

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
LABORATOIRE de Biochimie et de Microbiologie Appliquées

# THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

Option : Biochimie Appliquée

**Optimisation de la production d'une kératinase chez une nouvelle souche d'actinomycète thermophile Cpt20 isolée du compost de poulet : purification, caractérisation biochimique et application dans la valorisation des déchets de plumes.**

Présentée par M. KEROUAZ BILAL

Directeur de thèse : M. LADJAMA A.

Pr. Université Badji Mokhtar - Annaba

Membres de Jury:

Président : M. CHEKIREB D.

Pr. Université Badji Mokhtar - Annaba

Examineurs : M. MESSARAH M.

Pr. Université Badji Mokhtar - Annaba

M. HOUALI K.

Pr. Université Mouloud Mammeri, Tizi ouzou

Invité : M. GARGOURI A.F.

Pr. CBS- Université de Sfax - Tunisie

## DÉDICACES

Du plus fond du cœur et avec l'intensité de mes émotions, je dédie ce travail :

A la mémoire de mon très cher père **Abderrahman** Que Dieu, le Tout Puissant lui accorde son infinie miséricorde et l'accueille dans son éternel paradis

Pour son amour infini, pour ses sacrifices qu'il a consentis pour ma réussite. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect, de ma profonde reconnaissance, de ma gratitude et de mon amour.

A ma très chère mère **Fadila**

En témoignage de mon amour éternel et de ma grande reconnaissance pour tous les efforts qu'elle a consentis pour moi tout au long de mes études. Qu'elle trouve dans ce travail le témoignage de ma profonde gratitude et infini dévouement.

**A** ma très chère épouse **Imene**

Aucune parole aussi belle soit-elle. Aucune pensée aussi douce puisse-t-elle. Ne saurait te traduire ma profonde reconnaissance et ma véritable dévotion. Pour ta compréhension et tes encouragements, ta patience et pour ton soutien moral aux moments difficiles. Qu'elle trouve ici l'expression de mon respect,

**A** mon Bout d'choux **Adem (Adou)**

Que Dieu te garde et te donne une longue vie pleine de bonheur, de joie et de succès. Je t'aime beaucoup.

A la mémoire de Taïbí Zina Que Dieu, le Tout Puissant lui accorde son infinie miséricorde et l'accueille dans son éternel paradis

**A** tous mes enseignants depuis l'école primaire jusqu'à ce jour.

**A** toute ma famille et ma belle-famille, mes amis, mes collègues et tous ceux qui me sont chers qui sont nombreux et que je ne citerais pas ici

volontairement de peur d'oublier l'un d'entre eux  
avec tout mon respect.

Je vous souhaite tout le bonheur du monde et un  
brillant avenir.

Vous êtes toujours dans mes pensées...

Bilal

# REMERCIEMENTS

الحمد لله رب العالمين

A l'issue de la rédaction de ce mémoire, je suis convaincu que le travail de thèse universitaire est loin d'être un travail solitaire. C'est avec très grand plaisir que je souhaite remercier tous ceux qui m'ont aidé ou soutenu pendant la préparation de ma thèse.

Je tiens particulièrement à exprimer mes sincères sentiments de respect à Monsieur le Professeur **Ali LADJAMA**, Directeur de thèse, pour son accueil chaleureux qu'il m'a réservé, pour ses aides précieuses, ses conseils, ses encouragements et surtout d'avoir bien voulu diriger ce travail et de m'avoir accordé sa confiance à de multiples occasions. Ce travail représente les fruits de ses discussions, votre rigueur scientifique, votre clairvoyance et votre perspicacité en même temps que votre amabilité et gentillesse m'ont été d'un grand apport au cours de ce travail. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tous cela. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon plus grand respect pour vos directives et vos conseils tout au long de mes travaux de thèse.

Je tiens également à remercier Pr. **Ali Faouzi GARGOURI**, Professeur et Directeur du Laboratoire de Valorisation de la Biomasse et Production de Protéines chez les Eucaryotes (LVBPPE) au CBS (Centre de Biotechnologie de Sfax) pour grande disponibilité, de même que Pr. **Hafedh BELGHIT** de m'avoir accepté dans son laboratoire. Au niveau de leur laboratoire, j'ai pu faire la purification et sa caractérisation de l'enzyme, de même que l'aspect moléculaire. Leur grande collaboration m'a été très précieuse. Pr. **Ali Faouzi GARGOURI** a non seulement le potentiel scientifique mais aussi une modestie inégalée, qu'il trouve toute ma reconnaissance.

De même je remercie vivement monsieur le Pr. **Bassem JOUADI** (CBS) pour son aide technique particulièrement dans la partie moléculaire. Qu'il trouve toute ma considération.

En fin, je tiens aussi à remercier Dr. **Alain BRANS**, maître de conférences et responsable de l'unité de purification des protéines au centre d'ingénierie de protéines de Liège (BELGIQUE). Grâce à son aide nous avons tenté de séquencer le génome de la souche et localiser le gène qui code pour la synthèse de la protéase. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères reconnaissances et mon immense gratitude.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Mr le professeur **Djamel CHEKIREB** pour m'avoir honoré d'accepter de présider le jury de ma thèse et de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent à Monsieur pour l'honneur qu'il m'a fait en assumant la tâche de rapporteur de ma thèse et de juger ce travail.

Je tiens à remercier très vivement Monsieur le professeur **Mahfoud MESSARAH** de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ma thèse et de juger ce travail.

Je tiens à remercier très vivement Monsieur le professeur **Karim HOUALI** de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ma thèse et de juger ce travail.

## Listes des figures :

Numéro de figures	Titre de la figure	Page
Figure 1	Distribution des ventes des enzymes	Page 8
Figure 2	(a)Schéma représentant le mode d'action des kératinases sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures , (b) représentation schématique des ponts disulfures entre résidu de cystéines	
Figure 3	Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure primaire de l' $\alpha$ -kératine de la chevelure humaine	Page 19
Figure 4	Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure secondaire de la $\beta$ -kératine et des ponts disulfures (S-S) de la chevelure humaine	Page 19
Figure 5	Schéma de la structure d'une plume	Page 21
Figure 6	Photographies par microscope électronique du mycélium aérien de quelques espèces d' <i>Actinomadura</i> a: courte chaîne de 3 spores de <i>A. catellatispora</i> 80-60T (Lu et al., 2003), b: spire irrégulière avec 8 spores de <i>A. chokoriensis</i> 3-45-a(11)T (Ara et al., 2008), c: chaîne droite de 15 spores de <i>A. flavalba</i> YIM 61435T (Qin et al., 2009), d: chaîne incurvée de 10 spores avec paroi verruqueuse de <i>A. glauciflava</i> 3.24T (Lu et al., 2003)	Page 25
Figure 7	Parts du marché européen par société en 1998 et segmentation des différentes formes de lessives : liquides (classiques, concentrés), poudres (classiques, concentrées) et tablettes.	Page 27
Figure 8	Mise en évidence d'activités protéolytiques de la souche Cpt20 sur milieu GNL (test semi-quantitatif) avec un rapport halo/colonie supérieur à 4 (++++)	Page 62
Figure 9	Mise en évidence d'activités kératinolytiques de la souche Cpt20 sur milieu à base de farine de plumes (test semi-quantitatif) avec un rapport halo/colonie supérieur à 4 (++++)	Page 62
Figure 10	Effet de différentes sources de carbone sur la production de kératinases chez la souche <i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt20	Page 64
Figure 11	Effet des différentes sources d'azote sur la production de kératinases chez la souche <i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt20	Page 65
Figure 12	Charte de Pareto montrons l'effet standard de chaque élément.	Page 69
Figure 13	Surface plot de la réponse par rapport au $K_2HPO_4$ et $CaCO_3$	Page 73
Figure 14	Ligne de contour de la réponse en fonctions du $CaCO_3$ et $K_2HPO_4$	Page 73

Figure 15	Corrélation entre l'activité expérimentale et l'activité théorique	Page 75
Figure 16	Profil de l'élution de du mélange enzymatique suite a une chromatographie échangeuse de cations, B : zymogramme du mélange enzymatique avant la chromatographie	Page 79
Figure 17	A : Chromatogramme de l'HPLC en gel filtration de contrôle de pureté de la KERA-71, B : Gel SDS-PAGE (1 : marqueurs de taille ; 2 : fractions actives retenus suite à la FPLC échangeuse de cations ; 3 : mélange enzymatique avant la chromatographie échangeuse de cations), C : zymogramme des fractions actives retenus suite à la FPLC échangeuse de cations.	Page 79
Figure 18	A : Chromatogramme de l'HPLC en gel filtration de contrôle de pureté de la KERB-19, B : Gel SDS-PAGE (1 : fractions actives non retenus suite à la FPLC échangeuse de cations ; 2 : marqueurs de taille), C : zymogramme des fractions actives non retenus suite à la FPLC échangeuse de cations.	Page 80
Figure 19	Détermination des pH optimum de la KERA-71 et KERB-19.	Page 87
Figure 20	Effet du pH sur la stabilité de KERA-71.	Page 88
Figure 21	Effet du pH sur la stabilité de KERB19.	Page 88
Figure 22	Effet de la température sur les KERA-71 et KERB-19 produites par la souche <i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt20 en présence et en absence de Ca <sup>++</sup>	Page 90
Figure 23	Etude de la thermostabilité de l'enzyme KERA-71.	Page 91
Figure 24	Etude de la thermostabilité de l'enzyme KERB-19.	Page 91
Figure 25	Courbe d'hydrolyse de la poudre de plumes de volailles par différentes enzymes kératinolytiques.	Page 102
Figure 26	Courbe d'hydrolyse de la poudre de plumes de canards par différentes enzymes kératinolytiques.	Page 102
Figure 27	Biodégradation de plumes. A : Contrôle à blanc, B : extrait brute (KERA-71 + KERB-19), C : Pepsine, D : Papaïne )	Page 104
Figure 28	Etude comparative des capacités d'épilage enzymatique de la KERA-71 et la KERB-19	Page 105

## Liste des Tableaux :

---

Numéro du tableau	Titre du tableau	Page
Tableau 1	Diversité des micro-organismes kératinolytiques et propriétés biochimiques de leurs kératinases	Page 14
Tableau 2	Concentration des acides aminés en gramme par Kg de plumes	Page 21
Tableau 3	Opérations de tannage et produits chimiques utilisés.	Page 28
Tableau 4	Matrice de Plackett et Burman pour l'étude de 10 variables avec 11 expériences.	Page 42
Tableau 5	Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett et Burman.	Page 43
Tableau 6	Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré	Page 44
Tableau 7	Les deux niveaux bas et élevés de l'ensemble des facteurs	Page 66
Tableau 08	La matrice Plackett & Burman avec les différents résultats	Page 67
Tableau 09	Effets estimés et les Coefficients de différents facteurs sur la réponse	Page 68
Tableau 10	Les niveaux codés des différents facteurs étudiés par le plan Box-Wilson	Page 70
Tableau 11	Criblage des facteurs par le plan Box-Wilson	Page 71
Tableau 12	Analyse de la variance	Page 72
Tableau 13	Récapitulation des niveaux d'activité protéolytiques obtenus par la souche Cpt20	Page 75
Tableau 14	Tableau de purification de la KERA-71 de la souche <i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt20	Page 80
Tableau 15	Alignement de la séquence NH-2 Terminale de la KERA-71 et la KERB-19	Page 82

	avec celles de la banque de données NCBI	
Tableau 16	Effet de différents inhibiteurs et ions métalliques sur l'activité de la KERA-71	Page 95
Tableau 17	Etude de la spécificité de la KERA-71 et la KERB-19 sur différents substrats protéiques et sur peptides synthétiques.	Page 98
Tableau 18	Tableau comparatif des paramètres cinétiques des enzymes KERA-71 et KERB-19 pour la réaction d'hydrolyse de la kératine et un peptide synthétique.	Page 100

## **ABRÉVIATIONS ET UNITÉS UTILISÉES**

---

<b>A</b>	AAA	: <i>N</i> -succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Ala- <i>p</i> -nitroanilide
	AAPF	: <i>N</i> -succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe- <i>p</i> -nitroanilide
	AAPL	: <i>N</i> -succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Leu- <i>p</i> -nitroanilide
	AAPM	: <i>N</i> -succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Met- <i>p</i> -nitroanilide
	AAVA	: <i>N</i> -succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Val-L-Ala- <i>p</i> -nitroanilide
	ADNp	: ADN plasmidique
	AS	: Activité spécifique
	ATEE	: <i>N</i> -Acetyl-L-tyrosine ethyl ester monohydrate
<b>B</b>	BAEE	: <i>N</i> -benzyl-L-arginine ethyl ester
	BAPNA	: $\alpha$ -benzoyl-L-tyrosine <i>p</i> -nitroanilide
	BCEE	: S-benzyl-L-cysteine ethyl ester hydrochloride
	BTEE	: <i>N</i> -benzyl-L-tyrosine ethyl ester
	$\beta$ -ME	: Béta- mercaptoéthanol
<b>D</b>	DH	: Degré d'hydrolyse
	DFP	: Di-isopropyl-fluorophosphate
	DMF	: Diméthylformamide
	DMSO	: Diméthylsulfoxyde
	dNTP	: Désoxyribonucléotide triphosphate (N=A, G, C ou T)
	DTNB	: Acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) ou le réactif d'Ellman
	DTT	: Dithiothréitol
<b>F</b>	FPLC	: «Fast Pressure Liquid Chromatography»
<b>G</b>	GNL	: Gélose nutritive au lait
<b>H</b>	TRIS	: Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipérazineéthane sulfonique
	HPLC	: Chromatographie en phase liquide à haute performance
<b>I</b>	IMC	: Chaperonne intramoléculaire ou «Intramolecular chaperon»
	IPTG	: Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
	IUBMB	: Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire
<b>M</b>	MES	: Acide 2-( <i>N</i> -morphino) éthane sulfonique
	MM	: Masse Moléculaire
<b>N</b>	NEM	: <i>N</i> -éthylmaléamide
<b>P</b>	PAGE	: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
	PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne ou «Polymerase chain reaction»
	PEG	: Polyéthylène glycol
	PMSF	: Phénylméthylsulfonyl fluorure ou «Phenyl methyl sulfonyl fluoride»
	<i>p</i> -NA	: <i>p</i> -nitroanilide

<b>S</b>	SC	: Subtilisine Carlsberg
	SDS	: «Sodium dodecyl sulfate»
	/	: «Serine thio-alkaline protease alkaline protéase
<b>T</b>	TAME	:N $\alpha$ -p-Tosyl-l-arginine methyl ester hydrochloride
	TCA	: Acide trichloroacétique
	TLCK	: N $\alpha$ -p-tosylL-lysine chloro-méthyl cétone
	TPCK	: Np-tosyl L-phényl alanine chloro-méthylcétone
	Tris	: Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
	3D	: Tridimensionnelle
<b>U</b>	U.V.	: Ultra-violet
<b>X</b>	X-gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside
<b>Y</b>	YLV	: N-succinyl-l-Tyr-l-Leu-l-Val-p-nitroanilide

في هذه الدراسة ، تم إنتاج إنزيمين يمتلكان قدرة تحليل الكيراتين تحت تسمية KERA-71 (النموذج A) و KERB-19 (النموذج B) على وسط استنبات سائل متكون اساسا من وجبة ريش الدواجن. بواسطة سلالة أكتينوميست محبة للحرارة *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 المعزولة من سماد الدجاج (شمال شرق الجزائر) . تم تحسين إنتاج هذه الإنزيمات على الوسط السائل باتباع طريقة التصميم التجريبية ونتيجة لذلك ، زاد مستوى النشاط من 1120 وحدة / مل إلى 6800 وحدة / مل ، أي ما يعادل 6 أضعاف. أظهرت التجارب أن معلمتين فقط  $CaCO_3$  جم / لتر و  $K_2HPO_4$  جم / لتر) لهما تأثير كبير على إنتاج KERB-19 و KERA-71. تمت تنقية الأنزيمين المنتجين (KERB-19 و KERA-71) ودُرست خواصهما الكيميائية والجزئية. بشكل عام ، يتم تثبيط الأنزيمين بواسطة PMSF و DFP الذي يصنفهما في مجموعة سيرين بروتياز ، كما أن إضافة أيونات الكالسيوم تعزز نشاط الإنزيمات وثباتها الحراري. أيضًا ، الشكلان لهما هيكل أحادي و نفس القابلية لتحليل المواد الطبيعية الغنية بالكيراتين. على الجانب الآخر ، يختلف النموذجان بالمعايير التالية: درجة الحموضة المثلى ، درجة الحرارة المثلى ، الوزن الجزيئي ودرجة التحليل المائي. تمت مقارنة هذه الخاصية الأخيرة مع الكيراتينازات التجارية و غير التجارية ، ويظهر الأنزيمين KERB-19 و KERA-71 بدرجة أعلى من التحليل المائي.

من وجهة النظر الجزيئية ، يعطي تسلسل الطرف  $NH_2$  للصيغة A 29 حمض أميني بالتسلسل: MSQAGRRLPARLGATLSALTTLTAVFVFPV. تعطي محاذاة قاعدة البيانات (NCBI) تجانسًا بنسبة 64٪ لبروتياز السيرين لسلالة *Actinomadura viridilutea*. من ناحية أخرى ، يحتوي النموذج B على تسلسل N- طرفي من 22 حمضًا أمينيًا يختلف عن ذلك الموجود في النموذج A والذي يحتوي على التسلسل التالي: ADIDAGLAYTMGGRCSVGFAAT ؛ تعطي محاذاة قاعدة البيانات (NCBI) لهذا التسلسل تماثل بنسبة 92٪ مع سيرين بروتياز (KERDZ) من سلالة *Actinomadura viridilutea* DZ50. كما أتاح هذا العمل البحثي إمكانية عزل جين *kerb-19* بحجم 4.8 كيلو بايت وكذلك جين *kerb-19* بحجم 1.84 كيلو بايت.

من وجهة نظر تطبيق التكنولوجيا الحيوية ، ثبت أن KERB-19 و KERA-71 فعالان للغاية في تحلل الريش الكامل وهذا من خلال الذوبان الكامل لنفايات الريش. تشير هذه الخصائص البيوكيميائية والبيوتكنولوجية المختلفة إلى أن هذه الكيراتينازات يمكن أن تكون مرشحة في مجال التحويل الحيوي للنفايات الغنية بالكيراتين وكذلك كبديل عن المواد الكيميائية في معالجة الجلد

الكلمات المفتاحية: *Actinomadura keratinilytica* , , KERA-71 , KERB-19, kératinase , Protéases , Hydrolyse

# RÉSUMÉ

---

Deux activités kératinolytiques dénommées KERA-71 (forme A) et KERB-19 (forme B) sont produites sur milieu de culture liquide optimisé à base de farine de plume de volaille par une souche d'actinomycète thermophile *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 isolée du compost de poulet (Nord-Est Algérie). La production de ces enzymes sur milieu liquide est optimisée par méthode de plan d'expérience et a permis d'augmenter le niveau d'activité qui passe de 1120 U/mL à 6800 U/mL soit un facteur de 6 fois. L'étude montre que seuls deux paramètres :  $\text{CaCO}_3$  (3 g / l) et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,25 g / l) ont un effet significatif sur la production des enzymes kératinolytiques. L'étude a porté sur les deux formes, la KERA-71 et la KERB-19. Ces deux enzymes sont purifiées et leurs propriétés biochimiques et moléculaires sont élucidées. Ainsi, en commun, les deux kératinases sont inhibées par le PMSF et le DFP ce qui les classent dans le groupe des protéases à serine, de même que l'addition du calcium augmente d'une part leurs activités et d'autre part leurs thermostabilité. Aussi les deux formes possèdent une structure monomérique et une même affinité pour le substrat naturel qui est la farine de plume. En revanche les deux formes se différencient par les paramètres suivants : pH optimum, température optimale, masse molaire et degré d'hydrolyse. Cette dernière propriété est comparée à d'autres kératinases commerciales ou non, et les deux formes KERA-71 et la KERB-19 présentent un degré d'hydrolyse supérieur. Du point de vue moléculaire, le séquençage du N-terminalee de la forme A donne 29 acides aminés avec comme séquence : MSQAGRRLPARLGATLSALTLTAVFVFPV. L'alignement par database (NCBI) donne une homologie de 64 % avec la protéase à serine de la souche *Actinomadura viridilutea*. Par contre la forme B possède une séquence N-terminalee de 22 acides aminés différente de celle de la forme A et qui a comme séquence : ADIDAGLAYTMGGRCSVGFAAT ; l'alignement par database (NCBI) de cette séquence donne une homologie de 92 % avec la protéase à serine (KERDZ) de la souche *Actinomadura viridilutea* DZ50. Ce travail de recherche a permis également d'isoler le gène *ker-71* de taille de 4,8 Kb ainsi que le gène *kerb-19* et de taille 1,84 kb. Du point de vue application biotechnologique, la KERA-71 et la KERB-19 se sont montrées très actives sur la dégradation des plumes entières et cela par solubilisation presque totale de déchet de plumes. Ces différentes propriétés biochimiques et biotechnologiques, laissent penser que ces kératinases pourraient être des bons candidats dans la bioconversion des déchets riches en kératine de mêmes qu'une alternative dans le traitement du cuir.

Mots clés : *Actinomadura keratinilytica*, KERA-71, KERB-19, kératinase, Protéases, Hydrolyse

## ABSTRACT

---

Two keratinolytic activities called KERA-71(form A) and KERB-19 (form B) were produced on liquid culture medium based on poultry feather meal by a thermophilic actinomycete strain, *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 isolated from chicken compost (Northeast Algeria). The production of this enzymes on liquid medium is optimized following an experimental design method and as a result, the level of activity increased from 1120 U / mL to 6800 U / mL, equal to a factor of 6 times. The experimentations show that only two parameters CaCO<sub>3</sub> (3 g / l) and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.25 g / l) have a significant effect on the production of KERA-71 and KERB-19. The two produced enzymes (KERA-71 and KERB-19) were purified and their biochemical and molecular properties are studied. Thus, in common, the two keratinases are inhibited by PMSF and DFP which classifies them in the group of serine proteases, also, the addition of calcium ions enhance the enzymes activity and their thermostability. Also, the two forms have a monomeric structure and the same affinity for the natural substrate which is the feather meal. Elseways, the two forms are distinguished by the following parameters: optimum pH, optimum temperature, molecular weight and degree of hydrolysis. This latter property is compared with other commercial or non-commercial keratinases, and the two forms KERA-71 and CURB-19 exhibit a higher degree of hydrolysis.

From a molecular point of view, the sequencing of the N-terminal of KERA-71 gives 29 amino acids with the sequence: MSQAGRRLPARLGATLSALTLTAVFVFPV. Database Alignment (using NCBI) gives 64% homology to the serine protease of the strain *Actinomadura viridilutea*. Otherwise, form B has an N-terminal sequence of 22 amino acids different from that of form A and the sequence is as follows: ADIDAGLAYTMGGRC SVGFAAT; the database alignment (NCBI) of this sequence gives 92% homology with the serine protease (KERDZ) of the strain *Actinomadura viridilutea* DZ50. Also, we managed to isolate the *kerA-71* gene with 4.8 Kb in size as well as the *kerB-19* gene with 1.84 kb in size.

In addition, from an application point of view, KERA-71 has demonstrated very good activity degrading the whole feathers. These different biochemical and biotechnological properties, suggest that both KERA-71 and KERB-19 can be a strong candidate in different biotechnological applications in particular the bioconversion of wastes rich in keratin as well as an alternative in the leather treatment instead of harmful and polluting products.

