- **[5]- Gupta, R., Q.K. Beg, and P. Lorenz**. **(2002)** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol.,. 59(1): p. 15-32.

- **[6]- Gupta, R., et al.**, **(2002)** An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Appl Microbiol Biotechnol,. 60(4): p. 381-95.

- **[7]- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998)** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 597-635.

- **[8]- Walsh G. (2002).** Proteins, Biochemistry and Biotechnology. West Susex, England: John Wiley and Sons Ltd.; pp 420**.**

- **[9]- Storey RD & Wagner FW (1986)** Plant proteases: a need for uniformity. Phytochemistry 25: 2701-2709**.**

- **[10]- Joubert P., Lajoie-Kadoch S., Labonte I., Gounni A.S., Maghni K., Wellemans V., Chakir J., Laviolette M., Hamid Q., and Lamkhioued B.(2005)**. CCR3 expression and function in asthmatic airway smooth muscle cells. J Immunol 175:2702-2708.

- **[11]- Kraut J. (1977).** Serine Proteases: Structure and mechanism of catalysis. Ann. Rev. Biochem. 46: 331-358.

- **[12]- Rozs M., Manczinger L., Vagvolgyi C. et Kevei F. (2001)** Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 205 : 221-224.

- **[13]- Storer C., et Ménard R. (1994).** Catalytic Mechanism in Papain Family of Cystein Peptidases. Methods in Enzymology 224: 486-500.

- **[14]- FitzGerald D J and M Ogata, V K Chaudhary, I Pastan. (1990)** generation of a 37,000-Da toxin fragment that is translocated to the cytosol. Processing of Pseudomonas exotoxin by a cellular protease results in the J. Biol. Chem**.,** 265:20678-20685.

- **[15]- Chitpinityol S., Goode D., Crabbe M.J. (1998)** Studies on the binding of alpha-crystallin to recombinant prochymosins and chymosin. *Mol Vis*, 4 1.

- **[16]- Kumar, A.G., et al., (2008)** Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes sp.* utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. Bioresour Technol,. **99**(7): p. 2364-72.

- **[17]- Nakahama, K., Yoshimura, K., Marumoto, R., Kikuchi, M., Lee, I. S., Hase, T., and Matsubara, H. (1986)** Nucleic Acids Res. 14, 5843-5855.

- **[18]- James A. Brannigan, Guy Dodson, Helen J. Duggleby, Peter C. E. Moody, Janet L. Smith, Diana R. Tomchick et Alexey G. Murzin,** « A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation », Nature, vol. 378, no 6555, **(23 novembre 1995),** p. 416-419.

- **[19]- Hua Cheng et Nick V. Grishin**, « DOM-fold: A structure with crossing loops found in DmpA, ornithine acetyltransferase, and molybdenum cofactor-binding domain », Protein Science, vol. 14, no 7**, (juillet 2005),** p. 1902-1910.

- **[20]- Guy Dodson et Alexander Wlodawer**, « Catalytic triads and their relatives », Trends in Biochemical Sciences, vol. 23, no 9**, (septembre 1998)**, p. 347-352.

- **[21]- Özlem Doğan Ekici, Mark Paetzel et Ross E. Dalbey,** « Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration », Protein Science, vol. 17, no 12**, (décembre 2008)**, p. 2023-2037.

- **[22]- Taussig SJ, Batkin S. Bromelain**, **(1988)** the enzyme complex of pineapple (Ananas comosus) and its clinical application: an update. Journal of Ethnopharmacology.**;**22(2):191–203.

- **[23]- Baeyens-Volant D., Matagne A., El Mahyaoui R., Wattiez R., Azarkan M. A** novel form of ficin from Ficus carica latex: Purification and characterization. *Phytochemistry*, 117 **(2015)** 154-167**.**

- **[24]- Williams DC, Whitaker JR.** Multiple molecular forms of Ficus glabrata Ficin. Their separation and relative physical, chemical, and enzymatic properties. Plant Physiol**. (1969)**;44:1574–1583**.**

- **[25]- Zare, H., et al.,** Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica cv. Sabz*) latex. Phytochemistry, **2013**. 87: p. 16-22.

- **[26]- Azarkan M., Matagne A., Wattiez R., Bolle L., Vandenameele J., Baeyens-Volant D.** Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purification and characterization of five fully active ficin (iso)forms from Ficus carica latex. *Phytochemistry*, 72 **(2011)** 1718-1731**.**

- **[27]- Jacobs M., Eliasson M., Uhlen M., Flock J.I.** Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic Acids Res*, 13 **(1985)** 8913-8926**.**

- **[28]- J. A. Wells et al. (1983)** in Nucleic Acids Research, Volume 11, S. 7911-7925.

- **[29]- Nielsen, H., et al.,** "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites*"*. Protein Eng, **1997.** 10(1): p. 1-6**.**

- **[30]- Dyrlov Bendtsen, J., et al**., "*Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3."0.* Journal of Molecular Biology, **2004.** 340(4): p. 783-795.