Key words: *Actinomadura keratinolytica*, KERA-71, KERB-19, keratinase, Protease, Hydrolyze

# TABLE DES MATIÈRES

LISTES DES FIGURES :	3
LISTE DES TABLEAUX :	5
ABRÉVIATIONS ET UNITÉS UTILISÉES	6
المخلص	8
RÉSUMÉ	10
ABSTRACT	11
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>1</b>
INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
<b>SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>5</b>
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	6
<b>1 PROTÉASES</b>	<b>6</b>
1.1 GÉNÉRALITÉS SUR LES PROTÉASES	6
1.2 LE MARCHÉ MONDIAL DES PROTÉASES	7
1.3 ORIGINE DES PROTÉASES	8
1.3.1 Protéases d'origine végétale	8
1.3.2 Protéases d'origine animale	9
1.3.3 Protéases d'origine microbienne	10
1.4 DIFFÉRENTES CLASSES DES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES	11
➤ PEPTIDASES À SÉRINE	11
➤ PEPTIDASES À CYSTÉINE	11
➤ PEPTIDASES À ASPARTATE	11
➤ PEPTIDASES À MÉTAL	11
➤ PEPTIDASES À GLUTAMATE	11
<b>2 KÉRATINASES</b>	<b>11</b>
2.1 GÉNÉRALITÉS SUR DES KÉRATINASES	11
2.2 LES KÉRATINASES DES MICRO-ORGANISMES	12
2.3 PHYSIOLOGIE DE LA PRODUCTION DES KÉRATINASES	14
2.4 PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DES KÉRATINASES	14
2.5 ÉTUDE DES RELATIONS STRUCTURE-FONCTIONS DES KÉRATINASES	15
<b>3 LES SUBSTRATS KÉRATINIQUES</b>	<b>16</b>
3.1 STRUCTURE DES KÉRATINES	17
3.2 CLASSIFICATION DES KÉRATINES	17
3.3 SOURCES DES KÉRATINES	19
3.4 VALORISATION DES DÉCHETS DE PLUMES	22
<b>4 LES ACTINOMYCÈTES</b>	<b>23</b>
4.1 CARACTÉRISTIQUES PRINCIPALES DES ACTINOMYCÈTES	23
4.2 LE GENRE ACTINOMADURA	23
4.2.1 Historique, classification et habitat	23
4.2.2 Macromorphologie et micromorphologie	24

4.2.3	Chimiotaxonomie, physiologie et activité .....	25
4.3	PRODUCTION DE PEPTIDASES PAR LES ACTINOMYCÈTES .....	25
<b>5</b>	<b>APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES PEPTIDASES .....</b>	<b>26</b>
5.1	DÉTERGENCE .....	26
5.2	TRAITEMENT DU CUIR .....	28
5.3	ALIMENTATION ANIMALE .....	29
5.4	TRAITEMENT DE LA CHEVELURE .....	30
5.5	TRAITEMENT DES FILMS PHOTOGRAPHIQUES .....	30
5.6	TRAITEMENT DES REJETS INDUSTRIELS .....	30
5.7	TRAITEMENT DE LA SOIE .....	31
<b>6</b>	<b>NOTION D'OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'ENZYMES PAR PLAN D'EXPÉRIENCES. ....</b>	<b>31</b>
6.1	PLAN DE PLACKETT BURMAN .....	32
6.2	PLANS POUR SURFACES DE RÉPONSES (RESPONS SURFACE METHODOLOGY(RSM)) .....	33
6.3	PLAN BOX-WILSON (CENTRAL COMPOSITE DESIGN (CCD)) .....	33
6.4	PLAN BOX-BEHNKEN (BBD) .....	33
	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>35</b>
	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>36</b>
<b>1</b>	<b>ETUDE PRÉLIMINAIRE .....</b>	<b>36</b>
1.1	SOUCHE UTILISÉE .....	36
1.2	CULTURE ET CONSERVATION DE LA SOUCHE .....	36
1.3	RECHERCHE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE ET KÉRATINOLYTIQUE CHEZ LA SOUCHE CPT20 SUR MILIEU SOLIDE (TEST SEMI-QUANTITATIF) .....	37
1.4	RECHERCHE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE ET KÉRATINOLYTIQUE CHEZ LA SOUCHE CPT20 SUR MILIEU LIQUIDE (TEST QUANTITATIF) .....	38
1.5	MESURE DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (AS) .....	39
	LA DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE CORRESPOND AU RAPPORT DE L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME (UI) SUR LA CONCENTRATION DES PROTÉINES (MG) COMME SUITE $AS = UI/MG$ DE PROTÉINE. L'INTÉRÊT DU CALCUL DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE EST DE SUIVRE LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE PURIFICATION DE L'ENZYME. ....	39
<b>2</b>	<b>OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DES KÉRATINASES .....</b>	<b>40</b>
2.1	SÉLECTION DE LA MEILLEURE SOURCE D'AZOTE ET DE CARBONE .....	40
2.2	SCREENING DES FACTEURS SIGNIFICATIFS .....	41
2.3	OPTIMISATION DES COMPOSANTS SÉLECTIONNÉS .....	44
2.4	TEST DE VALIDATION .....	44
2.5	ANALYSE STATISTIQUE ET MODÉLISATION .....	44
<b>3</b>	<b>PURIFICATION DES KÉRATINASES .....</b>	<b>46</b>
3.1	PROTOCOLE DE PURIFICATION .....	46
➤	Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium .....	46
➤	Chromatographie échangeuse de cations en Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) .....	47
➤	Contrôle de pureté par chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance en d'exclusion-diffusion (HPLC) .....	47
3.2	MÉTHODES ANALYTIQUES .....	48
3.2.1	Analyse de la pureté de l'enzyme par électrophorèse en PAGE-SDS .....	48
3.2.2	Détection de l'activité protéasique par zymographie .....	48
<b>4</b>	<b>CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES KÉRATINASES .....</b>	<b>49</b>

4.1	EFFET DU PH SUR L'ACTIVITÉ ET LA STABILITÉ DE KERA-71 ET KERB-19 .....	49
4.2	EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR L'ACTIVITÉ ET LA STABILITÉ DE KERA-71 ET KERB-19 .....	49
4.3	EFFET DES INHIBITEURS ET DIFFÉRENTS IONS MÉTALLIQUES SUR KERA-71 ET KERB-19 .....	49
4.4	DÉTERMINATION DE LA SPÉCIFICITÉ DE KERA-71 ET KERB-19 SUR PROTÉINES NATURELLES, PROTÉINES SYNTHÉTIQUES ET PEPTIDE SYNTHÉTIQUE .....	50
4.5	DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES .....	51
4.6	DÉTERMINATION DU DEGRÉ D'HYDROLYSE .....	51
4.7	DÉTERMINATION DE LA SÉQUENCE N-TERMINALES PAR LA MÉTHODE D'EDMAN AUTOMATISÉE (DÉGRADATION D'EDMAN) .....	52
4.8	APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DE LA KERA-71 ET LA KERB-19 .....	53
4.8.1	<i>Bio-conversion des déchets riches en kératines par l'extrait brut contenant les deux enzymes.</i> .....	53
4.8.2	<i>Application de la KERA-71 et la KERB-19 dans l'épilage de cuir</i> .....	54
	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>55</b>
	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>56</b>
<b>1</b>	<b>MISE EN ÉVIDENCE DIRECTE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE ET KÉRATINOLYTIQUE DE LA SOUCHE CPT20</b> <b>56</b>	
1.1	MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ SUR MILIEU SOLIDE .....	56
1.2	MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ SUR MILIEU LIQUIDE .....	58
<b>2</b>	<b>OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE KÉRATINASES PAR PLAN D'EXPÉRIENCES</b> .....	<b>58</b>
2.1	ETUDE PRÉLIMINAIRE .....	59
2.1.1	<i>Effet des différentes sources de carbone sur la production de kératinase(s)</i> .....	59
2.1.2	<i>Effet de différentes sources d'azote sur la production de kératinase(s)</i> .....	60
2.2	ETUDE DE L'OPTIMISATION DE PRODUCTION DE KÉRATINASE PAR LA SOUCHE CPT20 PAR PLAN D'EXPÉRIENCE .....	61
2.2.1	<i>Criblage des facteurs par le modèle Plackett –Burman</i> .....	61
2.2.2	<i>Optimisation des facteurs les plus influents</i> .....	65
2.2.3	<i>Validation des conditions optimales</i> .....	69
	<b>DANS CETTE DEUXIÈME PARTIE DE THÈSE, NOUS NOUS SOMMES INTÉRESSÉS À LA PURIFICATION ET LA CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES KÉRATINASES PRODUITES PAR LA SOUCHE ACTINOMADURA KERATINILYTICA CPT20 SUITE À UNE OPTIMISATION PAR PLAN D'EXPÉRIENCES.</b> .....	<b>72</b>
<b>1</b>	<b>PROTOCOL DE PURIFICATION</b> .....	<b>72</b>
<b>2</b>	<b>IDENTIFICATION DE DEUX ACTIVITÉS KÉRATINOLYTIQUES (FORME A ET FORME B)</b> .....	<b>76</b>
<b>3</b>	<b>CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES DEUX KÉRATINASES (KERA-71 ET KERB-19)</b> .....	<b>78</b>
3.1	DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLEAIRE (Mr) PAGE-SDS .....	78
3.2	EFFET DU PH SUR L'ACTIVITÉ ET SUR LA STABILITÉ DE KERA-71 ET KERB-19 .....	79
3.3	EFFET DE LA TEMPÉRATURE (T°) SUR L'ACTIVITÉ ET SUR LA STABILITÉ DE KERA-71 ET KERB-19 .....	84
3.4	EFFET D'INHIBITEURS ET DIFFÉRENTS IONS MÉTALLIQUES SUR LA STABILITÉ DES DEUX KÉRATINASES .....	88
3.5	DÉTERMINATION DE LA SPÉCIFICITÉ DES DEUX KÉRATINASES VIS-À-VIS DES SUBSTRATS .....	91
3.6	DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES .....	94
3.7	DÉTERMINATION DU DEGRÉ D'HYDROLYSE .....	96
<b>4</b>	<b>EVALUATION DU POTENTIEL BIOTECHNOLOGIQUE DE KERA-71 ET LA KERB-19</b> .....	<b>98</b>
4.1	APPLICATION DANS LA BIOCONVERSION DES DÉCHETS KÉRATINIQUES .....	98
4.2	APPLICATION DANS L'ÉPILAGE ENZYMATIQUE .....	99
	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>102</b>

<b>ANNEXES .....</b>	<b>105</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>119</b>

# ***INTRODUCTION GÉNÉRALE***

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

Les enzymes protéolytiques se classent parmi les enzymes hydrolytiques les plus utilisées dans plusieurs domaines de biotechnologie tels que les industries alimentaires, la tannerie, le recyclage des déchets, la lessive et autres secteurs. Selon le mode d'attaque (attaque nucléophile) des acides aminés du site actif, ces protéases sont regroupées au nombre de six classes. Nous distinguons les métallo protéases, les protéases à Sérine, les protéases à Cystéine, les protéases à Thréonine, et en fin les protéases à Aspartate (Gupta et al., 2002).

Les protéases à sérine sont la classe de protéase la plus abondante avec une sérine comme résidu catalytique essentiel dans le site actif. La sérine déclenche une attaque nucléophile sur la liaison peptidique dans un environnement électronique souvent fourni par une histidine et un acide aspartique (Wells & Estell, 1988). Les protéases à sérine sont classées par rapport à la spécificité du substrat et de l'homologie structurale (Moriyama, 1974). Les principales sous-classes de protéase à sérine sont : subtilisine-like, chymotrypsine-like, sérine carboxypeptidase II-like, prolyligopeptidase-like, myxobacter a-lytique et protéases staphylococciques (Gupta et al., 2002).

Les protéases sont d'une grande importance économique couvrant ainsi 65 % du marché mondial des enzymes. Ce marché est dominé essentiellement par les protéases d'origine microbienne et c'est le genre *Bacillus* qui domine le marché mondial avec 40 % qui alimente ce secteur (Rekik et al., 2019). En effet, les protéases sont produites par les animaux, les végétaux et les microorganismes. Ces derniers peuvent être mésophiles, thermophiles ou extrémophiles. Ainsi, les microorganismes isolés du milieu chaud (eaux thermales, compost) produisent des enzymes thermostables alors que les microorganismes isolés d'un milieu salé (halophile) produisent des enzymes stables dans un milieu riche en sels (Li et al., 2013).

Du point de vue biotechnologique et par rapport aux autres sources de production d'enzymes, les microorganismes restent la source la plus utilisée du fait ces enzymes ont une meilleure stabilité vis à vis de la température, du pH, des sels et les solvants organiques. Parmi, ces microorganismes

, les bactéries, avec le genre *Bacillus* qu'est le genre le plus étudié et qui produit des protéases alcalines ayant des applications dans la détergence (Vojcic et al., 2015). Chez les champignons, le genre *Aspergillus* est le plus utilisé. A titre d'exemple, nous citons l'espèce *Aspergillus fumigatus* qui produit une protéase alcaline (Redes et al., 2019). Chez les actinomycètes et en particulier le genre *Actinomadura*, très peu d'études sont publiées. Nous citons les travaux de recherche (A. Habbeche et al., 2014) sur la production de kératinases chez une souche d'*Actinomadura keratinilytica* Cpt29, de même que les travaux (Ben Elhouli et al., 2016) sur la souche *Actinomadura viridilutea* DZ50 isolée du port de pêche de la wilaya de Skikda qui produit une kératinase. Également les travaux (Wang et al., 2019) sur une souche d'actinomycète thermophile *Thermoactinomyces sp.*YT06 isolée du compost de poulet et qui produit une kératinase thermostable. Pour la plupart des travaux de recherche de ces protéases, on procède à l'optimisation de leur production. Par la suite ces enzymes sont purifiées et leurs propriétés biochimiques et moléculaires sont caractérisées. De même que ces travaux de recherche sont complétés par le clonage (expression hétérologue) du gène codant pour la production de la protéase dans un autre organisme hôte bien étudié et c'est le cas de *E. Coli* ou *Pichia pastoris* pour obtenir une enzyme recombinante. Cette étape permet donc d'une part de purifier facilement l'enzyme et d'autre part obtenir de grande quantité d'enzyme pour une éventuelle application biotechnologique à grande échelle et c'est le cas de la protéase recombinante produite par *Aspergillus niger* et exprimé dans *Pichia pastoris* (Ke et al., 2019)

En effet, grâce aux outils de la biologie moléculaire, au génie enzymatique et à la bioinformatique ; le marché global des enzymes connaît une croissance ininterrompue depuis plusieurs années et la demande mondiale des enzymes est augmentée de 6,3% par an et le marché global des enzymes industrielles et de spécialité est estimé respectivement à 7,2 et à 9,1 milliards de dollars en 2020 et 2022.

Dans ce contexte global et pour le très peu de travaux de recherches en Algérie, nous nous sommes donc intéressés à la recherche de protéases en l'occurrence les kératinases thermostables produites par la souche d'actinomycètes autochtones thermophiles issues du compost de poulet qui est connu pour abriter des microorganismes thermophiles. Ainsi, au niveau de notre laboratoire (LBMA) deux souches d'actinomycètes thermophiles sont isolées du compost de poulet *Actinomadura keratinilytica* Cp29 et *Actinomadura keratinilytica* Cpt20. La Cpt29 a permis de produire des xylanases (Haberra et al., 2013), des protéases de type kératinase (Habbeche et al., 2014) et d'amylopullulanses (travaux de recherche en cours). La deuxième souche Cpt20 a fait l'objet de plusieurs travaux recherches et qui sont publiés :

production de xylanases thermostables (Taibi et al., 2012) et production de Pectinases thermostables (Saoudi. et al., 2015).

Ce travail de recherche permet donc de compléter cet axe de recherche par l'étude de la production de kératinases chez la Cpt20. En effet, les kératinases sont des protéases produites par des microorganismes qui dégradent la kératine des cheveux, de la laine, et des plumes avec une grande spécificité pour produire d'acides aminés essentiels. Les kératinases sont également utilisées dans le tannage du cuir et dans diverses autres applications comme la valorisation de certains déchets kératiniques tels que, les plumes, les poils, les sabots et les ongles (qui sont riches en kératine, collagène, élastine, albumine, et en acides aminés et peptides à haute valeur ajoutée) (Zarai Jaouadi et al., 2015). En effet, en Algérie, les déchets de plumes sont produits en grande quantité par les industries de la volaille. L'accumulation de ces derniers a une conséquence sur la pollution de l'environnement et la santé publique, d'où l'intérêt de valoriser cette biomasse.

Ainsi, pour aborder ce sujet de thèse Doctorale, nous proposons la démarche scientifique suivante :

- Dans un premier temps, une étude de recherche bibliographique exhaustive qui cadre le sujet de travail
- Dans un deuxième temps, une étude expérimentale se présentant comme suite :
  - \* Optimisation des conditions de culture pour la production de kératinases thermostables par la souche Cpt20 par plan d'expériences (modèle statistique)
  - \* Purification et caractérisation biochimique de la kératinase purifiée.
  - \* Isolement et caractérisation de gène codant pour l'enzyme purifiée.
  - \* Essais d'application (biotechnologie blanche) directe de l'enzyme pure sur la dégradation sur des plumes entières de volailles.

# ***SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE***

# SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## 1 PROTÉASES

### 1.1 Généralités sur les protéases

Les protéases ou enzymes protéolytiques peuvent être rencontrées chez tous les organismes vivants, elles occupent une place privilégiée sur le plan physiologique et commercial (Dvořák et al., 2008; Mala B Rao et al., 1998). Les enzymes protéolytiques sont ubiquitaires, indispensables à la vie des organismes et essentielles à la croissance et à la différenciation cellulaire. En effet, elles interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques complexes (Gupta et al., 2002) à savoir :

- la régulation de nombreux processus métaboliques tels que le « turnover » des protéines cellulaires, le contrôle de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines et la sécrétion sous une forme active des enzymes cellulaires (Bayot et al., 2008; Gupta et al., 2002).
- Le processus de transport et de sécrétion des protéines à travers les membranes
- La formation des spores et leur germination chez les bactéries. En effet, la germination des spores requiert des acides aminés qui seront libérés à la suite de la dégradation des protéines par une sérine endoprotéinase spécifique des protéines de réserves (Rao et al., 1998a).
- L'activation de la forme zymogène des enzymes par une protéolyse limitée. (Un zymogène est un précurseur protéique d'une enzyme, dépourvu d'activité enzymatique, mais qui peut donner après activation une enzyme active).
- la régulation de l'expression des gènes en assurant la maturation des hormones et des facteurs qui contrôlent l'expression des gènes comme par exemple le changement de la spécificité transcriptionnelle de la sous unité B de l'ARN polymérase de *Bacillus thuringiensis* par protéolyse (Rao et al., 1998a).
- le contrôle de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines (Bayot et al., 2008; Gupta et al., 2002).
- la coagulation sanguine par fibrinolyse (Han et al., 2008; Shpacovitch et al., 2008; Shpacovitch et al., 2008).

Les protéases ne sont pas seulement une nécessité physiologique, elles peuvent également devenir un problème si elles ne sont pas bien contrôlées, pouvant détruire les composants protéiques des cellules et des tissus. L'action de ces enzymes a donc besoin d'être régulée. Il existe deux mécanismes de régulation :

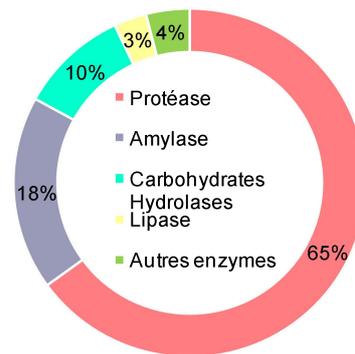
- Le premier est l'activation de précurseurs inactifs ou zymogènes par protéolyse limitée.
- Le deuxième est l'inactivation de ces protéases par formation de complexes avec des inhibiteurs spécifiques.

L'importance physiologique de ces deux mécanismes a été démontrée dans certaines maladies. Par exemple, plusieurs types d'hémophilie sont dues à une déficience de protéases plasmatiques qui normalement activent les zymogènes de la cascade de coagulation sanguine (Dahlback, 2000).

## 1.2 Le marché mondial des protéases

De toutes les enzymes industrielles, les protéases sont de loin le groupe le plus important et le plus commercialisé. En effet, les protéases représentent à elles seules 65% du total des ventes d'enzymes (**figure 01**). La dominance des protéases dans le marché des enzymes industrielles devrait s'accroître. Les ventes industrielles des protéases sont estimées à ~ 7 milliards de dollars en 2017 selon Freedonia group (Cleveland, USA).

Ce type d'enzymes joue un rôle important dans les détergents pour les lessives, (Gupta et al., 2002) (Mechri et al., 2019), dans la synthèse peptidique, dans l'industrie alimentaire pour la fabrication des fromages et ses dérivés (Sullivan et Calkins, 2010) (El-Salam et al., 2019), dans le traitement des rejets industriels et plus récemment dans le traitement du cuir et précisément dans l'étape de confitage et la réhydratation. En effet, l'utilisation des protéases a été préférée par rapport aux méthodes conventionnelles qui requièrent l'utilisation de grandes quantités de produits chimiques et sera ainsi la clef de plusieurs des problèmes écologiques (Otsuki et al., 2010; Walsh et al., 2002) (Ammasi et al., 2020)



**Figure 1** : Distribution des ventes des enzymes (Chutmanop, Chuichulcherm, Chisti, & Srinophakun, 2008)

### 1.3 Origine des protéases

Les protéases se trouvent dans diverses sources notamment : les plantes, les animaux et les microorganismes (Rao et al., 1998a).

#### 1.3.1 Protéases d'origine végétale

Parmi les protéases appartenant à ce groupe, nous pouvons citer : la papaïne, la ficine la broméline et la cynarase.

- **Papaïne** : En provenance du latex de fruit *Carica papaya* qui se développe dans les régions subtropicales. Elle est largement utilisée dans l'industrie pour la préparation des hydrolysats de protéines très solubles et aromatisés (Rao et al., 1998b). C'est une protéase à cystéine, active aux pH 5 - 9 (Azarkan et al., 2006)
- **La ficine** : C'est une protéase à cystéine isolée à partir du latex séché de *Ficus glabrata*. Elle est également présente dans d'autres espèces de *Ficus*. Une figue verte pesant 10-15 g contient environ 100 à 150 mg de protéases (Uhlig, 1998). La plage optimale de pH est de 5,0 à 8,0 et la température optimale est de 45 à 55 ° C (Claverie-Martin et al., 2007). Actuellement, seulement trois fragments de ficine ont été étudiés. La séquence d'acides aminés déterminée pour les résidus du site actif ressemble de près à la séquence correspondante dans la papaïne (Devaraj et al., 2008). Cette protéase est utilisée dans l'industrie alimentaire pour améliorer la tendreté dans la viande (Sullivan & Calkins, 2010).

- **Broméline** : C'est une protéase à cystéine extraite des tiges et fruits immatures d'ananas (*Ananas comosus*). Le pH optimum pour l'activité de bromélaïne est de 6,0 à 8,5 pour la plupart des substrats, la température optimale est de l'ordre de 50 à 60 °C. Cette protéase est utilisée dans plusieurs domaines entre autres le domaine alimentaire (Sullivan & Calkins 2010) et le domaine thérapeutique (Mueller & Mechler, 2005).
- **La cynarase** : La cynarase est également une aspartyl protéase. Elle existe sous trois formes 1, 2, et 3 chez *C. cardunculus* (Heimgartner et al., 1990) et A, B et C chez *C. scolymus* (Llorente et al., 2014). La protéase la plus étudiée c'est la cynarase A. C'est une glycoprotéine de 42 KDa, elle possède un pH optimal de 5,0 et une température optimale de 70 °C. Cette enzyme est utilisée comme agent coagulant le lait (Sidrach et al., 2005).

## 1.3.2 Protéases d'origine animale

### 1.3.2.1 Protéases gastriques

Les protéases gastriques sont des enzymes acides. Elles sont formées d'une seule chaîne polypeptidique comportant 3 ponts disulfures intramoléculaires, tels que :

- **La chymosine** : C'est une protéase aspartique extraite des caillottes de veaux, elle possède un pH optimum de 4,8 et elle est utilisée dans la fabrication du fromage en hydrolysant la liaison entre les résidus Phe105 et Met106 de la caséine, provoquant la coagulation du lait (Chitpinyol et al., 1998; Kappeler et al., 2006).
- **La rénine** : Ou aussi chymosine. Elle est sécrétée dans l'estomac, son rôle dans la digestion est de cailler ou coaguler le lait dans l'estomac des nourrissons de mammifères. Elle est sécrétée comme proenzyme inactif prorénine et elle devient active après autocatalyse ou après l'action de la pepsine. Elle devient active par autocatalyse ou après l'action de la pepsine. Cette enzyme est susceptible d'attaquer les caséines du lait et plus particulièrement la caséine  $\kappa$ , (Emmons et al., 1990; Trujillo et al., 2000).

La rénine est largement utilisée dans la coagulation du lait pour la fabrication du fromage.

- **Pepsine** : C'est une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé hydrophobe (Ala, Gly, Val, Leu, Ile) et aromatique (Tyr, Trp, Phe) engage sa fonction amine. La pepsine est une enzyme du suc gastrique. Elle est synthétisée sous forme de pepsinogène (proenzyme inactive) puis stockée dans les

vésicules enzymatiques des cellules principales, d'où elle est excrétée au moment de la digestion. L'activation du pepsinogène en pepsine est le résultat de l'acide chlorhydrique sécrété par les cellules pariétales de la muqueuse gastrique. Le pH optimum d'action de la pepsine se situe entre 1,8 et 4,4 (Okoniewska & Tanaka, 2000).

### 1.3.2.2 Protéases pancréatiques

La digestion de protéines est initiée par la pepsine dans l'estomac, mais la plus grande partie de digestion des protéines est dû aux protéases pancréatiques. Plusieurs protéases sont synthétisées dans le pancréas, les deux protéases pancréatiques majeures sont la trypsine et la chymotrypsine, elles sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs.

- **Trypsine** : C'est la protéase à sérine la plus fréquemment utilisée du fait de sa spécificité d'hydrolyse stricte, elle hydrolyse la liaison peptidique du groupement carbonyle de l'arginine et de la lysine. Son pH optimum d'action est de 8 et elle est responsable de l'hydrolyse des protéines au niveau de l'intestin (Brattsand & Egelrud, 1999; Wysocka et al., 2010).
- **Chymotrypsine** : C'est une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé aromatique (Tyr, Trp, Phe ainsi que Met) engage sa fonction acide. Son pH optimal d'action est compris entre 7 et 8 (Ruthenbürger et al., 2006).

### 1.3.3 Protéases d'origine microbienne

La communauté microbienne est privilégiée par rapport aux animaux et aux plantes pour la production de protéases à grande échelle, en raison de leur croissance rapide et de la simplicité de leur cycle de vie pour la génération de nouvelles enzymes recombinantes avec des propriétés intéressantes (Gupta et al., 2002)(Razzaq et al., 2019). Les protéases microbiennes qui sont sécrétées par les bactéries, les champignons et les levures représentent les 2/3 des protéases commercialisés et jouent un rôle capital dans le secteur des détergents, l'industrie du cuir et l'industrie agricole et pharmaceutique.

Une large proportion des protéases commerciales disponibles, essentiellement les protéases neutres et alcalines sont d'origine bactérienne et particulièrement des souches du genre *Bacillus* (Tian, Xu et al 2019) et des *Actinobactéries* (L. Wang et al., 2019).

## 1.4 Différentes classes des enzymes protéolytiques

- Peptidases à sérine
- Peptidases à cystéine
- Peptidases à aspartate
- Peptidases à métal
- Peptidases à thréonine
- Peptidases à glutamate

## 2 KÉRATINASES

### 2.1 Généralités sur des kératinases

Les kératinases ou enzymes kératinolytiques sont des enzymes protéolytiques ayant une large spécificité de substrats. Elles possèdent la capacité d'hydrolyser les protéines solubles (la caséine, la gélatine, l'albumine de sérum bovine et l'hémoglobine) et insolubles (les plumes, la laine, la soie, le collagène, l'élastine, les cornes, les cheveux et les ongles...) (Razzaq et al., 2019).

La majorité des kératinases étudiées appartiennent à la classe des protéases à sérine (Alba et al., 2019) (Bhari et al., 2019). Les métallo-kératinases (Nnolim et al., 2020) et les kératinases à thiol ont été aussi décrites (Ignatova et al., 1999). Cependant, aucune kératinase acide n'a été identifiée. La comparaison des kératinases avec d'autres protéases indique qu'elles appartiennent au groupe des subtilisines vue qu'elles sont de types sérine ou métallo-protéases et leur optimum d'activité est obtenu à pH neutre ou alcalin. En plus, la comparaison de leurs séquences N-terminale indique qu'elles possèdent une homologie de 98% avec les subtilisines.

Ces enzymes kératinolytique attaquent principalement les ponts disulfures du substrat non soluble par clivage de ces derniers ce qui permet l'attaque des protéases extracellulaires et donne en définitive une accumulation de sulfocysteine, l'excès de soufre est oxydé en sulfite et en sulfate ou en thiosulfate qui se concentre dans le milieu réactionnel (Anbu et al., 2007; Pillai & Archana, 2008; Razzaq et al., 2019) .

Des études utilisant des substrats synthétiques ont montré que ces enzymes ont tendance à hydrolyser les liaisons peptidique au niveau de lamine des acides aminés aromatiques et hydrophobes (Venter et al., 1999).

## 2.2 Les kératinases des micro-organismes

Les enzymes kératinolytique sont très répandues dans la nature et sont produites par un ensemble de micro-organismes qui se développent sous différentes conditions écologiques et environnementales, et ils montrent une grande capacité à dégrader les substrats kératiniques. Ces enzymes sont principalement sécrétées par une diversité de champignons, parasites pathogènes, dermatophytes et saprophytes tel que : *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trametes cingulate*, *Aspergillus oryzae* et *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus sp* (Anbu et al., 2007; Omrane Benmrad et al., 2016; Farag et Hassan., 2004 )(Preczeski et al., 2020) et par des *Actinobactéries* tel que le genre *Streptomyces* comme: *Streptomyces gulbergensis*, *Streptomyces albidoflavus* (Azeredo et al., 2006; Bressollier et al., 1999), le genre *Bacillus* qui est le plus étudié avec comme exemple: *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* ( Abdel-Naby et al., 2016; Sanghvi et al., 2014), et le genre *Actinomadura* qui reste l'un des moins étudiés avec *Actinomadura keratinilytica* (Habbeche et al., 2014) et *Actinomadura viridilutea* (Ben Elhouli et al 2016).

Les kératinases bactériennes sont d'un intérêt particulier en raison de leur action sur un large éventail de substrats protéiques et tout particulièrement les kératines sur lesquelles elles agissent avec un niveau d'activité très élevé (Pissuwan & Suntornsuk, 2001). L'activité kératinolytique des enzymes libérées par les micro-organismes dépendent de la nature de la souche utilisée, les propriétés du milieu de production et le mode de sécrétion.

Quelques exemples de travaux de recherches sur des champignons et des bactéries productrices de kératinases ayant une activité kératinolytique et des propriétés physico-chimiques importantes sont représentés sur le **Tableau 1**.

**Tableau 1** : Diversité des micro-organismes kératinolytiques et propriétés biochimiques de leurs kératinases.

Microorganisme	Classification	MM (kDa)	pH opt.	T° opt. (°C)	Références
<b>Champignons :</b>					
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Sérine-kératinase	-	75	30	(Anbu et al., 2007)
<i>Trametes cingulata</i> CTM10101	Sérine-kératinase	31	9	60	(Omrane Benmrad et al., 2016)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Sérine-kératinase	36	7	50	(Anitha et Palanivelu, 2013)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Métallo-kératinase	60	8	50	(Frag et Hassan, 2004)
<b>Bactéries :</b>					
<i>Streptomyces</i> sp. AB1	Sérine Kératinase	29	11,5	60	(Jaouadi et al., 2010)
<i>Streptomyces</i> sp. 594	Sérine Kératinase	-	6	55	(De Azeredo et al., 2006)
<i>Streptomyces ulbargensis</i>	Métallo-kératinase	46	9	45	(Syed et al., 2009)
<i>Streptomyces</i> .sp 16	Sérine Kératinase	25	9	50	(Xie et al. 2010)
<i>A. keratinilytica</i> sp. Ctp29	Sérine Kératinase	29	10	70	(Habbeche et al., 2014)
<i>B. pumilus</i> FH9	Métallo-Kératinase	51	9	60	(Abdel-Nabyet al., 2016)
<i>B. subtilis</i> DP1	Sérine Kératinase	97,4	10	-	(Sanghvi et al., 2016)
<i>B. tequilensis</i> Q7	Sérine Kératinase	28	7	37	(Zarai Jaouadi et al., 2015)

### 2.3 Physiologie de la production des kératinases

Les kératinases microbiennes, produites en présence d'un substrat kératinique, sont majoritairement extracellulaires et inductibles (Babalola et al., 2020). Toutefois, une minorité sont membranaires (Nam et al., 2002; Riessen & Antranikian, 2001). La majorité des travaux montrent que la fraction intracellulaire contient une activité disulfure réductase qui agit en synergie avec les kératinases extracellulaires pour dégrader la kératine par réduction des ponts disulfures. Donc, la kératinolyse se fait en deux étapes ; une étape de sulfitoxydation ou de réduction des ponts disulfures suivi d'une protéolyse. L'étape de la sulfitoxydation est effectuée soit en présence d'agents réducteurs (tels que sulfate de sodium, dithiothreitol (DTT) et mercaptoéthanol) (Singh et al., 2014) ou en présence de disulfure réductase (Ramnani et al., 2005). La coopération de l'un de ces actes avec l'activité kératinolytique permet d'aboutir à une dégradation complète de la kératine. Cependant, la chronologie de ces événements et leurs natures exactes ne sont pas encore bien élucidées. Les kératinases sont largement produites sur milieu contenant un substrat kératinique comme seule source de carbone et d'azote (Jagadeesan et al., 2020; Szabo et al., 2000).

### 2.4 Propriétés physicochimiques des kératinases

Les kératinases ont une masse moléculaire allant de 18 à 315 kDa (Cai et al., 2008). La kératinase la plus petite de taille (18 kDa) est produite par *S. albidoflavus* K1-02 (Genin, 1999), et la plus grande de taille (315 kDa) est produite par *Microsporium canis* (Mignon et al., 1998). L'activité kératinolytique peut être inhibée par un certain nombre d'agents tel que PMSF et l'EDTA (Gradišar et al 2005). Par contre les ions métalliques comme le calcium et le zinc stabilisent l'activité enzymatique à des températures très élevées (Giongo et al 2007) (Hassan et al., 2020). Ces enzymes ne sont pas glycosylées et sont généralement actives à des pH neutres et alcalins.

Les connaissances sur les protéases thermostables sont très peu approfondies et leurs modes de fonctionnement peu connus en comparaison par des protéases alcalines conventionnelles (Mathieu D., 2005). Les kératinases thermostables (les enzymes thermostables en général) trouvent facilement leur place dans le monde industriel des enzymes en raison de leur grande activité et stabilité (Lateef et al 2015). Depuis quelques années, la découverte de nouvelles protéases thermostables s'est produite par l'isolement de microorganismes étant eux-mêmes résistants à des hautes températures, ces microorganismes thermophiles préfèrent des températures élevées pour leur croissance et ont donc besoin d'enzymes thermostables pour effectuer les réactions nécessaires (Mathieu D., 2005). La

température optimale d'activité des kératinases s'étend de 30 à 80 °C, de plus les kératinases de *Chyso sporium keratinophilum* et *Fervidobacterium islandicum* A W-1 présentent respectivement des températures optimales exceptionnelles de 90 et 100 °C (Nam et al., 2002). Une haute thermostabilité (90min à 100 °C) a été mentionnée pour la kératinase produite par *F.islandicum* A W-1(Nam et al., 2002).

Les kératinases sécrétées par les Actinomycètes présentent un maximum d'activité à un large éventail de pH compris entre 7 à 12 et résistent à des températures très élevées allant de 55 à 90 °C tel que, la kératinase produite par *Thermoanaerobacter keratinophilus* qui présente une stabilité pendant 6h à 80 °C. Il est indiqué aussi que la stabilité thermique de ces enzymes augmente en présence de calcium (Abidi et al 2011; T. Anitha & P. Palanivelu, 2013; Gessesse, et al.,2003).

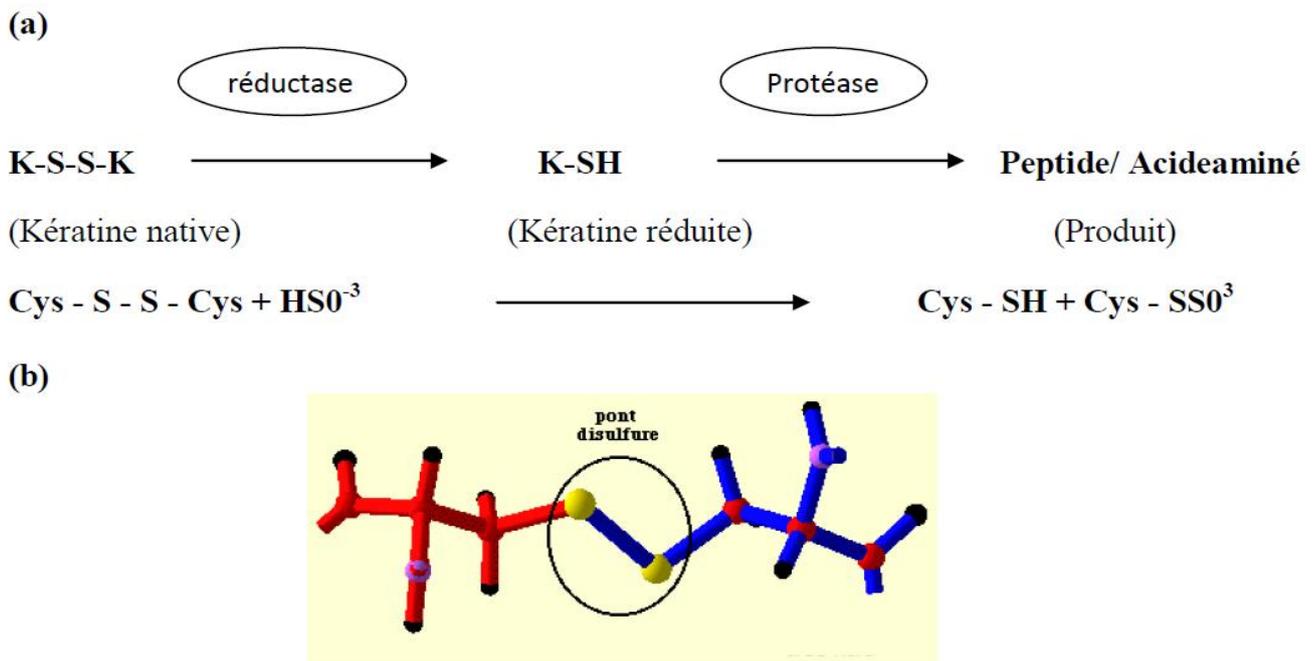
## 2.5 Etude des relations structure-fonctions des kératinases

La séquence primaire de certaines kératinases a été déterminée ou déduite à partir de leurs gènes codants. Cette information permet de comparer les kératinases avec d'autres protéases précédemment décrites. Par exemple, le gène codant pour la kératinase produite par *B. licheniformis* PWD-1, nommé kerA, présente une similarité et une homologie élevée avec la subtilisine Carlsberg et la séquence d'acides aminés déduite diffère par cinq acides aminés seulement (Lin et al.,1992). D'autres études ont également révélé que la séquence déduite de kerA est similaire à celle de la subtilisine Carlsberg (NCIMB6816), NCIMB10689 et ATCC12759, à l'exception d'une arginine à la place de la lysine en position 144 et une valine au lieu d'alanine à la position 222 (Moulder et al.,1949). Etant donné que les résidus Val222 et Ser220 sont très proches au niveau du site catalytique, ce changement peut être lié à l'amélioration de l'hydrolyse de kératine. Par ailleurs, et plus récemment (Liu et al., 2013) ont introduit par mutagenèse dirigée quatre mutations (N122Y, N217S, A193P et N160C) au niveau du gène codant pour la kératinase de *B. licheniformis* BBE11-1 dans le but d'améliorer sa thermostabilité. Les gènes mutés ainsi générés ont été exprimés dans *B. subtilis* WB600. Cette étude a révélé que le quadruple mutant montre un effet synergique ou additif avec une augmentation de 8,6 fois de la demivie à 60 ° C. Quant au simple mutant N122Y, il aboutit à lui seul à une augmentation de 5,6 fois de l'efficacité catalytique en comparaison avec la kératinase sauvage.

## Mode d'action

Ces enzymes kératinolytiques attaquent principalement les ponts disulfures du substrat non soluble par clivage de ces derniers ce qui permet l'attaque des protéases extracellulaires et donne une accumulation de sulfocysteine, l'excès de soufre est oxydé en sulfite et en sulfate ou en thiosulfate qui se concentre dans le milieu réactionnel (Suh et lee ,2001

) (Fig.02). Des études utilisant des substrats synthétiques ont montré que ces enzymes ont tendance à hydrolyser les liaisons peptidiques au niveau de lamine des acides aminés aromatiques et hydrophobes (Venter *et al.*,1999).



**Figure 2:** (a) Schéma représentant le mode d'action des kératinases sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures, (b) Représentation schématique des ponts disulfures entre les résidus de cystéines.

### 3 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 (Untereiner *et al.*, 2004; Werlang & Brandelli, 2005). Les kératines sont regroupées en kératines dures (plumes, poils sabot et ongles) et en kératines molles (peau et cals) en fonction de leur teneur en soufre. Elles sont connues pour leur grande stabilité, insolubilité et leur

résistance à la lyse protéolytique d'où leurs fonctions mécanique et protectrice (Gousterova et al., 2005; Vanhoutteghem et al., 2004).

### 3.1 Structure des kératines

Du point de vue structural, la kératine est fibreuse et elle est classée parmi les scléroprotéines, c'est-à-dire des protéines insolubles dans l'eau froide, même en présence de sels, d'acides ou de bases diluées. Elle s'enroule autour d'autres molécules de kératines pour former des filaments intermédiaires (Lingham-Soliar, 2014). En outre, sa structure filamenteuse est stabilisée par le haut degré de réticulation des ponts disulfures, et des interactions hydrophobes (Bragulla & Homberger, 2009). D'un tissu à l'autre, les séquences primaires des kératines varient en particulier du nombre de résidus cystéines et en conséquence du nombre de pontages possible, ainsi, leur augmentation conduit à la formation de tissus durs et coriaces tels que les ongles, les sabots des animaux et les carapaces des tortues (Scott & Untereiner, 2004). Les kératines sont classées en tant que protéines hétérogènes en raison de leur structure en acides aminés et leur composition hétérogène. Elles sont caractérisées par une teneur élevée en glycine, proline, sérine et d'autres acides aminés, et une faible teneur en lysine, histidine et méthionine, ainsi que l'absence de tryptophane (Kanso et al., 2009). En raison de leurs structures extrêmement rigides, les kératines résistent à l'attaque physico-chimiques des facteurs environnementaux, elles sont insolubles dans l'eau, les acides faibles, les milieux alcalins et les solvants organiques. En outre, ces protéines fibreuses sont non dégradables par les enzymes protéolytiques, tels que la trypsine, la pepsine et la papaïne (Schor & Krimm, 1961). De plus, elles sont très extensibles et élastiques, cela en raison de l'entrelacement des hélices et de la souplesse des liaisons faibles entre les micros fibrilles (Scott & Untereiner, 2004).

### 3.2 Classification des kératines

Les kératines sont des protéines dont les chaînes se présentent en hélice- $\alpha$  ( $\alpha$ -kératine) ou en feuillet- $\beta$  ( $\beta$ -kératine), qui se replient en forme tridimensionnelle.

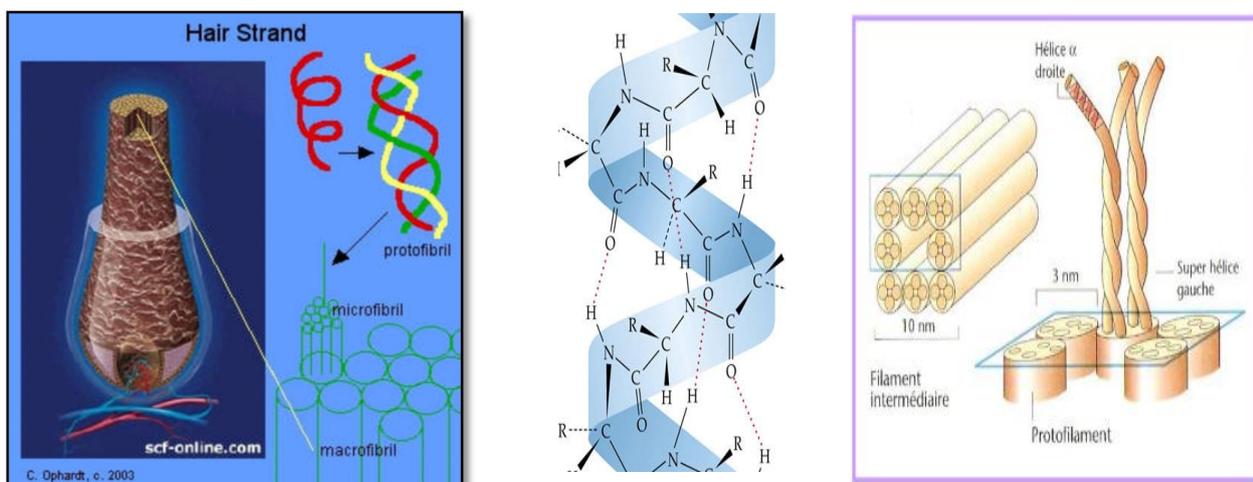
- **$\alpha$ -kératine**

L' $\alpha$ -kératine, ou cytokératine, est une large famille multi-génique qui présente un rôle structural important dans les épithéliums des mammifères. Elle a une structure hélicoïdale simple, de longs segments de 311-314 acides aminés en hélice  $\alpha$  entourées d'extrémités N- et C-terminales non hélicoïdales forment un pas à droite (Figure 3) (Jaouadi et al., 2010; Kornilowicz-Kowalska & Bohacz, 2011). La résistance de cette protéine est amplifiée par

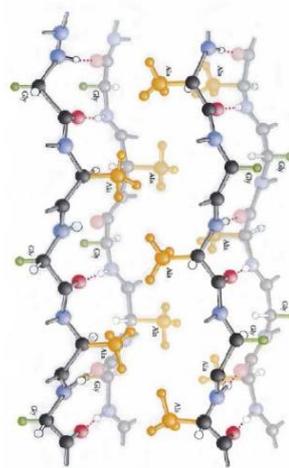
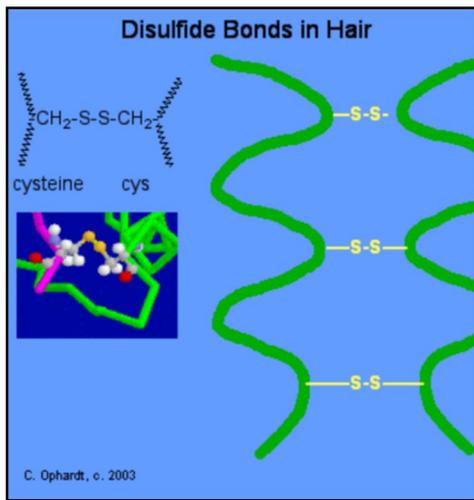
l'enroulement de multiples brins hélicoïdaux en une super-hélice appelée protofibrille. L'enroulement hélicoïdal des super-enroulements possède un pas à gauche dans un sens opposé à celui de l'enroulement des hélices polypeptidiques individuelles. Cette conformation permet le tassement le plus serré possible des multiples chaînes polypeptidiques. La résistance de ces fibres est augmentée par la richesse en résidus hydrophobes (Phénylalanine, leucine, Valine, Méthionine et Alanine) et par des liaisons covalentes entre les chaînes polypeptidiques. La résistance de la kératine  $\alpha$  à la plus part des protéases est due essentiellement à la présence d'un taux élevé d'acides aminés à base de soufre, principalement la cystéine, qui forment des ponts disulfures entre les molécules, conférant sa rigidité à l'ensemble (exemple: la chevelure humaine est constituée de 14% cystéine)(Marchisio & Fusconi, 2001).