- **[31]- Siezen, R.J. and Leunissen, J.A**. "*Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases"*. Protein Sci, **1997.** 6(3): p. 501-23**.**

- **[32]- A L Lehninger, D L Nelson and M M** Cox. pp 1013. Principles of Biochemistry Second Edition Worth, New York**. 1993.**
  £30 ISBN 0-87901-500-4.

- **[33]- Manczinger, L., Rozs, M., Vágvölgyi, C., & Kevei, F. (2003).** Isolation and characterization of a new keratinolytic Bacillus licheniformis strain. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19(1), 35-39.

- **[34]- Gross R. 1956**. Water soluble compounds (non-keratins) associated with the plumage of the pigeon (Columbia livia). J Exp Med Sci. 34: 65-70.

- **[35]- Lin X., Lee C.G., Gasale E.S., Shih J.C.H., 1992.** Purification and characterisation of a keratinase from a feather degrading Bacillus licheniformis strain. Applied and Environmental Microbiology, 58, 3271-3275.

- **[36]- Bockle B., Galunsky B., Muller R. 1995.** Characterization of a keratinolytic serine proteinase from Streptomyces pactum DSM40530. Appl Environ Microbiol. 61: 3705-10.

- **[37]- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., and Verneuil, B.**: Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from Streptomyces albidoflavus, Appl. Environ. Microbiol., 65, 2570e2576 **(1999).**

- **[38]- Suh H.J., Lee H.K. 2001**. Characterization of a keratinolytic serine protease from Bacillus subtilis KS-1. J Protein Chem. 20: 165-169.

- **[39]- YU R.J., HARMON S.R., BLANK F**. Isolation and purification of an extracellular keratinase of Trichophyton mentagrophytes. J. Bacteriol. **1968**, 96 : 1435-36.

- **[40]- TSUBOI R., KO I.J., TAKAMORI K., OGAWA H.** Isolation of a keratinolytic proteinase from Trichophyton mentagrophytes with enzymatic activity at acidic pH. Infect. Immun. **1989**, 57 : 3479-83.

- **[41]- Mitsuiki, S., et al., (2004)** Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an *alkaliphilic Nocardiopsis sp. TOA-1*. Enzyme and Microbial Technology,. **34**(5): p. 482-489.

- **[42]- MIGNON B., SWINNEN M., BOUCHARA J.P., HOFINGER M., NIKKELS A., PIERARD G., GERDAY CH., LOSSON B.** Purification and characterization of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from Microsporum canis and evidence of its secretion in naturally infected cats. Med. Mycol**. 1998**a, 36 : 395-404.

- **[43]- BROUTA F., DESCAMPS F., FETT T., LOSSON B., GERDAY CH., MIGNON B.** Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from Microsporum canis. Med. Mycol**. 2001**, 39 : 269- 275.

- **[44]- Jaton-Ogay K, Paris S, Huerre M, Quadroni M, Falchetto R, Togni G, Latge JP, Monod M.** Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of Aspergillus fumigatus. Mol Microbiol **1994**; 14: 917-928.

- **[45]- Aida M., Farag M., Hassan A. 2004**. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from Aspergillus oryzae. Enzyme Microb Technol. 34: 85-93.

- **[46]- Dalev PG.1994**. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. Bioresource Technology, 48: 265-267**.**

- **[47]- Dalve, P., 1990**, "An enzyme-alkaline hydrolysis of feather keratin for obtaining a protein concentrate for fodder," Biotechnology Letters**,** Vol. 12, pp. 71-72.

- **[48]- Cheng S.W., Hu H.M., Shen S.W., Takagi H., Asano A., Tsai Y.C., 1995.** Production and characterization of keratinase of a feather-degrading Bacillus licheniformis PWD-1. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 59, 2239-2243.

- **[49]- Godfrey, T. and P. Reichelt, eds**. **(1985),***The application of enzymes in Industry*. In: Industrial Enzymology. The Nature Press, London.

- **[50]- Yamamoto, S., et al., (2009)** Molecular elements of the regulatory control of keratin filament modulator AHF/trichohyalin in the hair follicle. Exp Dermatol,. **18**(2): p. 152-9.

- **[51]- Andersen L.P. 1998**. Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes. US Patent.5: 834-299.

- **[52]- Varela H., Ferrari M.D., Belobradjic L., Vazquez A. and Loperena M.L. (1997)** Skin unhairing proteases of *Bacillus subtilis*: production and partial characterization. Biotechnol. Lett., 19:755–758.

- **[53]- Hameed A., Keshavarz T. and Evans C.S. (1999)** Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. J. Chem. Technol. Biotechnol., 74: 5–8.

- **[54]- Fujiwara N., Tsumiya T., Katada T., Hosobuchi T., Yamamoto K. 1989**. Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme. Process Biochem. 24: 155-156.