- **$\beta$ -kératine**

La  $\beta$ -kératine, est un énantiomère de l' $\alpha$ -kératine présente chez les reptiles et les oiseaux, c'est le constituant majeur de la fibroïne de la soie et la toile d'araignée, elle est plus flexible et plus molle que la kératine  $\alpha$  du faite de sa richesse en résidus de Glycine et d'Alanine. L'organisation structurale de cette forme de kératine est dans une conformation  $\beta$  et le squelette de la chaîne polypeptidique s'étend-en zigzag (**Figure 4**) (Jaouadi et al., 2010). Dans la fibroïne, par exemple, les chaînes polypeptidiques en zigzag sont disposées côte à côte pour former une structure qui ressemble à une série de plis (appelée feuillet  $\beta$  plissé). Des liaisons hydrogènes peuvent être soit intra- ou inter-chaînes entre les liaisons peptidiques de chaînes polypeptidiques adjacentes (Laurent et al., 2014).



**Figure 3:** Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure primaire de l' $\alpha$ -kératine de la chevelure humaine (Korniłowicz-Kowalska & Bohacz, 2011 ; Jaouadi et al., 2010 )



**Figure 4:** Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure secondaire de la  $\beta$ -kératine et des ponts disulfures (S-S) de la chevelure humaine (Rouse & Van Dyke, 2010)

### 3.3 Sources des kératines

La kératine est une protéine insoluble, synthétisée et utilisée par de nombreux êtres vivants comme élément de structure, elle se trouve chez tous les vertébrés supérieurs comme le principal constituant de la couche cornée (couche la plus superficielle de l'épiderme constituée de cellules morte) de certains animaux, notamment les mammifères ce qui leurs garantit une peau imperméable; elle représente jusqu'à 85% des protéines cellulaires tel que les cheveux, les cornes, les ongles, et les plumes (Bragulla & Homberger, 2009; Marchisio et al., 2000).

Les plumes d'oiseaux terrestres sont composées d'une partie protéique (kératine) qui présente presque 90% des plumes et d'une partie non protéique qui inclut des pigments, des minéraux, des polysaccharides, des nucléotides, de l'acide urique, du glucose et du ribose (Gross, 1956). Ces déchets kératiniques présentent une source très riche en protéine et en particulier en acides aminés essentiels (**Tableau 2**).

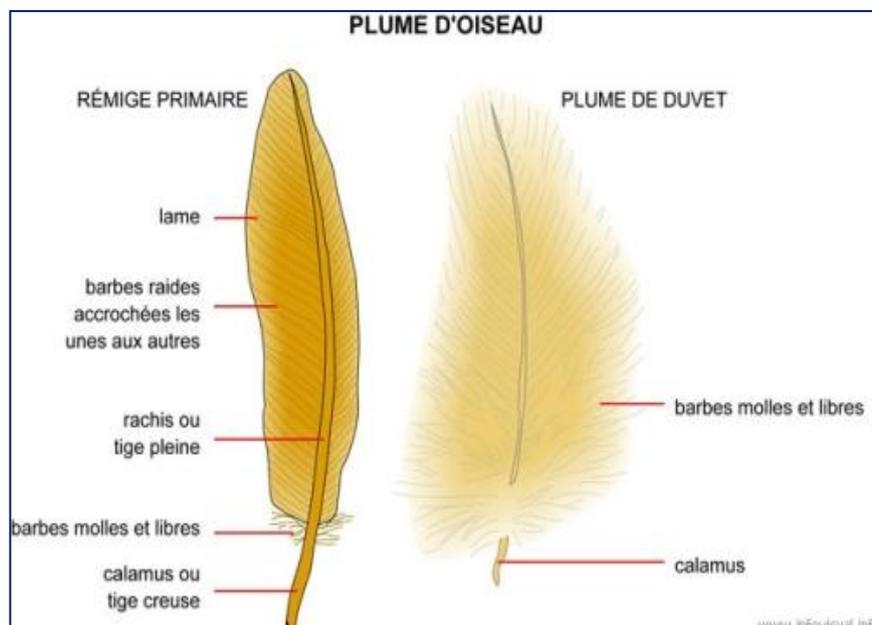
La plume est composée d'un axe central nommé le rachis, creux à sa base et plein dans sa partie principale. Le rachis porte des barbes, insérées en deux séries de part et d'autre de l'axe dans un seul plan et enchevêtrées par des barbules perpendiculaires, qui ne peuvent pas être observées à l'œil nu. Ces barbules sont accrochées les unes aux autres grâce à des crochets (Brandelli et al., 2015). Les barbules se tiennent ensemble comme une fermeture éclair grâce à ces crochets (**Figure 5**).

Concernant les sources de plumes on distingue principalement :

- 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.
- 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.

**Tableau 2:** Concentration des acides aminés en gramme par Kg de plumes (Onifade et al., 1998)

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



**Figure 5:** Schéma de la structure d'une plume  
 ([http://fr.maieutapedia.org/wiki/Image:structure\\_plume\\_oiseau](http://fr.maieutapedia.org/wiki/Image:structure_plume_oiseau))

### 3.4 Valorisation des déchets de plumes

Les plumes sont considérées comme des sous-produits animaux de catégorie 3 vu qu'elles ne présentent pas de signes d'une maladie transmissible à l'homme ou à l'animal. Depuis 2003, le règlement européen CE 1774/2002 autorise et encourage la valorisation de ces sous-produits qui présentent une source de pollution et influencent profondément l'environnement (Andersen et al.,1998).

Annuellement, plus de 5 million de tonnes de plumes sont produits chaque année par l'industrie de la volaille a travers le monde et on estime que plus de 50 milles tonne sont produits localement (un poulet vivant de 2 kg produit 180g de plumes) (Freeman et al., 2009). Ces sous-produits peuvent donc, être valorisés par différentes voies et utilisés dans le compostage et l'alimentation animale. Ils sont utilisés aussi dans la fabrication de farine de plumes utilisée dans les milieux de cultures de plusieurs microorganismes capables de produire différents métabolites (kératinases,  $\alpha$ -amylase et d'autres). La proportion de la kératine présente au niveau des plumes et sa richesse en acides aminés justifie également leur utilisation comme matière pour la récupération des acides aminés et surtout la cystéine.

## 4 LES ACTINOMYCÈTES

### 4.1 Caractéristiques principales des Actinomycètes

Les Actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, ramifiées, Gram positive (Nanjwade et al., 2010). La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable, elle va de formes peu évoluées comme *Mycobacterium*, à des formes très évoluées comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant (Smaoui., 2010). Les Actinomycètes ont longtemps été considéré comme des champignons primitifs, du fait de leur mycélium, souvent à la fois aérien et pénétrant dans le substrat nutritif, du fait également de la fructification par sporanges libérant des spores chez nombre d'entre eux (Haslay & Leclerc, 1993; Ludwig, 2012).

Leurs propriétés chimiques, physiologiques, et immunologiques les rangent parmi les procaryotes. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives), et leur cytologie est celle des bactéries (Belferkh., 2016). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (leur parasitage par des bactériophages, leur sensibilité aux antibiotiques antibactériens) ne permet pas de les classer parmi les mycètes (Haslay & Leclerc, 1993).

### 4.2 Le genre *Actinomadura*

#### 4.2.1 Historique, classification et habitat

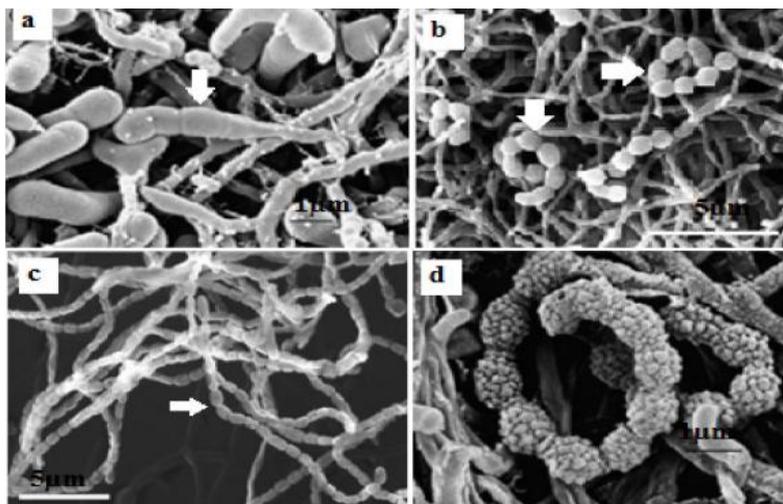
Selon Goodfellow (1989) la première apparition du genre *Actinomadura* a eu lieu en 1894, lorsque Vincent a isolé et décrit l'agent causatif de la maladie du pied à Madura, et il lui a proposé le nom *Streptothrix madurae*. Cette proposition n'a pas été retenue et la souche a été classée dans le genre *Nocardia* puis dans le genre *Streptomyces*. Avec l'introduction de l'analyse de la paroi cellulaire par (Lechevalier & Lechevalier, 1970), il a été réalisé que la souche diffère des membres du genre *Streptomyces* et le genre *Actinomadura* est ainsi établi. Ce genre comprend les actinomycètes, qui leur paroi contient l'isomère méso de l'acide diaminopimélique et qui ne présente pas de sucres caractéristiques. L'utilisation de la taxonomie polyphasique et surtout le séquençage de l'ADNr 16S a éclairci la taxonomie de ce genre et elle a été corrigée par (Le Roes & Meyers, 2007; S.-H. Lee et al., 2010; Zhang et al., 2006;). Le genre *Actinomadura* appartient à la famille des Thermomonosporaceae, dans l'ordre des Streptosporangiales (Lu et al., 2003; Lee & Jeong, 2006; Ara et al., 2008; Puhl & Selinger, 2009). Les espèces du genre *Actinomadura* sont isolées de sols désertiques, cultivables et de montagnes, le sol représente leur premier réservoir (Cook et al., 2005; Isik et

al., 2014; Lee, 2012; Wink et al., 2003; Yassin et al., 2010). Il a été aussi isolé de la surface d'une pierre (Lee & Lee, 2010), de sédiments (He et al., 2012; Le Roes & Meyers, 2007), de composts (Puhl et al., 2009), de feuilles de plantes (Qin et al., 2009), de ruche de miel d'abeilles (Promnuan et al., 2011), et de compost de poulet (Habbeche et al., 2014).

#### 4.2.2 Macromorphologie et micromorphologie

La surface des colonies (mycélium aérien) peut être blanche, jaune, blanc jaunâtre, jaune grisâtre, rose pâle, rose jaunâtre, vert bleuâtre ou gris ; le dos de la colonie (mycélium de substrat) peut être crème, jaune claire, jaune, jaune orange, jaune brunâtre, jaune grisâtre, gris, brun, pourpre noirâtre, rouge ou brun rougeâtre. Les pigments diffusibles peuvent être aussi présents, ils sont de couleur sombre, bronze ou bleu pâle (Lu et al., 2003 ; Lee et Geong, 2006 ; Wang et al., 2007 ; Ara et al., 2008; Qin et al., 2009; Yassin et al., 2010).

Les espèces du genre *Actinomadura* sont aérobies, non acido-alcool-résistantes, non mobiles qui produisent un mycélium de substrat bien développé et non fragmenté et un mycélium aérien sur lequel se forme des chaînes d'arthrospores courtes (de 2 à 8 spores par chaîne seulement) ou longues (de 10 jusqu'à 50 par chaîne), et elles peuvent être droites, incurvées (sous forme de boucle ouverte), ou en spires irrégulières (une à deux tours) 27 (**figure 6**). Les spores sont de formes rondes ou en bâtonnets, leurs parois sont lisses, épineuses ou verruqueuses. (Lu et al., 2003 ; Lee et Jeong, 2006; Wang et al., 2007; Ara et al., 2008; Puhl et al., 2009).



**Figure 6** : Photographies par microscope électronique du mycélium aérien de quelques espèces d'*Actinomadura* a: courte chaîne de 3 spores de *A. catellatipora* 80-60T (Lu et al., 2003), b: spire irrégulière avec 8 spores de *A. chokoriensis* 3-45-a(11)T (Ara et al., 2008), c: chaîne droite de 15 spores de *A. flavalba* YIM 61435T (Qin et al., 2009), d: chaîne incurvée de 10 spores avec paroi verruqueuse de *A. glauciflava* 3.24T (Lu et al., 2003)

#### 4.2.3 Chimiotaxonomie, physiologie et activité

Les *Actinomadura* possèdent une paroi cellulaire contenant l'isomère méso de l'acide diaminopimélique et le madurose comme sucre caractéristique, le ribose, le xylose, le galactose, le glucose et le mannose peuvent être aussi présents (Lu et al., 2003 ; Wang et al., 2007 ; Ara et al., 2008 ; Qin et al., 2009 b ; Puhl et al. 2009). L'intervalle de température de croissance des espèces du genre *Actinomadura* est entre 15 à 45 °C, il y a des espèces qui sont thermotolérantes, elles peuvent croître jusqu'à 60 °C ; le pH de croissance est entre 5 et 9 ; les concentrations de NaCl tolérées sont de 2 à 10% (Wang et al., 2007 ; Ara et al., 2008 ; Qin et al., 2009 ; Puhl et al. 2009 ; Tseng et al., 2009). Le genre *Actinomadura* produit des molécules d'antibiotiques appartenant aux familles de polyéther, d'anthracycline et de macrolactame.

### 4.3 Production de peptidases par les Actinomycètes

Parmi la classe Actinobacteria, les activités protéolytiques et kératinolytiques ont été bien étudiées chez de nombreuses espèces du genre *Streptomyces* qui présente le genre le plus utilisé pour la production des peptidases microbiennes après les champignons (Belhoul et al., 2015; Jain et al., 2016; Jaouadi et al., 2010). Ces activités ont été signalées aussi chez d'autres espèces appartenant au genre *Saccharomonospora*, *Amycolatopsis*, *Terrabacter* et *Actinomadura*.

Le genre *Actinomadura* est l'un des genres d'Actinomycètes les plus rares, et qui sont largement distribués dans le sol et le compost. Actuellement les travaux de recherches s'orientent vers l'isolement et l'identification de nouvelles souches de ce genre. Par ailleurs les études sur la production et la caractérisation de peptidases secrétées par ce genre sont très limitées et la capacité des souches d'*Actinomadura* à dégrader la kératine, n'a pas été largement diffusée (Belhoul et al., 2016; Habbeche et al., 2014).

## 5 APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES PEPTIDASES

Les protéases alcalines bactériennes et celles à activité kératinolytique sont des enzymes réputées pour leur robustesse et pour leur aptitude à être utilisées dans l'industrie du détergent, dans la tannerie pour le traitement du cuir, dans la préparation d'hydrolysats protéiques, pour l'industrie pharmaceutique et alimentaire et les industries chimiques de même que pour le traitement des déchets. Ces enzymes contribuent au développement de produits à hautes valeurs ajoutées en exploitant leur activité de digestion partielle. Les domaines utilisant couramment les protéases dans leurs procédés sont :

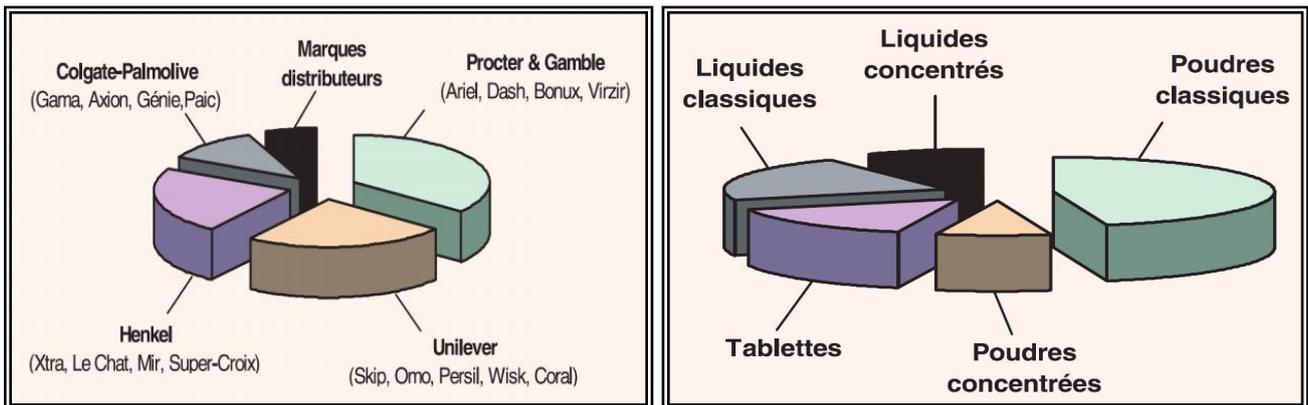
### 5.1 Détergence

Les enzymes de type protéases sont utilisées dans l'industrie des détergents comme agents nettoyants. Les taches sur les vêtements peuvent être différentes au point de vue de plusieurs caractéristiques. En effet, les taches sont souvent composées de terre, d'huile, de lipides, de particules ou de matières organiques. La majorité de ces composés peut être lessivée par le nettoyage de base, c'est-à-dire, la chaleur de l'eau, l'alcalinité, l'agitation ou bien les agents surfactants. Par contre, certaines protéines de la matière organique peuvent se lier très fortement aux fibres du tissu qui peuvent être impossibles à détacher. C'est là que les enzymes protéolytiques entrent en jeu. Elles peuvent briser les liens entre le tissu et les taches à base de protéines, à titre d'exemple nous citons la kératinase thermostable secrétée par *Bacillus sp.* NKSP-7 (Akram et al., 2020) qui permet aux matières organiques de se détacher des fibres du tissu et ainsi redonner une apparence propre (Nnolim et al., 2020).

Depuis 1998, les lessiviers se sont engagés à réaliser les efforts nécessaires pour réduire l'impact des constituants des lessives sur l'environnement en diminuant le volume de la dose unitaire du détergent tout en conservant son efficacité, à abaisser le taux des ingrédients organiques faiblement biodégradables et à réduire l'énergie nécessaire au lavage. Tous ces critères imposent aux fabricants de détergents une évolution permanente des formulations de lessive en incorporant de nouveaux ingrédients permettant d'éliminer les

taches plus efficacement, à plus basse température, tout en respectant au mieux le linge et l'environnement ( Nardello-Rataj et al., 2003; Stoner et al., 2004).

L'industrie des détergents représente le marché de masse par excellence (20 millions de tonnes/an mondial) et de haute technologie. Cette industrie des détergents est dominée par quatre sociétés multinationales (Nardello-Rataj et al., 2003; Reddy et al., 2017), à côté de quelques opérateurs locaux dont le marché reste national (Figure 7).



**Figure 7:** Parts du marché européen par société en 1998 et segmentation des différentes formes de lessives : liquides (classiques, concentrés), poudres (classiques, concentrées) et tablettes. D'après Nardello-Rataj, et al., (2003).

En raison du développement des lessives compactes et de l'abaissement des températures de lavage, les enzymes, d'origine bactérienne, sont actuellement utilisées et représentent très certainement les ingrédients de l'avenir essentiel pour la formulation des détergents. Elles sont efficaces à des taux extrêmement faibles et même à température modérée (20-40 °C) vis-à-vis de certaines taches difficiles à éliminer (Nardello-Rataj et al., 2003). En effet, l'utilisation des enzymes dans les produits détergents est l'un des clés du problème écologique résultant de l'utilisation excessive des détergents chimiques lesquels sont corrosifs, toxiques et non biodégradables entraînant ainsi la pollution de l'environnement (Kumar et al., 1998; Kumar & Takagi, 1999). Les enzymes détergentes peuvent être utilisées sous forme poudre, granules ou liquide. Bien que leur incorporation sous forme liquide soit pratique, les enzymes granulées se sont avérées plus stables au cours du stockage dans les formulations détergentes solides et liquides (Ghani, 2001).

## 5.2 Traitement du cuir

Le traitement du cuir comprend plusieurs étapes telles que le reverdissage, l'épilage, le confitage et le tannage (**Tableau 3**). L'industrie du cuir sert à transformer le cuir, produit dérivé des activités des abattoirs, en produits finis très variés. Cependant, elle constitue l'un des principaux problèmes de pollution industrielle, et l'évacuation des effluents riches en produits chimiques, en sulfure de sodium, en sels, en solvants et en chaux résultent principalement du processus de pré-tannage de traitement du cuir.

**Tableau 3** : Opérations de tannage et produits chimiques utilisés.

Opérations	Produits
Reverdissage	Chlorure de sodium
Epilage	Chaux + Sulfure de sodium
Pelanage	Chaux
Déchaulage	Sulfate ou chlorure d'ammonium
Confitage	Confit : Enzymatique
Picklage	Acide sulfurique + Chlorure de sodium
Tannage	Chrome
Basification	Bicarbonate
Teinture Nourriture	Colorant + Huile

Afin de pallier aux risques causés par les effluents de tannerie, l'utilisation d'enzymes comme une alternative viable à des produits chimiques a eu recours avec succès tout en résultant à l'amélioration de la qualité du cuir et à la réduction de la pollution environnementale. En plus de ses avantages pour l'environnement, le traitement enzymatique diminue les coûts et améliore la qualité du produit final qui devient plus résistant à la déchirure et présente une teinte plus uniforme. Dans la tannerie, le délainage enzymatique est utilisé depuis le début du siècle dernier et plusieurs souches microbiennes et diverses méthodes ont été suggérées (Meunier 1999). Les kératinases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés, et nécessite donc des protéases alcalines comme la kératinase produite par *Bacillus crolab* MTCC 5468 (Ammasi et al., 2020). Ce procédé biotechnologique, appliqué dans 30 à 50% de la fabrication

mondiale, est employé à grande échelle en Australie, en France et au Royaume-Uni. Le traitement enzymatique en tannerie a été préféré aux méthodes conventionnelles qui requièrent l'utilisation de produits chimiques polluants. Cette approche présente de nombreux autres avantages, notamment, le contrôle facile et rapide du processus avec réduction des pertes. Les protéases alcalines qui possèdent des activités élastolytiques et kératinolytiques sont très demandées dans ce type d'industrie (Gupta et al., 2002; Kanth et al., 2009a).