- **[55]- Fujiwara N., Yamamoto K., Masui A. 1991**. Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film. J Ferment Bioeng. 72: 306-308.

- **[56]- Ishikawa F, et al. (1993)** Nuclear proteins that bind the pre-mRNA 3' splice site sequence r(UUAG/G) and the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG)n. *Mol Cell Biol* 13(7):4301-10.

- **[57]- Gajju H., Bhalla T.C. and Agarwal H.O. (1996)** Thermostable alkaline proteases from thermophilic *Bacillus coagulans* PB-77. Indian. J. Microbiol., 36: 153-155.

- **[58]- Ichida J M., Krizov A L., Lefebvre CA., Keener HM., EL well D L. and Burt JR E.H. 2001**. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. Journal of Microbiological Methods, 47: 199-208.

- **[59]- Takami, H., Nakamura, S., Aono, P. and Horikoshi, K., 1992**, "Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from alkaliphilic *BaciZZus sp.* No.AHlOl," Bioscience Biotechnology and Biochemistry, Vol. 56, No. 10, pp. 1667-1669.

- **[60]- KANEHISA Minoru. (2000).** Post-genome Informatics. Oxford, UK : Oxford University Press, 158 p. ISBN 0-19-850326.

- **[61]- Kumar, C.G. and H. Takagi**, **(1999)** *Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint.* Biotechnol Adv,. **17**(7): p. 561-594.

- **[62]- Puri S., Beg Q.K. and Gupta R. (2001)** Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. using response surface methodology. Curr. Microbiol., 44: 286–290.

- **[63]- Brandelli, A., D.J. Daroit, and A. Riffel, (2010)** *Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications.* Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **85**(6): p. 1735-50.

- **[64]- Gupta, R. and P. Ramnani**, (**2006)** Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **70**(1): p. 21-33.

- **[65]- Benkiar A., Nadia Z.J., Badis A., Rebzani F., Soraya B.T., Rekik H., Naili B., Ferradji F.Z., Bejar S., Jaouadi B. (2013a)** Biochemical and molecular characterization of a thermo- and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 83 129-138.

- **[66]- Alebouyeh, M., Orimi, P., Azimi-rad, M., Tajbakhsh, M., Tajeddin, E., Sherafat, S., . . . Zali, M. (n.d**.). Fatal sepsis by Bacillus circulans in an immunocompromised patient. Retrieved October 6**,(2015).**

- **[67]- Logan, N., Old, D., & Dick, H. (1985, July 7).** Isolation of Bacillus circulans from a wound infection. Retrieved Décember 11, 2015.

- **[68]- Kembhavi A.A., Buttle D.J., Knight C.G., Barrett A.J. (1993)** The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays. *Arch. Biochem. Biophys.*, 303 208-213.

- **[69]- Jaouadi B, Ellouz-Chaabouni S, Rhimi M, Bejar S. (2008)** Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. Biochimie. ;90:1291–1305.

- **[70]- WANG, J.J. and SHIH, J.C.H.** Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, **June 1999**, vol. 22, no. 6, p. 608-616.

- **[71]- Souissi, N., et al., (2008)** Preparation and use of media for protease-producing bacterial strains based on by-products from Cuttlefish (*Sepia officinalis*) and wastewaters from marine-products processing factories. Microbiol Res,. 163(4): p. 473-80.

- **[72]- Zaraî Jaouadi, N., et al., (2012)** The overexpression of the SAPB of Bacillus pumilus CBS and mutated *sapB-L31I/T33S/N99Y* alkaline proteases in *Bacillus subtilis DB430*: new attractive properties for the mutant enzyme. Bioresour Technol,. 105: p. 142-51.

- **[73]- Ku, T.W., R.L. Tsai, and T.M. Pan, *A. (*2009)** simple and cost-saving approach to optimize the production of subtilisin NAT by submerged cultivation of *Bacillus subtilis natto.* J Agric Food Chem,. 57(1): p. 292-6.

- **[74]- Akolkar, A., et al., 2009** Statistical optimization of medium components for extracellular protease production by an extreme haloarchaeon, *Halobacterium sp. SP1(1).* Lett Appl Microbiol,. 48(1): p. 77-83.

- **[75]- Zaraî Jaouadi, N., et al.,** (2013) Biochemical and Molecular Characterization of a Serine Keratinase from <italic>*Brevibacillus brevis*</italic> *US575* with Promising Keratin-Biodegradation and Hide-Dehairing Activities. PLoS One,. 8(10): p. e76722.

ANNEXES

Courbe d'étalonnage de la tyrosine (dosage de protéases)

Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/ml/min dans les conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage (0-120 µg/ml) tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions. Nous en avons déduit que : 1µg/ml de tyrosine correspond à une DO_{280} de 0,0055.

$$Activité\ (UI/mL) = \frac{DO \times d \times D}{T \times 0.0055}$$

D : Dilution de l'enzyme ;
d : Dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel ;
T : Temps de la réaction en min