Actuellement les protéases utilisées à l'échelle industrielle, dans l'opération de confitage sont à titre d'exemples, le Koropon EG, l'Actase P7, l'Actase P10, l'Actase P7, le Enzymar SE12, le Rinod RN, la Pyrase et le Confit Pancréatique (Kumar et al., 2008; Kanth et al., 2009b). Aussi beaucoup d'autre protéases alcalines (Akram et al., 2020; Ammasi et al., 2020) montrent un bon potentiel pour remplacer les processus chimiques,

Ce traitement protéolytique permet de réduire la quantité de produits chimiques requise et donc la charge de polluants dans les effluents, et d'obtenir un produit plus propre et de meilleure qualité ; ainsi qu'un rendement supérieur par unité de surface. Avec ces enzymes, les poils ne sont pas dissous et peuvent donc être récupérés par filtration, d'où une réduction de la DBO et la DCO pour le traitement des déchets.

### 5.3 Alimentation animale

L'alimentation animale est l'une des applications des protéases dans l'industrie alimentaire. En effet, elles sont utilisées pour la dégradation de polymères constituant la matière végétale afin d'améliorer la digestibilité et la qualité nutritive de certaines substances alimentaires. Des essais effectués au Japon ont montré que les combinaisons d'enzymes produites par Novozymes et conçues pour dégrader les protéines et les fibres (Biofeed pro et Biofeed plus), améliorent de façon significative la digestibilité chez les porcelets : ce qui accroît nettement la production de la viande. De même, l'activité kératinolytique des protéases a également été exploitée pour la production de fourrages protéolytiques. En effet, (Syed et al., 2009; Demir et al., 2015) ont rapporté l'utilisation des protéases alcalines de *Streptomyces gulbargensis* et *Streptomyces sp. 2M21* dans l'hydrolyse de la kératine des plumes de volailles en vue de l'obtention d'un concentré protéique utilisable pour l'alimentation animale. De même (Bennur et al., 2015; Jain et al., 2016) ont rapporté l'utilisation de protéases alcalines de *Nocardopsis species* et *Streptomyces sampsonii GS 1322*, respectivement 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 *Actinomycètes* isolées et

identifiées par ( Jeong et al., 2010; Jaouadi et al., 2010; Habbeche et al., 2014) secrètent des kératinases capables de dégrader les plumes et de produire des protéines facilement digestibles.

#### **5.4 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 (Molina de Diego, 2011). En effet, (Fearheller et al., 1977) a 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.

#### **5.5 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 (2% par unité de masse). La gélatine, protéine fibreuse formée par des fibrilles de collagène raccourcies par chauffage intense, n'est pas dégradée par la plupart des protéases. Cependant, cette activité a été détectée pour les protéases kératinolytiques. 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. De fait que l'argent est lié à la gélatine, il est possible de procéder à une extraction de la couche protéique par des traitements protéolytiques. L'hydrolyse enzymatique de la gélatine permet non seulement l'extraction d'argent, mais aussi le recyclage de la base du film (Joshi & Satyanarayana, 2013; Masui et al., 2004).

#### **5.6 Traitement des rejets industriels**

Les protéases solubilisent les ordures de nature protéique et contribuent à la diminution de la demande biologique en oxygène (DBO) dans les systèmes aquatiques. C'est pourquoi, les protéases alcalines ont été récemment utilisées dans la gestion des ordures de diverses industries et activités ménagères.

Plusieurs chercheurs ont utilisé des protéases alcalines de microorganismes pour le traitement des déchets de volailles (plumes) qui représentent environ 5% de leur poids et qui représentent une source importante de protéines pour l'alimentation animale (Anbu et al., 2004; R. Jain & Jain, 2010; Moreira-Gasparin et al., 2009). L'utilisation des protéases kératinolytiques dans le traitement des déchets de volailles (Sangali & Brandelli, 2000) et comme agent de nettoyage des conduites bouchées a été rapportée (Forgacs et al., 2011). Aussi une préparation à base d'enzymes de *B. subtilis*, *B. amyloliquefasciens* et *Streptomyces sp.* a été commercialement utilisée pour le nettoyage des drains domestiques (Gupta et al., 2002).

## 5.7 Traitement de la soie

L'une des plus récentes exploitations des protéases concerne le traitement de la soie. Celle-ci est formée de deux types de fibres : les fibres de fibroïne (substance protéique blanche, douce et brillante) et les fibres de séricine (substance protéique raide et terne), ces dernières doivent être éliminées pour rendre la soie plus soyeuse (R. Gupta et al., 2002).

Les fibres de séricines représentent 25% de la soie brute, elles sont d'ordinaire éliminées par immersion des fibres dans l'eau chaude savonneuse et légèrement alcaline (Prasong et al., 2009). Ce processus étant généralement coûteux, une méthode alternative suggérant l'utilisation des préparations enzymatiques, telles que les protéases, a été mise au point. Le traitement enzymatique consiste à placer les fibres dans une solution contenant l'Alcalase de Novozymes à pH 8 et à une température de l'ordre de 55 à 60 °C (Guang & Phillips, 2009; Smith et al., 1966). 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 à balayage (MEB). Après 5 h 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 (Mandal & Kundu, 2010).

## 6 Notion d'optimisation de la Production d'enzymes par plan d'expériences.

Les plans d'expériences se définissent comme étant des méthodes mathématiques et statistiques permettant de modéliser et d'organiser au mieux des essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles (Goupy & Creighton, 2006).

Ces méthodes visent à établir et analyser les différentes interactions qui existent entre les facteurs étudiés et leurs sources de variation supposées. Un plan d'expérience consiste donc en la mise en œuvre organisée d'un ensemble d'unités expérimentales d'une manière à révéler les effets de différents traitements. L'objectif principal de la théorie des plans d'expériences est d'assurer la meilleure précision possible, avec un maximum d'information et un minimum d'essais sans sacrifier la qualité, après avoir fait varier simultanément les niveaux d'un ou plusieurs facteurs. (Goupy & Creighton, 2006). Actuellement, il existe de différents types de plans d'expériences :

- Les plans factoriels complets ou fractionnaires à 2 niveaux.
- Plans factoriel, plus à 2 niveaux.
- Les plans en blocs complets ou incomplets.
- Les plans de surface de réponse.
- Les plans de mélange.
- Les plans optimaux. (Tinsson, 2010)

Les plans d'expériences sont divisés en deux grandes catégories, selon leurs propriétés et leurs capacités à répondre à certaines problématiques particulières.

- Les plans pour estimer et comparer les effets des paramètres.
- Les plans pour régler les paramètres afin d'obtenir un optimum (Goupy, 2017)

## 6.1 Plan de Plackett Burman

Ce design consiste essentiellement en une fraction très spécifique d'un plan factoriel complet. Il permet d'évaluer les effets principaux sans le bruit introduit par des alias. Bien que ce design se base sur deux niveaux de chaque facteur, nous pouvons aussi introduire un certain nombre de points centraux. Situés au milieu de l'écart pour chacun des facteurs, ces points servent à évaluer le degré de non-linéarité que possède la surface de réponse en question (Plackett & Burman, 1946). L'analyse des résultats de ce plan permet d'isoler les variables les plus importantes avec effet significatif des facteurs sans effets significatifs. Ce type de plan expérimental ne permettant d'évaluer que l'importance des effets principaux, il est nécessaire de poursuivre l'étude à l'aide d'un plan expérimental plus élaboré.

## 6.2 Plans pour surfaces de réponses (response surface methodology (RSM))

Les plans d'expérience permettent de régler les paramètres pour atteindre un optimum entre les niveaux des facteurs étudiés (Goupy, 2017). Le principe de toutes les méthodes d'optimisation consiste à explorer cette surface de façon à localiser un éventuel extremum dans un domaine expérimental donné. Ces plans utilisent de modèles polynomiaux du second degré avec interaction d'ordre 2. (Goupy & Creighton, 2006). Il existe de nombreux types de plans permettant de construire des surfaces de réponse tels que : les plans composites centrés, plans de Doehlert et les plans Box-Behnken (Goupy, 2017).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Où Y= grandeur d'intérêt.

$X_i X_j$  : les variables.

$\beta_j, \beta_{ij}, \beta_{ii}, \beta_0$  : les coefficients de polynôme.

## 6.3 Plan Box-Wilson (central composite design (CCD))

Le plan CCD est l'un des plans d'expérience de conception de surface de réponse la plus couramment utilisée. Les conceptions CCD sont une conception factorielle ou fractionnaire avec des points centraux, qui permettent d'estimer la courbure, et peut être aussi utiliser une conception composite centrale pour :

- Comprendre ou cartographier une région d'une surface de réponse. Les équations de surface de réponse modélisent la manière dont les modifications des variables affectent une réponse d'intérêt.
- Trouver les niveaux de variables qui optimisent une réponse.

## 6.4 Plan Box-behnken (BBD)

En 1960, Box et Behnken ont proposé un plan facile à mettre en œuvre qui permet d'établir des modèles du second degré dans lesquelles chaque facteur prend trois niveaux (-1, 0 et +1). Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est construit sur un cube dont les points expérimentaux sont placés au milieu, ces arrêtes avec une répartition de tous les points expérimentaux à égale distance du centre de domaine d'étude. Les plans Box-Behnken à trois facteurs contient 15 points expérimentaux, dont 12 essais sont situés au milieu de chaque arrêtes de cube avec trois essais répétés au centre de domaine prennent des coordonnées (0, 0, 0) (Goupy & Creighton, 2006).

Nous rappelons que dans notre cas ces méthodes mathématiques sont appliquées à l'optimisation de la production de kératinases sur milieu liquide avec comme but d'augmenter le niveau de production de cette enzyme.

## ***MATÉRIEL ET MÉTHODES***

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

Ce travail de recherche a intégré trois laboratoires différents.

-Laboratoire de Biochimie et Microbiologie appliquées (Université Annaba) ;

-Laboratoire de Valorisation de la Biomasse et Production de Protéines chez les Eucaryotes (LVBPPE) au CBS (Centre de Biotechnologie de Sfax). Projet PNR (Algéro-Tunisien)

-Unité de purification des protéines au centre d'ingénierie de protéines de Liège (BELGIQUE).

## 1 Etude préliminaire

### 1.1 Souche utilisée

Dans ce travail de thèse pour la recherche, la production et la caractérisation de kératinases thermostables, le microorganisme utilisé est la souche d'actinomycète thermophile en l'occurrence *Actinomadura keratinilytica* Cpt20. Cette souche est isolée à partir du compost de poulet d'un échantillon récupéré au niveau de l'Unité de Chaire Engraissement poulet appartenant au Groupe Avicole de l'Est (G.A.E) et la Société des Abattoirs de l'Est (S.A.E) Algérien (Wilaya d'Annaba) GPS 36° 50' N 7° 56 E'. Le prélèvement de l'échantillon et l'isolement de cette souche sont effectués par Saoudi B et Taibi Z, (Taibi et al., 2012) au niveau de notre laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée, par contre, l'identification moléculaire (Gène ARNr 16 S) a été réalisée par Ladjama A (Taibi et al., 2012) au Laboratoire du Professeur Ali Gargouri au Centre de Biotechnologie de Sfax (Tunisie). Cette souche figure dans la base des données en ligne dans banque des gènes (Gene Banck) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sous le numéro d'accension (GQ205433). Par ailleurs cette souche a fait l'objet de divers travaux de recherches, à titre d'exemple, nous citons la production des pectinases (Saoudi et al, 2015) et les xylanases (Haberra et al, 2013).

### 1.2 Culture et Conservation de la souche

La souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 est cultivée sur milieu ISP2 (International Streptomyces Project Medium- 2) (Shirling & Speer, 1967). Les boîtes de Pétri gélosées et ensemencées sont incubées à 45 °C. La mise en culture est toujours effectuée à partir d'une pré-culture de cette souche elle-même initiée à partir d'une strie pure de cette souche. La pré-culture de la souche kératinolytique *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 sur milieu ISP<sub>2</sub> est effectuée dans un Erlenmeyer de 250 mL avec un volume de 25 mL. L'incubation se fait pendant 48 h à 45 °C sous une agitation de 180 rpm.

La culture de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 est réalisée dans des Erlenmeyers de 1000 mL avec un volume utile de 100 mL, la DO<sub>600</sub> initiale de la culture est de 0,1. L'incubation se fait pendant 7 jours à 45 °C et sous une agitation de 180 rpm.

Pour la conservation, les souches sont mises en culture dans un milieu liquide approprié. La suspension cellulaire est mélangée avec du glycérol stérile à 20%. Elle est répartie dans des Cryo tubes puis conservée à -80 °C.

### 1.3 Recherche de l'activité protéolytique et kératinolytique chez la souche Cpt20 sur milieu solide (Test semi-quantitatif)

Avant de produire les kératinases chez la souche d'Actinomycète thermophile Cpt20 (*Actinomadura keratinilytica* Cpt20) sur milieu liquide, nous avons dans un premier temps testé l'activité enzymatique protéolytique et kératinolytique sur milieu solide.

**Test d'activité protéolytique :** Pour la recherche de l'activité protéolytique, la souche d'Actinomycète thermophile Cpt20 est repiquée sur milieu solide gélose nutritive au lait (GNL) (**Annexe 1**) à pH≈8 de manière stérile par touches afin d'obtenir des colonies bien séparées. L'ensemble est incubé dans une étuve à 45°C pendant 24h ([Debananda et al, 2009](#)). Après incubation, un test simple d'activité est effectué et qui est basé sur l'observation des zones d'hydrolyses sous forme de halos translucides entourant la colonie. La mesure du rapport (diamètre des halos /diamètre de la colonie) permet d'évaluer le niveau d'activité. Ainsi, le signe ++++ correspond à un rapport supérieur à 4 et qui est en faveur d'une activité protéolytique très élevée ([Ben Elhoul et al., 2016](#))

**Test d'activité kératinolytique :** Afin de détecter l'activité kératinolytique, la souche d'Actinomycète thermophile Cpt20 est repiquée par touche au centre des boîtes de petri sur milieu solide à base de farine de plume (feather broth meal (FBM)) (**Annexe 1**) à une concentration de 20g/l. La farine de plume est préparée au préalable au niveau du laboratoire selon la méthode de ([Williams et al., 1990](#)) (**Annexe 1**). L'incubation se fait à pH≈8 et à 45°C pendant 4 jours. La recherche d'activité kératinolytique est basée sur l'apparition des halos translucides au tour de la colonie. Le rapport des halos /colonie supérieur à 4 correspond à la quantité de kératinases extracellulaires secrétés par cette souche. Ce test d'activité kératinolytique est essentiellement qualitatif.

## 1.4 Recherche de l'activité protéolytique et kératinolytique chez la souche Cpt20 sur milieu liquide (Test quantitatif)

**Test d'activité protéolytique :** Afin de rechercher l'activité protéolytique, la souche d'Actinomycète Cpt20 est cultivée sur milieu liquide à base de caséine à 2% (**Annexe 1**). Le pH de milieu est ajusté à 8 avant stérilisation et l'incubation se fait dans des Erlenmeyers stériles de 500mL contenant 100 mL de milieu de culture. Après ensemencement, l'incubation se fait dans un shaker thermostaté à 45°C sous agitation (180 rpm) pendant 4 jours.

Après 4 jours de culture sur milieu liquide à base de caséine, la culture est centrifugée à 10000g, puis filtrée sous vide sur membrane de 0,45 µm et l'activité protéolytique (caséinolytique) est recherchée selon la méthode suivante, dont le principe est basé sur la mesure de la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloro-acétique (TCA) ([Kembhavi et al.,1993](#)).

Mode opératoire

- Mélanger 0,5 mL d'une solution de caséine (10 g/l) dans le tampon Tris-HCl à 0,05 M à pH 8 et la température de 45 °C et ajouter 0,5 mL de la solution enzymatique (surnageant de culture de 4 jours) préalablement diluée. L'ensemble est incubé pour une durée de 15 minutes

- La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 0,5 mL de TCA à 200 g/l (le TCA précipite la caséine non hydrolysée).

- Le mélange réactionnel est refroidi à une température ambiante pendant 15 min. Par la suite, l'ensemble est centrifugé à 15000 rpm pour une durée de 15 min.

- Par la suite on mesure l'absorbance à 280 nm par rapport à un témoin où l'enzyme est dénaturé par la chaleur

Ainsi, l'unité d'activité caséinolytique (1UI) est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1µg de tyrosine/min/mL dans les 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<sub>280 nm</sub> de 0,0022. L'activité protéasique (UI/mL) est déduite à partir de l'équation ci-dessous :

<b>ACTIVITÉ (U/ML)</b>	=	$\frac{DO \times D \times d}{t \times 0,0022}$	<p>D : dilution de l'enzyme.</p> <p>d : dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel.</p> <p>t : temps de la réaction en minutes.</p>
----------------------------	---	--	--

**Test d'activité kératinolytique :**

**Test d'activité kératinolytique :** La détermination de l'activité kératinolytique est effectué selon la méthode de Riffel et Brandelli (2002).

Protocole :

- Le substrat utilisé est la kératine azure commerciale à 10g/l plus au moins solubilisée dans un tampon Tis-HCl à 100 mM à pH8.
- Mélanger 1 mL d'enzymes (surnageant de culture) à 1mL de substrat (kératine azure commerciale à 10g/l).
- Le mélange est incubé à 50 °C pour un temps de 30 min sous une agitation de 250 rpm.
- Par la suite la réaction est arrêtée dans un bain de glace pendant 5 min.
- Le milieu réactionnel est centrifugé à 10000 rpm pendant 20 min.
- Par la suite on mesure l'absorbance à 595 nm liée à de la dégradation de la kératine azure commerciale de couleur bleue qui vire vers une couleur ocre due à la libération du colorant azoïques dont le maximum d'absorption est situé à 595 nm. Le dosage se fait par rapport à un témoin où l'enzyme est dénaturé par la chaleur
- Ainsi, l'unité (1 U) d'activité kératinolytique est définie comme étant l'augmentation de la  $DO_{595}$  de 0,1 et l'activité est déduite selon l'équation suivante :

$UI = \frac{4 \times A_{440} \times n}{0.1 \times t}$	<p>n : le facteur de dilution          4 : le volume réactionnel final (mL)          t : temps de la réaction en minute.</p>
---	--

**1.5 Mesure de l'activité spécifique (AS)**

La détermination de l'activité spécifique correspond au rapport de l'activité de l'enzyme (UI) sur la concentration des protéines (mG) comme suite  $AS = UI/mG$  de protéine. L'intérêt du calcul de l'activité spécifique est de suivre les différentes étapes de purification de l'enzyme.

Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford (1976). Une solution mère utilisant l'Albumine Sérum Bovine (BSA) à 1mg/mL selon le kit (« Bio-Rad Protein Assay ») est d'abord utilisée pour préparer un courbe d'étalonnage. Ainsi, on mélange 200 µl de colorant, le bleu de Coomassie G250, à 800 µl d'une solution diluée de standard et l'absorbance est

mesurée à 595 nm contre un blanc. Le dosage de l'échantillon de protéine se fait rapport à la courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en mg/mL.

## 2 OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DES KÉRATINASES

La composition d'un milieu de culture optimal est un aspect très important dans le développement de procédés de fermentation. La méthode classique d'optimisation d'un milieu de production consiste à optimiser paramètre par paramètre, tout en gardant constant tous les autres. Cette méthode est longue et coûteuse à cause du nombre élevé de variables. En outre, elle ne parvient pas à déterminer l'effet combiné de différents facteurs (Khairu et al., 2015 et Mohagir et al., 2015). Les méthodes statistiques fournissent une autre méthode pour résoudre ces problèmes et optimiser un processus particulier avec un gain de temps et moins coûteuse. Dans la présente étude, le modèle Plackett-Burman (1946) est utilisée pour le screening des variables importantes qui affectent la production de KERA-71 ainsi que la détermination de leurs niveaux de signification. L'étude des effets de l'interaction entre les facteurs est réalisée par le plan composite centré (CCD) de Box et Wilson (Box et Wilson 1951) couplé à la méthodologie de surface de réponse (RSM). Le CCD et le RSM sont des outils efficaces et ont été largement utilisés dans l'optimisation du processus de fermentation où de nombreux facteurs et leurs interactions affectent la réponse souhaitée telle que la production de l'enzyme (Bennamoun et al, 2004 ; Djekrif et al, 2006 ; Zhang et al, 2013 ; Djekrif et al., 2014 et Vimal et al., 2015).

### 2.1 Sélection de la meilleure source d'azote et de carbone

Pour la production des protéases , le 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 (Ku, Tsai, & Pan, 2009).

Dans le but de trouver la meilleure source de carbone et d'azote pour la production de kératinase, un milieu initial non optimisé composé de : (10 g/l) sources de carbone ; (2 g/l) sources d'azote ; (2 g/l) CaCl<sub>2</sub> ; (1 g/l) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et (1 g/l) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à pH 8, a été testé. A partir de ce milieu nous avons alors entamé l'optimisation des différents composants.

Différentes sources de carbones naturelles ont été testées à concentration de 10 g/l au nombre de 10 (soie, farine de plumes, laine, ongles, plumes de poulet, cheveux, lait écrémé, caséine et son de blé). Ces substrats, pour certains, sont au préalable préparés (Annexe 01).

En ce qui concerne la source d'azote organique et inorganique, les composés utilisés dans cette expérimentation sont au nombre de 9 et qui sont : extrait de levure, peptone, tryptone, urée, farine de plumes,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et  $\text{NaNO}_2$  avec une concentration de 2g/l.

Les expériences ont été réalisées dans des flacons Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu liquide de production. Après la stérilisation, les flacons ont été inoculés et maintenus dans les conditions initiales de production.

## 2.2 Screening des facteurs significatifs

Les matrices de Plackett et Burman fournissent une méthode efficace pour sélectionner un grand nombre de variables et identifier les plus importantes. Ces plans permettent de mettre en évidence l'effet d'une multitude de facteurs ( $k$  = nombre de facteurs) à deux niveaux (**Tableau 5**) sur la production enzymatique étudiée avec un nombre d'expériences minimales  $N$  tel que  $N = k + 1$  (Zhang et al., 2013). Ce sont des matrices carrées établies à partir d'un générateur de base, la dernière ligne du plan d'expérience étant toujours au niveau inférieur (**Tableau 4**). Chaque ligne représente une expérience et chaque colonne représente une variable.

**Tableau 4** :Matrice de Plackett et Burman pour l'étude de 10 variables avec 11 expériences.

Essai	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	Activité Keratinase (U/mL) <sub>a</sub>
1	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	910
2	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	1253
3	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	3421
4	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	2407
5	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1684
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1747
7	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	2002
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1716
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	2298
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1710
11	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1045
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1955
13	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1086
14	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1003

Dans notre cas, la matrice est composée de 10 facteurs (11 combinaisons), soit étude de 10 facteurs qui sont : température d'incubation, temps d'incubation, pH, CaCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, FeSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, la solution d'oligo-éléments (CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 40 µg/l, KI 100 µg/l, FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 200 µg/l et MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O 400 µg/l) et Farine de plumes. Les différents niveaux de chaque variable sont consignés dans le tableau 5.

**Tableau 5** : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett et Burman.

Variables	code	Unités	Niveau	
			(-1)	(+1)
pH	X <sub>1</sub>	-	7	10
Temperature	X <sub>2</sub>	(°C)	30	50
Temps	X <sub>3</sub>	(d)	5	9
CFM	X <sub>4</sub>	(g/l)	5	30
YE	X <sub>5</sub>	(g/l)	0.5	3
NaCl	X <sub>6</sub>	(g/l)	0.1	1
FeSO <sub>4</sub>	X <sub>7</sub>	(g/l)	0.01	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	X <sub>8</sub>	(g/l)	0.25	1.75
CaCO <sub>3</sub>	X <sub>9</sub>	(g/l)	1	5
TES	X <sub>10</sub>	(% v/v)	1	5

Le traitement de la matrice est réalisé par Minitab 16 ; l'analyse statistique consiste à identifier les variables qui ont un effet significatif sur la production de KERA-71.

- L'effet de chaque variable est déterminé comme une différence entre la moyenne de réponses au niveau supérieur (+) et la moyenne des valeurs de réponses au niveau inférieur (-) (Vimal et al., 2015):

$$EA = R (+)/r - R (-)/r$$

EA est l'effet de la variable A, R (+) est la valeur de réponse observée au niveau R (+) et R (-) est la valeur de réponse au niveau (-). r est le nombre d'apparition du facteur au niveau (+) ou (-)

L'erreur expérimentale est définie comme la moyenne des effets des erreurs (Ed) :

$$VE = \sum(E_d)/n$$

VE est la variance des effets et n est le nombre des variables erreurs.

L'erreur standard SE est déterminée comme la racine carrée de la variance

$$SE \text{ eff} = \sqrt{VE}$$

- La signification de chaque facteur est déterminée par le test de Student :

$$T = E / SE \text{ eff}$$

E est l'effet et SE eff est l'erreur standard. Si le test t est significatif, l'effet est vraiment dû au changement du niveau de la variable et non pas au hasard ni aux erreurs expérimentales. Autrement dit, le changement de la variable du niveau (-) au niveau (+) entraîne un effet positif ou négatif sur la réponse. La probabilité minimale de signification est de 95%. Toutes les variables ayant une probabilité inférieure à 95% sont rejetées et considérées sans effet sur la réponse.

### 2.3 Optimisation des composants sélectionnés

Les niveaux de deux variables indépendantes :  $\text{CaCO}_3$  et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , sélectionnées par le plan de Plackett et Burman, sont optimisés par le plan composite centré (CCD) en combinaison avec la méthodologie de surface de réponse (RSM). Chaque facteur dans le plan est étudié à cinq niveaux (**Tableau 6**).

**Tableau 6** : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré.

Variables (g/l)	Symbol	-1,414	-1	0	+1	+1,414
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$X_8$	0.19	0.5	1.25	2	2.31
$\text{CaCO}_3$	$X_9$	0.17	1	3	5	5.81

Ce plan permet d'étudier chaque facteur à cinq niveaux. Un tel plan permet d'obtenir l'équation du deuxième degré et les dérivés par rapport à 0, permettant de déterminer les coordonnées codées des extremums qui seront ensuite transformées en valeurs réelles.

### 2.4 Test de validation

La validation du modèle est testée en utilisant les conditions de culture optimales : température (30 ° C), pH initial 7, temps (7 j), CFM (5 g / l), YE (0,5 g / l), NaCl (0,1 g / l),  $\text{FeSO}_4$  (0,01 g / l), TES (1%, v / v),  $\text{CaCO}_3$  (3 g / l) et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,25 g / l), en comparaison avec la réponse prédite généré par le modèle.

### 2.5 Analyse statistique et modélisation

Les données obtenues à partir de CCD sur la production de KERA-71 sont soumises à l'analyse de variance (ANOVA). Les résultats du CCD ont été utilisés pour s'adapter à un polynôme du second ordre de l'équation (1) qui représente le comportement d'un tel système de manière plus appropriée :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \dots \dots \dots (1)$$

Où Y représente la réponse,  $\beta_0$  est la réponse moyenne (constante),  $\beta_i$  est le coefficient linéaire,  $\beta_{ii}$  est le coefficient des carrés,  $\beta_{ij}$  est le coefficient d'interaction, et  $X_i X_j$  sont des variables indépendantes qui influencent la réponse. Le traitement statistique de la matrice est réalisé par le logiciel Minitab 16 pour le calcul des coefficients de régression, l'analyse de la variance (ANOVA), déterminer les valeurs de la probabilité de signification (p), le test de Fisher ainsi que les graphiques des isoréponses.

### 3 PURIFICATION DES KÉRATINASES

#### 3.1 Protocole de purification

Après l'optimisation de la production des Kératinases, nous nous sommes intéressés à la purification de ces Kératinases pour pouvoir d'une part les caractériser et d'autre part les utiliser dans des applications biotechnologiques. Le protocole de purification se fait selon les différentes étapes suivantes :

➤ **Culture et production des kératinases**

La production des kératinases obtenue par optimisation servira pour la purification d'enzymes. Ainsi, après une culture de 500 mL cultivée pendant 7 jours à 30 °C, les cellules sont éliminées par centrifugation à  $10,000 \times g$  pendant 30 min et à 4 °C. Chaque surnageant récupéré contenant l'activité protéolytique, est clarifié par filtration à travers une membrane de 0,45  $\mu m$  et gardé en vue de la purification selon la procédure convenable.

➤ **Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium**

La précipitation est une technique sélective utilisée pour purifier partiellement et concentrer les protéines solubles dans un surnageant. Le sulfate d'ammonium à forte concentration entre en compétition avec les protéines pour réagir avec les molécules d'eau. Ceci entraîne une désolvatation suivie d'une précipitation.

La précipitation fractionnée des protéines de chaque extrait brut a été réalisée de la manière suivante : On ajoute au surnageant, en faible quantité sous une agitation douce et à froid, du sulfate d'ammonium solide jusqu'à 40% de saturation (242 g/l). On laisse sous agitation pendant 2 h puis on centrifuge à  $9000 \times g$  pendant 20 min, le surnageant recueilli est additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'à 60% de saturation (136 g/l). Après 2 h d'agitation, on centrifuge à  $9000 \times g$  pendant 20 min. Le culot est repris immédiatement dans le minimum de tampon Tris-Hcl 100 mM (15 mL) additionné avec 3 mM  $CaCl_2$  à pH 8 (Tampon A) et 10 mM NaCl puis on centrifuge à  $14,000 \times g$  pendant 20 min. Le surnageant obtenu est dialysé à 4 °C contre le tampon A pendant une nuit pour servir d'extrait enzymatique brut qui sera ultérieurement purifié par techniques chromatographiques.

➤ **Chromatographie échangeuse de cations en Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)**

C'est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs propriétés ioniques basée sur la charge des protéines. Cette méthode utilise une colonne échangeuse d'ions dont la référence est de UNO S1 (BioRad) ayant un diamètre de 7 mm et une longueur de 35 mm, Il s'agit d'une échangeuse de cations qui fixe les protéines chargées positivement et qui seront ultérieurement élués par un sel.

Avant d'injecter l'extrait enzymatique brut dans le chromatographe, l'échantillon subit d'abord un traitement thermique de 60 °C pour éliminer les protéines thermolabiles non désirables. Par la suite, un volume de 1 mL d'extrait est injecté dans le chromatographe où la colonne est équilibrée par le tampon A. L'élution des kératinases se fait à l'aide d'un gradient NaCl allant de 0 à 500 mM à un débit de 30 mL/h. Cette élution est suivie par la progression des Do à 280 nm et des volumes de 2,5 mL sont collectés. Pour chaque tube, le test d'activité kératinolytique est effectué. L'ensemble permet d'avoir un chromatogramme reliant l'activité aux différents pics.

➤ **Contrôle de pureté par chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance en d'exclusion- diffusion (HPLC)**

Cette deuxième étape chromatographique utilise la chromatographie d'exclusion-diffusion ou perméation sur gel dont le principe est basé sur la taille des molécules. Ainsi, les molécules de tailles élevées sont éluées les premières par exclusion dans le  $V_0$ , par contre les molécules de petites tailles sortiront les dernières. La colonne utilisée est : Zobrex PSM 300 avec un diamètre de 26,2 mm et une longueur de 250 mm. Cette colonne est préparée selon les indications du fabricant (colonne analytique, commercialisée par Bio-Rad, France), montées sur un système de chromatographie HPLC « High performance liquid chromatography » Knauer, Allemagne, piloté par le logiciel propriétaire : Eurochrom<sup>®</sup> for Windows Basic Edition V3.05. Elle est pré équilibrée avec le tampon acétate de sodium 50 mM additionné avec 2 mM  $\text{CaCl}_2$  à pH 5.6.

Des échantillons de 500  $\mu\text{l}$  qui présentes une activité kératinolytique issus de la première étape chromatographique sont injectés en boucle. Le débit de travail est de 0,5 mL/min et la collecte est de 0,5mL /tube /min. L'ensemble est suivi par la progression de la DO à 280 nm et l'activité kératinolytique est mesure selon la même méthode.

Les étapes chromatographiques ainsi la préparation brute et la précipitation au sulfate d'ammonium permettent plus tard de présenter un tableau de purification. De même les techniques d'électrophorèses permettront de contrôler la pureté des kératinases purifiées

## **3.2 Méthodes analytiques**

### **3.2.1 Analyse de la pureté de l'enzyme par électrophorèse en PAGE-SDS**

Après les différentes étapes chromatographiques, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide –sodium dodecyl sulphate (PAGE-SDS) est utilisée pour vérifier la pureté des kératinases

La pureté des enzymes est estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE de 10 à 15%. Cette analyse des préparations enzymatiques par électrophorèse dans des conditions dénaturantes est réalisée selon la technique de Laemmli ([U.K. Laemmli, 1970](#)) (**Annexe 01**).

Après migration électrophorétique, le gel est plongé dans une solution de coloration (3 g de bleu de Coomassie (BioRad) dans 100 mL d'acide acétique, 400 mL d'éthanol et H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 litre), le gel est ensuite transféré dans une solution de décoloration (acide acétique 100 mL ; éthanol 350 mL et H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 litre). Des bandes de couleur bleue apparaissent reflétant la présence des protéines. Le gel est stocké dans de l'eau avec 20% d'éthanol, ce qui achève la décoloration.

### **3.2.2 Détection de l'activité protéasique par zymographie**

Après migration sur gel de polyacrylamide incorporant un substrat protéique (caséine) dans des conditions dénaturantes (**Annexe 01**). Le gel est lavé dans l'eau distillée pendant 1 h en présence de 2,5% Triton X-100 afin d'enlever le SDS qui inhibe l'activité enzymatique puis incubé pendant 3 h à 40 °C en présence du tampon A. Des bandes claires qui correspondent à des zones où le substrat protéique a été hydrolysé sont visualisées sur le gel traité après fixation pendant 1 h du TCA 20% (p/v), coloration au bleu de Coomassie G-250 et décoloration par l'eau distillée/méthanol/ acide acétique.

## 4 CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES KÉRATINASES

### 4.1 Effet du pH sur l'activité et la stabilité de KERA-71 et KERB-19

Les réactions d'hydrolyse de la kératine par KERA-71 et KERB-19 sont réalisées sur une gamme de pH allant de 2 à 13. Tous les tampons sont utilisés à des concentrations de 100 mM et en présence de 10 mM CaCl<sub>2</sub> : glycine-HCl pour les pH 2 à 5 ; acide 4-(2-hydroxy éthyl) - 1-piperazine éthane sulfonique (TRIS) pour les pH 6 à 8 ; Tris-HCl ou acide 2-(N-morpholino) éthane sulfonique (MES) pour les pH 8 à 9 ; glycine-NaOH pour les pH 9 à 13.

La stabilité des enzymes a été déterminée par pré-incubation dans des tampons à 30 °C et à différents pH, (6 à 11 pour KERA-71 et 4 à 9 pour la KERB-19) pendant 36 h en présence et en absence de calcium et 10 mM. Les activités kératinolytiques résiduelles ont été mesurées dans les conditions optimales de température et de pH des enzymes.

### 4.2 Effet de la température sur l'activité et la stabilité de KERA-71 et KERB-19

Dans le but de déterminer la température optimale des deux kératinases, le milieu réactionnel est maintenu à une valeur optimale de pH et en faisant varier la température de 20 à 80 °C pour la KERA-71 et la KERB-19 en présence et en absence du calcium à 10 mM.

Par ailleurs, la stabilité thermique des deux kératinases est déterminée par incubation de l'enzyme pendant 36 h à pH 8 et à de températures variantes de 40 à 60 °C pour la KERA-71 et 30 à 50 °C pour la KERB-19 en présence et en absence de CaCl<sub>2</sub> à 10 mM

Les activités résiduelles sont mesurées aux optima du pH et de température de l'enzyme (l'enzyme non incubée est considérée comme témoin).

### 4.3 Effet des inhibiteurs et différents ions métalliques sur KERA-71 et KERB-19

Dans le but de déterminer la classe de deux formes enzymatiques, ces dernières sont incubées en présence de différents inhibiteurs spécifiques pendant 1h à 50 °C. Les activités résiduelles sont mesurées aux conditions optimales. Les inhibiteurs de protéases utilisés sont : le fluor de phénylméthylsulfonyl (PMSF), le di-isopropyl fluorophosphate (DFP) (inhibiteurs de protéases à sérine) ; Soybean trypsin inhibitor (SBTI) (inhibiteur de la trypsine), le 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid (DTNB), N-ethylmaleimide (NEM), Iodoacétamide (inhibiteurs de protéases à thiol) ; Pepstatine A (inhibiteur de protéases acides), ethylene glycol tetracetic

acid (EGTA) et ethylene diamine tetracetic acid (EDTA) (inhibiteurs de métallo-protéases) et d'autres inhibiteurs et agents réducteurs.

De même l'activité kératinolytique de l'enzyme KERA-71 et KERB-19 sont testées aux conditions optimales respectives en absence (contrôle contenant 2 mM EGTA, agent chélateur) et en présence de 10 mM de sels de métaux, l'incubation se fait pendant 1 h

Les ions métalliques bivalents testés :  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) ;  $\text{Mn}^{2+}$  ( $\text{MnSO}_4$ ) ;  $\text{Ba}^{2+}$  ( $\text{BaCl}_2$ ) ;  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{MgSO}_4$ ) ;  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$ ) ;  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) ;  $\text{Co}^{2+}$  ( $\text{CoSO}_4$ ) ;  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4$ ) ;  $\text{Ni}^{2+}$  ( $\text{NiCl}_2$ ) ;  $\text{Hg}^{2+}$  ( $\text{HgCl}_2$ ) ;  $\text{Li}^{2+}$  ( $\text{LiCl}_2$ ) et  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{Cd Cl}_2$ ) et monovalents :  $\text{Li}^+$  ( $\text{LiSO}_4$ ) et  $\text{K}^+$  ( $\text{KCl}$ ).

#### **4.4 Détermination de la spécificité de KERA-71 et KERB-19 sur protéines naturelles, protéines synthétiques et peptide synthétique**

La détermination de la spécificité des deux kératinases sur les protéines se fait par incubation de chaque enzyme avec sur un substrat naturel (kératine, gélatine, caséine, fibrine, élastine, hémoglobine et l'albumine) ou synthétiques (kératine azure, azo-caséine et l'azo-albumine) dans les conditions optimales de chaque enzyme. La mesure de l'activité protéolytique et kératinolytique se fait selon les protocoles préalablement cités. Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui cause une augmentation de 0,0022 (correspond 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tyrosine libéré) de la DO à 440 nm dans les conditions expérimentales. Dans le cas des substrats modifiés, une unité de protéine azure est définie comme étant la quantité d'enzyme qui donne une augmentation de 0.1 de la DO à 440 nm par min dans les conditions expérimentales déterminées. L'activité collagénase est déterminée par la mesure de l'absorbance à 440 nm comme illustré dans le protocole de Sigma-Aldrich Co. LLC.

Par ailleurs, afin de déterminer la spécificité de nos enzymes, vis-à-vis les peptides synthétiques (ex : *N*-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-nitroanilide ou AAPF), l'activité protéolytique est mesurée en déterminant la concentration des acides aminés solubles dans l'acide trichloroacétique (TCA) à la concentration finale de 6,6% suite à la réaction avec le groupement *p*-nitroanilide (*p*-NA) (DelMar et al., 1979).

L'activité protéolytique est effectuée selon le protocole suivant :

➡ Préparer extemporanément une solution stock de AAPF à 25 mM dans le DMSO à 5% v/v et le Triton-X100 à 0,05% v/v, afin d'éviter l'autolyse du groupement *p*-NA au cours du stockage. La concentration de *p*-NA a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction molaire de 10500  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  à 410 nm.

- Mélanger 600  $\mu$ l d'une solution de AAPF (2 mM) dans un tampon Glycine-NAOH 100 mM à pH 10 contenant 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  avec 600  $\mu$ l de la solution enzymatique préalablement diluée ;
- Incuber 10 min à 50 °C ;
- Arrêter la réaction par addition de 600  $\mu$ l de TCA à 20% (w/v).
- (Le TCA précipite le peptide synthétique non hydrolysé) ;
- Incuber 15 min à température ambiante ;
- Centrifuger le milieu réactionnel pendant 15 min à 13000 rpm ;
- Mesurer l'absorbance à 410 nm.

Une unité (U) d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 mM de *p*-NA/mL/min dans ces conditions expérimentales.

#### 4.5 Détermination des paramètres cinétiques

L'étude des paramètres cinétiques des deux activités kératinolytiques a été réalisée sur la dégradation de deux substrats (kératine et *N*-Suc-Tyr-Leu-Val-*p*NA). La constante de dissociation ou de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) et la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) pour chaque enzyme sont déterminées à partir de la représentation graphique linéaire de Lineweaver–Burk (doubles inverses :  $1/V$  en fonction de  $1/[S]$ ) moyennant le programme Hyper32 utilisant différentes concentrations de kératine de 0 à 10 mM et une concentration des protéases purifiées à 1,5 mg/mL.

#### 4.6 Détermination du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (DH) exprimé en % des deux activités kératinolytiques sera comparé à d'autres kératinases en l'occurrence la KERAK-29 de notre laboratoire ([Habbeche et al., 2014](#)) et KERAB ([B. Jaouadi et al., 2010](#)), la KERDZ ([Ben Elhoul et al., 2016](#)), actinase E, la subtilisine Carlsberg et la subtilisine Novo ( commerciale pour les trois dernières) .

Protocole :

Le protocole utilisé est effectué selon la méthode de ([Zaraï Jaouadi et al., 2012](#)) : L'hydrolyse de la kératine a été effectuée à 50 °C et à un pH de 8 pour KERA-71 ; 40 °C et pH 7 pour la KERB-19 ; à 70 °C et à un pH de 10 pour KERAK-29 ; à pH 12 et 70°C pour la KERDZ ; à 60 °C et à un pH de 11 pour Actinase E ; et à 75 °C et à un pH de 11,5 pour KERAB. Le pH a été maintenu constant tout au long de l'hydrolyse par addition de NaOH 5 N. Une quantité

de 10 g de farine de plumes a été dissous dans 100 mL de tampon Tris-HCl et ensuite traité avec 1000 U / mL d'enzymes purifiées.

Le degré d'hydrolyse est défini comme étant le pourcentage de liaisons peptidiques coupées par rapport au nombre total de liaisons peptidiques (Adler-Nissen, 1978). Ce DH se calcule selon l'équation suivante :

$$DH = \frac{\text{Nombre de liaisons peptidiques coupées}}{\text{Nombre total de liaisons peptidiques}} \times 100 \text{ ou } DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}}$$

La relation entre le DH et la consommation de base est donnée par l'équation suivante :

$$DH = \frac{B \times Nb}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100 \%$$

Où : **B** : consommation de la Soude en litres ; **Nb** : Normalité de la soude ;

**MP** : Masse de protéines (N × facteur Kjeldahl) en Kg ; **α**: degré de dissociation ;

**Htot** est défini comme étant le nombre total de liaisons peptidiques de la protéine (en grammes équivalent par kg).

Le nombre total de liaison peptidique (htot) des protéines de la farine de plumes de volailles est estimé à 8,3 meq/g (Zaraï Jaouadi et al., 2012).

La valeur de  $\alpha$  est donnée par les fiches techniques des enzymes "Novo". Valeur connue

#### 4.7 Détermination de la séquence N-terminales par la méthode d'Edman automatisée (dégradation d'Edman)

L'intérêt de connaître la séquence NH<sub>2</sub>-terminale des deux formes enzymatiques est de rechercher par bio-informatique (alignement) des similarités avec les autres protéases ayant des ancêtres communs ou pas. De même que cette technique permet de montrer qu'il s'agit bien de kératinases.

La séquence NH<sub>2</sub>-terminales de chaque forme enzymatique purifiée est déterminée par la méthode d'Edman automatisée sur microséquenceur de protéines (Hewick, Hunkapiller, Hood, & Dreyer, 1981; Hunkapiller & Hood, 1978) dont le principe est détaillé dans l'annexe 2.

Cette méthode met en jeu trois étapes classiques de séquençage, à savoir : le couplage, le clivage et la conversion. Par la suite, on procède à l'alignement de la séquence NH<sub>2</sub>-Terminale obtenue via le site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> qui permet de la similitude de cette enzyme par rapport aux autres protéases étudiées chez les autres espèces, bactéries et champignons.

## **4.8 Applications biotechnologiques de la KERA-71 et la KERB-19**

### **4.8.1 Bio-conversion des déchets riches en kératines par l'extrait brut contenant les deux enzymes.**

Pour tester une éventuelle application des deux enzymes dans l'élimination des déchets kératiniques tels que les plumes entières, nous avons adopté le protocole suivant :

Mode opératoire :

- Dans un Erlen contenant 100 mL de tampon Tris-HCl (100mM) à pH8.
- 10 g de plumes entières rincés et autoclavés sont mis en solution dans le même tampon
- Extrait enzymatique brut (mélange enzymatique (6800 UI)) est ajoutée aux plumes entières
- L'ensemble est incubé dans une étuve pour une durée d'incubation de 48 h à une température de 30° C.

L'activité kératinolytique est repérée par simple observation directe de la dégradation de la plume (substrat) pour donner une solution liquide par rapport à un blanc sans la solution enzymatique.

Parallèlement pour comparer l'action synergique de la KERA-71 et la KERB-19 à d'autres protéases commerciales, nous avons testé la pepsine et la papaïne selon conditions opératoires suivantes :

Cas de la pepsine :

- Dans un Erlen contenant 100 mL de tampon Tris-HCl (100mM) à pH4.
- 10 g de plumes entières rincés et autoclavés sont mis en solution dans le même tampon
- Extrait enzymatique brut (10000 UI) est ajoutée aux plumes entières
- L'ensemble est incubé dans une étuve pour une durée d'incubation de 48 h à une température de 37° C.

#### Cas de la papaïne

-Dans un Erlen contenant 100 mL de tampon Tris-HCl (100mM) à pH7.

-10 g de plumes entières rincés et autoclavés sont mis en solution dans le même tampon

-Extrait enzymatique brut (10000 UI) est ajoutée aux plumes entières

-L'ensemble est incubé dans une étuve pour une durée d'incubation de 48 h à une température de 65° C.

L'activité kératinolytique est repérée par la même méthode que celle de la KERA-71 et la KERB-19

Par ailleurs , nous avons également comparé nos résultats à d'autres travaux de recherches réalisés sur deux souches autochtones appartenant au même genre et qui sont d'*Actinomadura keratinilytica* Cpt29 (Habbeche et al., 2014) et *Actinomadura viridilutea* DZ50 (Ben Elhoul et al., 2016).

#### 4.8.2 Application de la KERA-71 et la KERB-19 dans l'épilage de cuir

L'efficacité de l'épilage enzymatique par les enzymes purifiées KERA-71 et KERB-19 a été étudiée en utilisant des peaux de chèvre, de mouton et de bovin à poil frais provenant d'un abattoir local (abattoir municipal d'Annaba, Algérie). Les peaux ont été coupées, parées et soigneusement lavées avec l'eau du robinet et de l'eau distillée pour éliminer le sang et les déchets. Des morceaux de peau découpés en 10 cm × 10 cm ont été placés dans 100 mL d'enzymes purifiées KERA-71 et KERB-19 avec 1000 U / mL d'activité kératinolytique. Après 12 h d'incubation à 30 ° C, la peau a été retirée et les cheveux ont été doucement tirés à la main pour vérifier s'ils s'étaient séparés de la peau. L'efficacité épilatoire a été appréciée en fonction de la zone épilée de la peau en fin de traitement et la qualité de la peau épilée a été estimée en fonction de l'aspect observé à l'œil nu après 12 h de traitement. La peau épilée de haute qualité a montré des pores de cheveux propres, une structure de grain claire et aucun dommage au collagène.

## ***RÉSULTATS ET DISCUSSION***

# RÉSULTATS ET DICUSSION

---

## *CHAPITRE 01 : PRODUCTION ET OPTIMISATION DE KÉRATINASES*

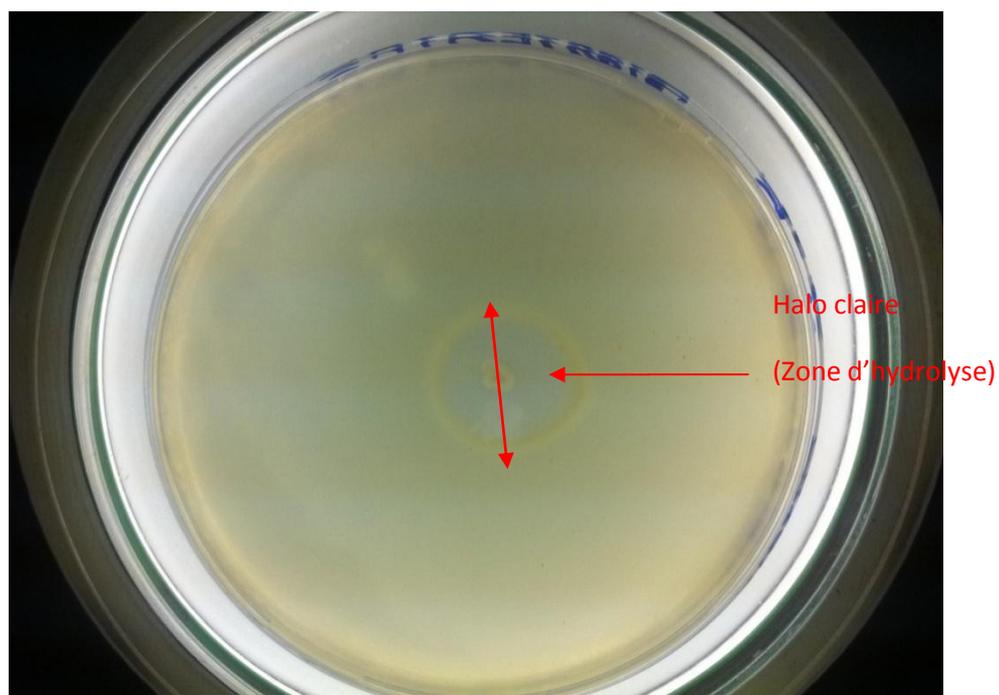
---

### **1 Mise en évidence directe de l'activité protéolytique et kératinolytique de la souche Cpt20**

#### **1.1 Mise en évidence de l'activité sur milieu solide**

L'examen des résultats obtenus montre qu'après incubation pendant 24h à 45°C, la souche d'Actinomycètes thermophile Cpt20 se développe facilement sur milieu GNL solide et présente un halo transparent de 16mm de diamètre entourant la colonie (**Figure 8**). Le diamètre du halo est proportionnel à la quantité de protéases secrétées. Ainsi, en se basant sur le rapport du diamètre du halo (mm) sur le diamètre de la colonie (mm), nous remarquons que ce rapport donne une valeur supérieure de 4,1 (un signe +++) ce qui montre que la souche Cpt20 est très active sur son substrat par sécrétion de protéases. En effet, lorsque le rapport est compris entre 3 et 4 (+++), la souche est active et quand le rapport est supérieur à 4 (++++), la souche est très active (Ben Elhouli et al., 2015) et c'est le cas de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt 20. Toutefois ce test reste semi-quantitatif.

En ce qui concerne la recherche des kératinases sur milieu solide à base de farine de plumes (**Annexe 01**), l'examen des résultats (**Figure 9**) montre qu'après 3 jours de culture, la souche dégrade le substrat avec apparition des halos translucides dont le rapport, halos/colonie est supérieur à 4 (++++) qui prouve que cette souche est très active sur son substrat par sécrétion de kératinases. En effet, La souche d'Actinomycète thermophile Cpt20 est isolée du compost de poulet riche en matière organique d'origine végétale (xylane, pectine, cellulose et hémicellulose) et animale (kératine, collagène, chitine, cellulose, et autres polymères). Ces milieux sont connus pour abriter une diversité de microorganismes et particulièrement les Actinomycètes. Ce résultat préliminaire est similaire aux travaux de (A. Habbeche et al., 2014) qui ont montré que la souche *d'Actinomadura keratinilytica* Cpt29 isolée au niveau du laboratoire LBMA à partir du même milieu en l'occurrence le compost de poulet dans la région d'Annaba et qui produise une kératinase (KERAK-29). Ce test d'activité sera ultérieurement confirmé par la recherche de kératinases sur milieu liquide.



**Figure 8 :** Mise en évidence d'activité protéolytique de la souche Cpt20 sur milieu GNL.



**Figure 9 :** Mise en évidence d'activités kératinolytiques de la souche Cpt20 sur milieu à base de farine de plumes

## 1.2 Mise en évidence de l'activité sur milieu liquide

Après culture de la souche Cpt20 sur milieu liquide (4 jours) à base de farine de plumes à pH8 et à la température de 45 °C, le surnageant (extrait enzymatique brut) est récupéré et l'activité kératinolytique est mesurée. L'examen des résultats montrent que l'enzyme est active sur son substrat kératinique et le niveau d'activité est de 1120 UI/mL. Ce test confirme donc que la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 thermophile produit des kératinases.

Ce résultat corrobore les travaux de Habbeche (2013) sur la production de kératinases chez une souche d'*Actinomadura keratinilytica* Cpt29 avec un niveau de production de 135,23 UI/mL. De même que la souche *Actinomadura viridilutea* DZ50 isolée du port de pêche de la wilaya de Skikda produit une kératinase (KERDZ), dont le niveau de production est de 18000 UI/mL (Ben Elhoul et al., 2016). Nous signalons également qu'une souche d'actinomycète thermophile dont l'espèce est : *Thermoactinomyces* sp.YT06 isolée du compost de poulet produit une kératinase thermostable avec un niveau d'activité de 42 UI/mL (L. Wang et al., 2019).

## 2 Optimisation de la production de kératinases par plan d'expériences

Cette partie de travail de recherche de la thèse est consacrée essentiellement à l'optimisation de la production de la kératinase chez la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 et cela par plan d'expériences. En effet, dans le domaine de la biotechnologie industrielle, le choix d'une souche pour la production d'une enzyme est basé en grande partie sur le niveau de production. Ainsi, dans notre cas et dans les conditions de production de kératinases sur le milieu initial non optimisé contenant : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, ; NaCl 0.05%, CaCO<sub>3</sub> 0.3 %, FeSO<sub>4</sub> 0.01%, farine de plumes 2%, et la solution d'oligoéléments 0.1 %, donne un niveau de production de l'ordre de 1120±65 U/mL d'activité kératinolytique. Ce résultat reste faible par rapport aux travaux de recherches : nous citons les souches suivantes : *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 avec un niveau de production de 24000UI/mL (A. Habbeche et al., 2014) ; et *Actinomadura viridilutea* DZ-50 avec un niveau de production de 18000 UI/mL (Ben Elhoul et al., 2015).

Dans ce contexte global nous nous sommes intéressés à optimiser les conditions de production de cette souche afin d'évaluer son potentiel de production de kératinases par rapport à d'autres microorganismes connus dans la production de cet enzyme avec comme une application biotechnologique en particulier la biotechnologie blanche (industrielle). Par ailleurs, l'optimisation peut se faire selon deux méthodes dont l'une est classique et l'autre par

méthode avec plan d'expérience ou plan factoriel. Cette dernière est donc utilisée et qui a comme avantage, gain de temps et tient compte des interactions des différents facteurs impliqués dans la production.

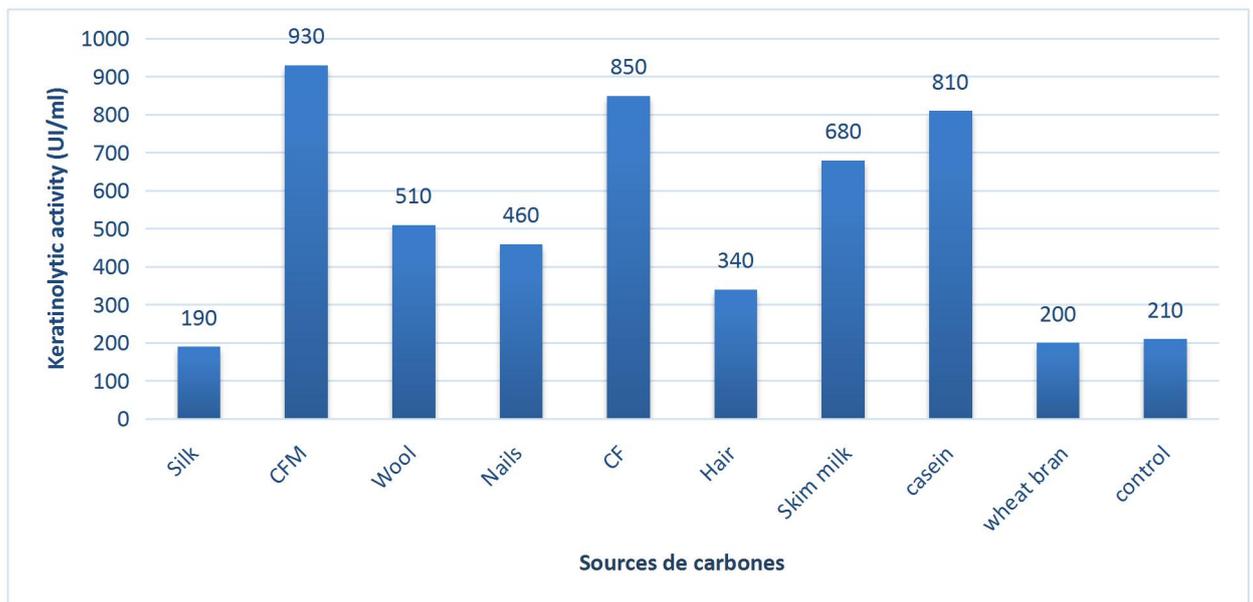
## 2.1 Etude préliminaire

Avant de chercher les conditions optimales de production de kératinases par la souche Cpt20, il est utile, dans une première étape, de déterminer les conditions préliminaires de production. Il s'agit de choisir les substrats de base (meilleure source de carbone et meilleure source d'azote), afin d'obtenir une production maximale de Kératinases.

### 2.1.1 Effet des différentes sources de carbone sur la production de kératinase(s)

La production de protéases par la souche Cpt20 a été testée sur le milieu de base avec différentes sources de carbone non conventionnelle (substrats naturels) et qui sont les suivants : soie, farine de plume, laine, ongles, plumes de volaille, cheveux, lait écrémé, son de blé et caséine à raison de 10 g/L.

L'ensemble des résultats obtenus sont illustrés par l'histogramme qui représente l'effet des différentes sources de carbone sur l'activité enzymatique (**figure 10**).



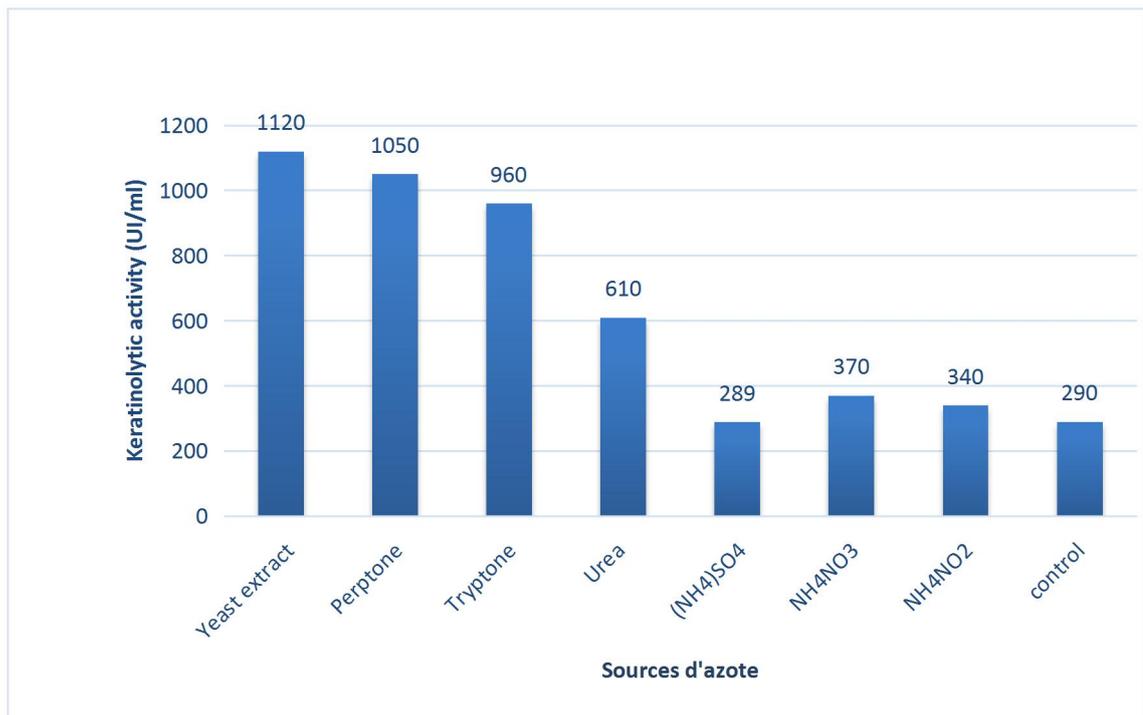
**Figure 10 :** Effet de différentes sources de carbone sur la production de kératinases chez la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt20

L'analyse des résultats obtenus montre que la farine de plumes donne la meilleure production de kératinase avec une valeur de 930 UI/mL suivie les plumes de volailles et la

caséine avec 850 et 810 UI/mL respectivement. Par ailleurs, La soie et le son de blé semblent n'avoir aucun effet sur la production de kératinase par la souche Cpt20.

### 2.1.2 Effet de différentes sources d'azote sur la production de kératinase(s)

Dans le but de choisir la meilleure source d'azote, différentes sources de ce composé sont testées. Ces différentes sources d'azote sont les suivantes : extrait de levure, peptone, tryptone, urée, farine de plumes,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et  $\text{NaNO}_2$  avec une concentration de 1 g/l. L'ensemble des résultats obtenus sont représentés par l'histogramme ci-après (**figure 11**).



**Figure 11** : Effet des différentes sources d'azote sur la production de kératinases chez la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt20

L'examen des résultats obtenus montre que l'extrait de levure donne une meilleure production de kératinases avec une valeur de 1120 UI/mL suivi de près par la peptone et le tryptone avec une production de 1050 et 960 UI respectivement. Par ailleurs, on remarque que les sources d'azote minéral  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et  $\text{NH}_4\text{NO}_2$  n'ont aucun effet sur la production de kératinases par la souche Cpt20.

Ces résultats préliminaires ont permis donc de choisir la farine de plume (2 %) comme source de carbone et l'extrait de levure (1g/l) comme source d'azote.

## 2.2 Etude de l'optimisation de production de kératinase par la souche Cpt20 par plan d'expérience

### 2.2.1 Criblage des facteurs par le modèle Plackett –Burman

L'étude bibliographique a permis de sélectionner plusieurs facteurs et qui sont testés pour leurs effets sur la production de kératinases par la souche Cpt20. L'ensemble des facteurs pris en compte sont présentés dans le **tableau 7** ainsi que leurs niveaux supérieurs et inférieurs.

**Tableau 07** : Les deux niveaux bas et élevés de l'ensemble des facteurs.

Variables	Code	Unités	Niveaux	
			(-1)	(+1)
pH	X <sub>1</sub>	-	7	10
Température	X <sub>2</sub>	(°C)	30	50
Temps	X <sub>3</sub>	(jours)	5	9
Farine de plumes	X <sub>4</sub>	(g/l)	5	30
YE	X <sub>5</sub>	(g/l)	0.5	3
NaCl	X <sub>6</sub>	(g/l)	0.1	1
FeSO <sub>4</sub>	X <sub>7</sub>	(g/l)	0.01	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	X <sub>8</sub>	(g/l)	0.25	1.75
CaCO <sub>3</sub>	X <sub>9</sub>	(g/l)	1	5
TES	X <sub>10</sub>	(% v/v)	1	5

Ainsi pour déterminer les facteurs qui affectent significativement la production de kératinase par la souche Cpt20, nous utilisons un plan d'expérience de Plackett & Burman avec 14 expériences. Ces dernières sont représentées dans le **tableau 8** avec les différents facteurs codés (X<sub>1</sub> à X<sub>10</sub>).

**Tableau 08** : La matrice Plackett & Burman avec les différents résultats

Variables	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	Activité Kératinolytique (U/mL) <sub>a</sub>
1	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	910
2	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	1253
3	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	3421
4	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	2407
5	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1684
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1747
7	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	2002
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1716
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	2298
10	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1710
11	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1045
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1955
13	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1086
14	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1003

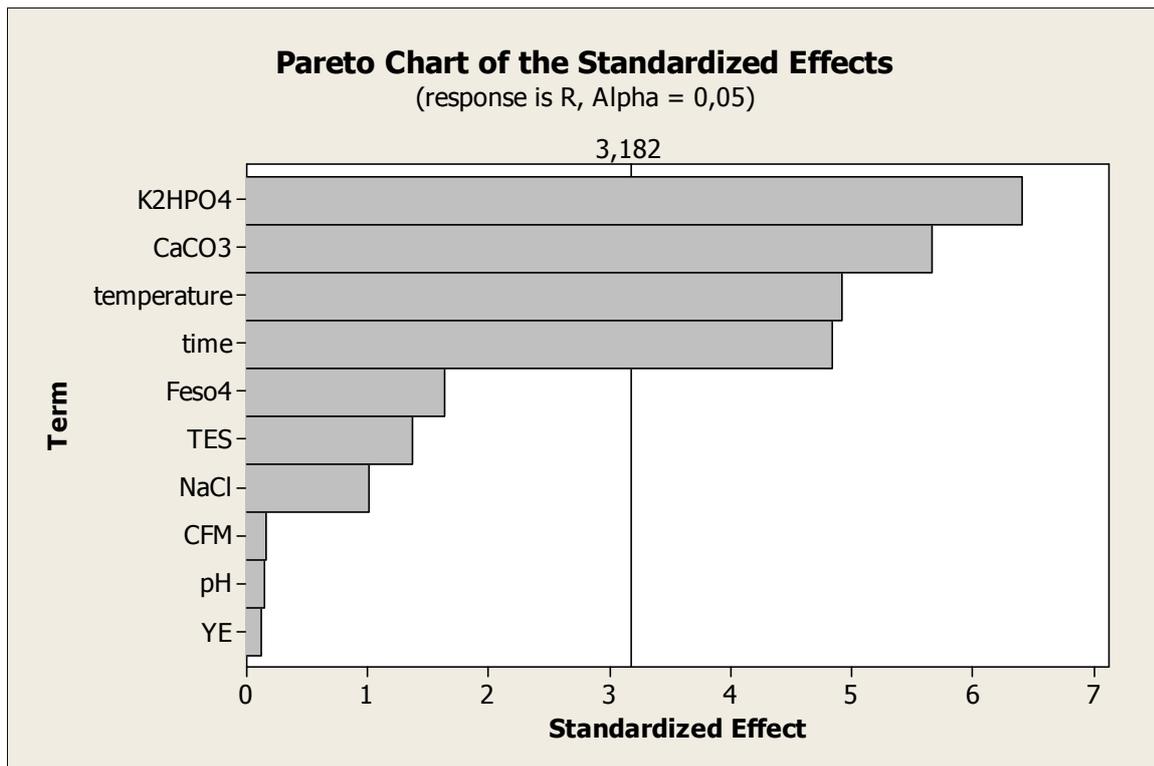
Les facteurs avec une valeur -P inférieur à 0.05 sont considérés comme significatifs sur la production de kératinases. Les résultats obtenus montrent que les paramètres significatifs sont le temps d'incubation, température, CaCO<sub>3</sub>, et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (**Tableau 09 et la figure 12**).

La température et le temps d'incubation ont des effets négatifs sur la production de kératinases et donc ne seront pas optimisés. Les autres paramètres ayant des effets négatifs sur la production sont le pH, l'extrait de levure, FeSO<sub>4</sub> et la solution d'éléments de trace alors que NaCl et la farine de plumes ont des effets positifs mais non significatifs sur la production de

kératinases par la souche Cpt20. Seule le  $\text{CaCO}_3$  et le  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  feront l'objet d'une deuxième étape d'optimisation pour déterminer les valeurs optimales de ces derniers.

**Tableau 09** : Effets estimés et les Coefficients de différents facteurs sur la réponse

	<b>Effet</b>	<b>Coef SE</b>	<b>Coef</b>	<b>T</b>	<b>P</b>
<b>Constant</b>		1855,7	76,93	24,12	0,000
<b>pH</b>	-21,7	-10,8	76,93	-0,14	0,897
<b>Temperature</b>	-627,7	-313,8	63,78	-4,92	0,016
<b>Temps</b>	-744,0	-372,0	76,93	-4,84	0,017
<b>Farine de plumes</b>	20,7	10,3	63,78	0,16	0,882
<b>YE</b>	-15,3	-7,7	63,78	-0,12	0,912
<b>NaCl</b>	155,0	77,5	76,93	1,01	0,388
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	-208,0	-104,0	63,78	-1,63	0,201
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	818,0	409,0	63,78	6,41	0,008
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	872,3	436,2	76,93	5,67	0,011
<b>TES</b>	-211,0	-105,5	76,93	-1,37	0,264
<b>Ct Pt</b>		-896,0	258,02	-3,47	0,040



**Figure 12 :** Charte de Pareto avec l'effet standard de chaque élément.

Les résultats obtenus sont en accord avec divers travaux scientifiques indiquant que les ions calcium sont nécessaires pour l'induction enzymatique (Marquart et al., 2005; Nilegaonkar et al., 2007). Bien que d'autres auteurs (Ghorbel-Frikha et al., 2005) suggèrent que le calcium n'affecte pas la production mais augmente plutôt la thermo activité et la thermostabilité des kératinases et donc il est nécessaire pour maintenir la conformation tridimensionnelle nécessaire à l'activité enzymatique.

Par ailleurs, le composé  $K_2HPO_4$  est également signalé pour améliorer le niveau production d'enzymes (Dominguez et al., 2003; Sikander et al., 2012). En effet selon certains chercheurs, le phosphate est essentiel pour toutes les activités métaboliques de la cellule (Ghillebert et al., 2011; Watanabe et al., 2008).

La grande variation de la production de kératinases allant de 910 à 3421 U/mL montre l'importance de cette étape dans la sélection des facteurs les plus influents. Pour une optimisation supplémentaire, le niveau des facteurs significatifs avec un effet positif sera ultérieurement optimisé par RSM en utilisant le plan de Box-Wilson tandis que les variables à effet positif sur l'activité (NaCl et CFM) seront maintenues constantes à un niveau supérieur

(+) alors que les variables ayant un effet négatif sur l'activité (Temps, température, TES, YE, FeSO<sub>4</sub>, pH) ont été maintenues à leurs niveau inférieur (-).

### 2.2.2 Optimisation des facteurs les plus influents

Dans le but d'optimiser les facteurs sélectionnés les plus influents sur la production d'activité protéolytique, et en se basant sur les résultats obtenus par le plan de Plackett & Burman, un plan d'expérience de Box-Wilson avec 13 expériences (2 facteurs à 5 niveaux) ont été utilisés (**tableau 10**). Les différents niveaux des variables figurent dans le **tableau 11**.

**Tableau 10:** Les niveaux codés des différents facteurs étudiés par le plan Box-Wilson

Variables (g/l)	Code	-1,414	-1	0	+1	+1,414
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	X <sub>8</sub>	0.19	0.5	1.25	2	2.31
CaCO <sub>3</sub>	X <sub>9</sub>	0.17	1	3	5	5.81

**Tableau 11** : Criblage des facteurs par le plan Box-Wilson

Run	CaCO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Activité kératinolytique (U/mL)	Activité prédite ( UI/mL)
1	1.0	0.5	4260	4429
2	1.0	2.0	2650	3123
3	5.0	0.5	3050	2871
4	5.0	2.0	3960	4085
5	3.0	0.19	4070	3844
6	3.0	2.31	3850	3780
7	0.17	1.25	3340	3653
8	5.83	1.25	3840	3231
9	3.0	1.25	6820	6630
10	3.0	1.25	6700	6630
11	3.0	1.25	6530	6630
12	3.0	1.25	6420	6630
13	3.0	1.25	6680	6630

Les résultats expérimentaux ont été analysés par ANOVA standard (**tableau 12**) et le plan de Box-Wilson a été démontré par l'équation polynomiale du second ordre (en facteur codé):

$$Y = 765.2 + 4832.6 X_8 + 1916.1 X_9 - 2504.4 X_8^2 - 398.4 X_9^2 + 420.0 X_8 X_9$$

Où Y est l'activité kératinase (U / mL), X<sub>8</sub> et X<sub>9</sub> sont respectivement K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (g / l) et CaCO<sub>3</sub> (g / l). Le résultat de l'analyse de régression a montré que la valeur F était de 123,4 avec une valeur de probabilité très faible (P ≤ 0,0001) indiquant la signification du modèle. La proximité de l'activité kératinolytique expérimentale et l'activité prédite peut-être exprimée par le coefficient de détermination de (R<sup>2</sup> = 0,98) qui stipule que seulement 2% de la variation totale ne peut pas être expliquée par le modèle. Le carré R ajusté de 0,94 explique la bonne concordance entre les résultats expérimentaux et les résultats théoriques. Ainsi, plus R<sup>2</sup> est

proche de 1, plus le modèle est fiable et meilleur sont les prédictions de la réponse (Gray., 1990).

**Tableau 12 :** Analyse de la variance

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
<b>Regression</b>	5	29672206	29672206	5934441	123.4	0,000
<b>Linear</b>	2	209225	9295251	4647625	96.65	0,000
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1	127797	5749751	5749751	119.56	0,000
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	1	81428	6949329	6949329	144.51	0,000
<b>Square</b>	2	27875381	27875381	13937690	289.83	0,000
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1	10205544	13805750	13805750	287.09	0,000
<b>CaCO<sub>3</sub> × CaCO<sub>3</sub></b>	1	17669837	17669837	17669837	367.44	0,000
<b>Interaction</b>	1	1587600	1587600	1587600	33.01	0,001
<b>Lack-of-Fit</b>	3	239025	239025	79675	3.27	0,141
<b>Pure Error</b>	4	97600	97600	24400		

L'équation du modèle liée à la production de kératinases montre un effet linéaire positif très important pour K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (X8) et CaCO<sub>3</sub> (X9) ainsi que l'importance de leurs interactions. Ces résultats ont été confirmés par le test t de Student ( $p \leq 0,001$ ). Afin de déterminer les niveaux optimaux de chaque paramètre pour la production maximale de kératinases, des tracés de surface de réponse tridimensionnels ont été construits en traçant la réponse (production de kératinase) sur l'axe Z par rapport aux deux variables, Tracés de surface de réponse (**figure 13**) peut directement refléter l'impact des deux facteurs sur la réponse. Les traits du tracé du contour (**figure 14**) peuvent refléter la force de l'interaction entre les deux facteurs: un contour ovale indique que l'interaction entre les deux facteurs est forte, tandis qu'un contour circulaire indique que l'interaction entre les deux facteurs est faible (Liang Wang et al., 2015).

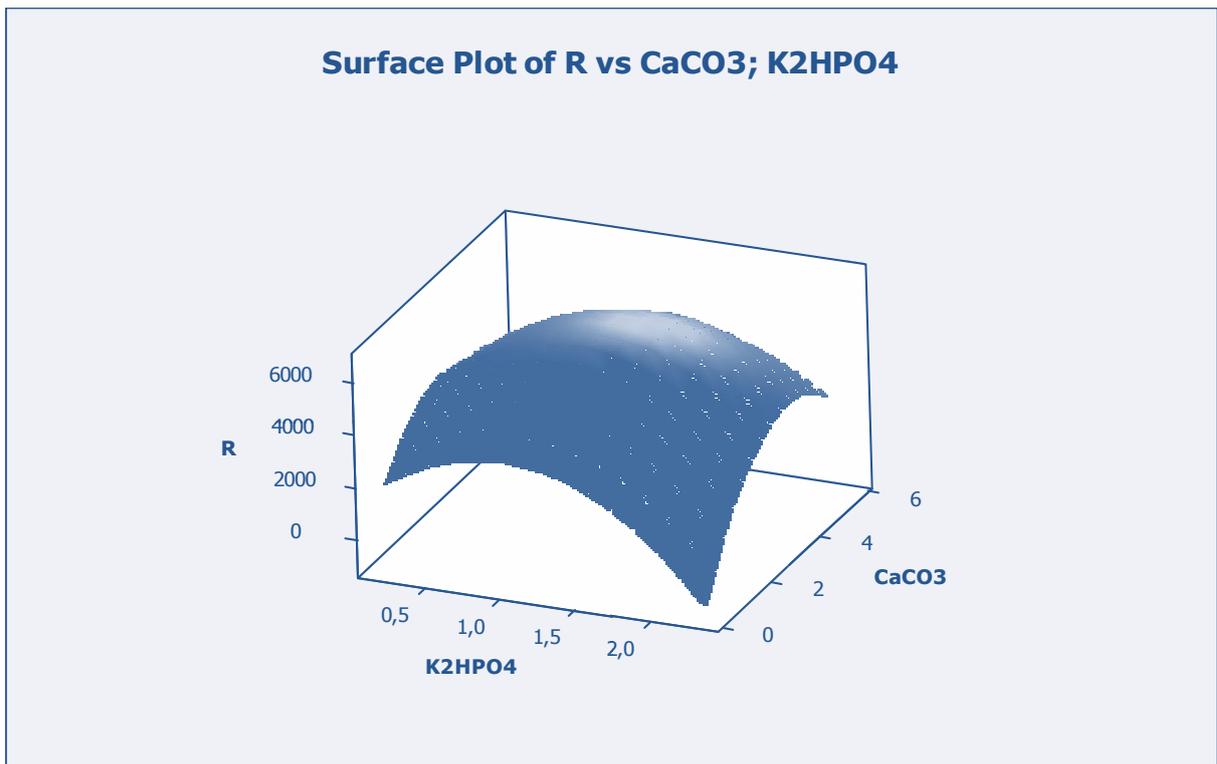


Figure 13 : surface plot de la réponse par rapport au K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et CaCO<sub>3</sub>

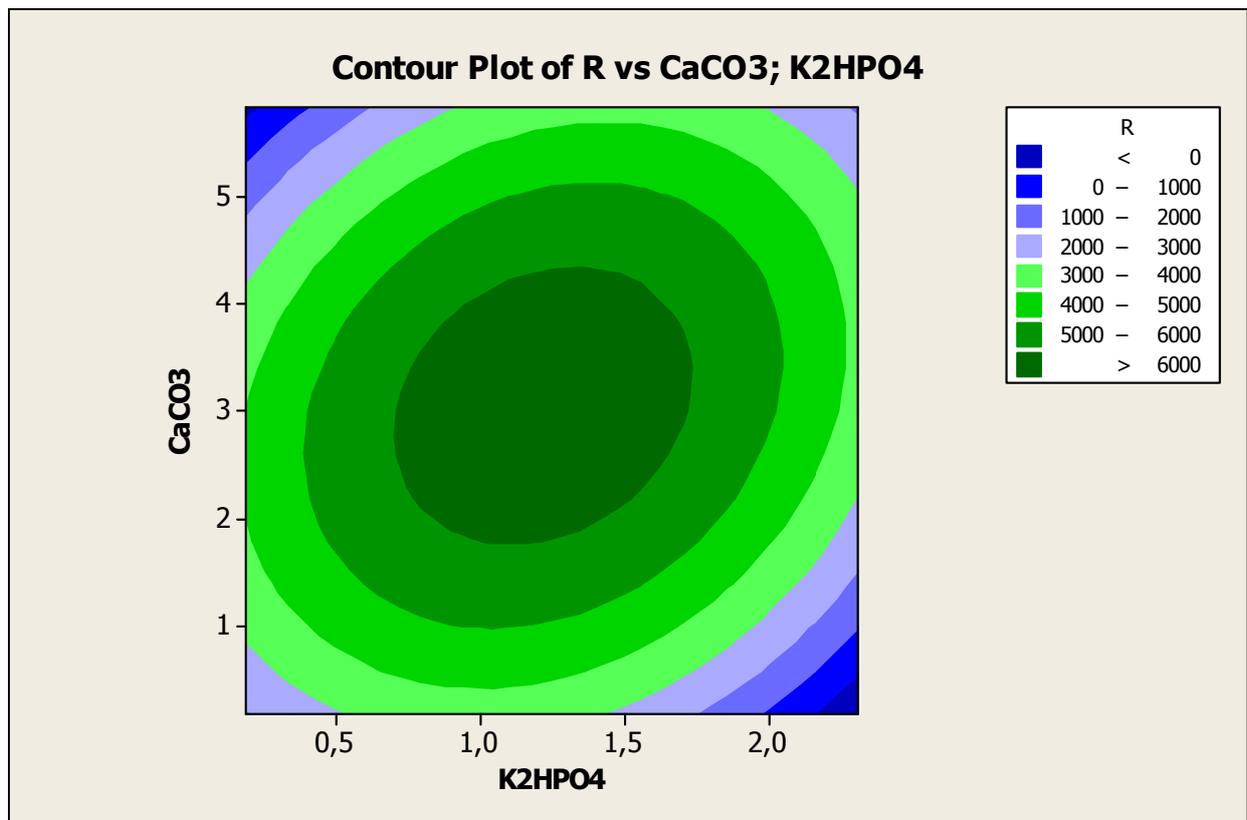


Figure 14 : Ligne de contour de la réponse en fonctions du CaCO<sub>3</sub> et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

En optimisant la composition du milieu et les conditions de culture, non seulement la production de protéases a été améliorée, mais également le coût de la production de protéases a également été réduit. En effet, il y a eu l'utilisation de la farine de plumes qui sont des déchets facilement disponibles en Algérie, d'où l'intérêt de les valoriser par voie de biotechnologie enzymatique blanche (industrielle). Nous rappelons que ces déchets de plumes représentent une source de pollution pour l'environnement.

Par la suite, la validité du modèle sera testée en utilisant les conditions optimales de culture en la comparant à la prédiction théorique.

### 2.2.3 Validation des conditions optimales

La validation du modèle a été testée en utilisant les conditions de culture optimales : température (30 ° C), pH initial 7, temps (7 j), CFM (5 g / l), YE (0,5 g / l), NaCl (0,1 g / l), FeSO<sub>4</sub> (0,01 g / l), TES (1%, v / v), CaCO<sub>3</sub> (3 g / l) et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,25 g / l), en comparaison avec la réponse prédite.

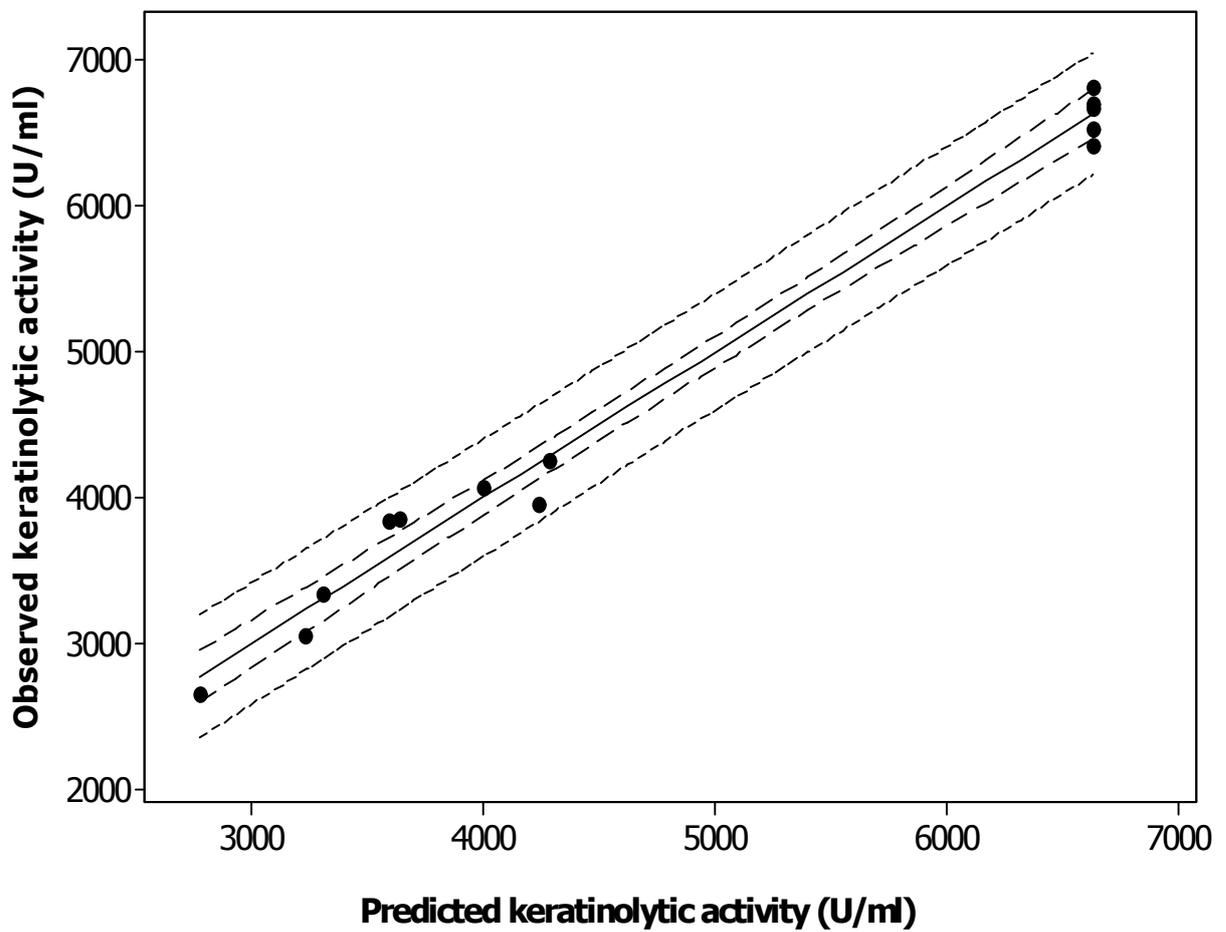
Les deux modèles ont donné des réponses stables dans la prédiction de l'activité kératinase (Y). Le tracé linéaire ajusté entre les valeurs observées de l'activité de la kératinase (Y) et celles prédites calculées par RSM (**figure 15**) montre la qualité de l'ajustement pour le modèle CCD ( $R^2 = 98,9\%$ ).

Les résultats obtenus dans ce travail de recherche ont indiqué que la RSM est une méthode fiable pour développer le modèle d'optimisation des facteurs avec analyse des interactions. Cela améliore considérablement le rendement de la production avec réduction du temps de culture.

Les résultats ont montré que la production d'enzyme augmentait de 6 fois (**Tableau 13**) lors de l'utilisation des conditions optimisées. Des résultats similaires ont été rapportés par ([Kshetri et al., 2016](#); [Prabha et al., 2015](#)) avec des améliorations de la production de kératinase de 5 et 6 fois respectivement.

**Tableau 13 :** Récapitulation des niveaux d'activité protéolytiques obtenus par la souche Cpt20.

Expérience		Activité (U/mL)
Avant optimisation		1120
Après optimisation	Etape 1	3421
	Etape 2	6800



**Figure 15 :** Corrélation entre l'activité expérimentale et l'activité théorique

## Conclusion de chapitre 01 :

En conclusion de cette première partie de travail de thèse, on peut dire que l'utilisation de la méthode de plan d'expérience a permis de montrer que seuls les composés  $\text{CaCO}_3$  (3 g/L) et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,25 g/L) ont un effet significatif sur la production des kératinases avec  $p \leq 0,05$ . Ainsi, le niveau de production initiale de l'ordre de 1120 UI/mL a été optimisé par plan d'expérience qui passe à 6800 UI/mL soit un facteur de 6 fois. La valeur obtenue est largement supérieure à celle de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt 29 avec une valeur de 135,23 UI/mL après optimisation classique (Habbeche et al., 2013) avec un facteur de 50 fois, Ainsi qu'à d'autres souches qui ont servi également de comparaison, notamment, chez la souche *Bacillus altitudinis* RBDV1 qui donne 780 UI/mL (Pawar., 2018), de même qu'une souche d'actinomycète thermophile dont l'espèce est : *Thermoactinomyces sp.* YTO6 isolée du compost de poulet et qui produit une kératinase thermostable avec un niveau d'activité de 42 UI/mL (L. Wang et al., 2019). Par ailleurs, la souche *Actinomadura viridilutea* DZ- 50 donne un niveau de production de 18000 UI/mL (Ben Elhoul et al., 2015) supérieur au niveau de production de notre souche.

Ces différents résultats de la première partie de travail de thèse sont publiés dans le journal : Research journal of biotechnology vol 14 (10) october 2019 Res.J.Biotech.

---

## **CHAPITRE 02 : PURIFICATION ET CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DE DEUX KÉRATINASES (KERA-71 ET KERB-19)**

---

Dans cette deuxième partie de thèse, nous nous sommes intéressés à la purification et la caractérisation biochimique des kératinases produites par la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 suite à une optimisation par plan d'expériences.

### **1 Protocol de purification**

Le protocole de purification du mélange enzymatique (Forme A et B) est effectué en trois étapes et l'ensemble des résultats obtenues sont représenté par la **figure 16** le **tableau 14**. L'examen du chromatogramme (**figure 16-A**) fait apparaître deux pics avec une bonne qualité de séparation, dont un n'est pas fixé par la colonne et qui présente une activité kératinolytique dénommée KERB-19 (forme B) et un deuxième pic majoritaire retenue par la colonne échangeuse d'anions qui possède également une activité kératinolytique dénommé KERA-71 éluée par un gradient linéaire NaCl (0-1M).

Par ailleurs l'examen du tableau de purification (**tableau 14**) des deux formes enzymatiques montre que suite à un traitement thermique à 60° pendant 30 minutes seulement 8,23% de l'activité totale a été perdue ce qui explique la thermostabilité du mélange enzymatique. De même que durant cette étape on remarque que l'activité spécifique (AS) a augmenté de 2067 à 10120 U/mg, soit un facteur de purification de 4.9 ce qui est considérable. Cette étape a permis donc d'éliminer les fractions de protéines indésirables thermolabiles.

La deuxième étape de purification utilisant le sulfate d'ammonium par technique de relargage (40-70% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a permis d'augmenter l'AS qui passe de 10120 à 30147 U/mg soit un facteur de purification de 14.5 avec un rendement de 45.74%.

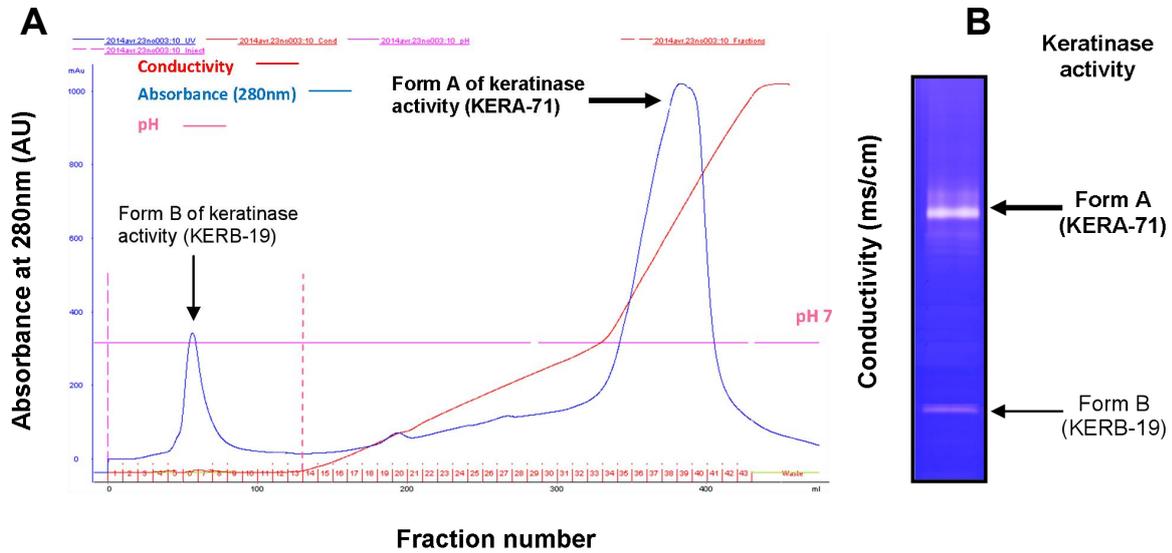
Enfin une dernière étape de purification utilisant la chromatographie d'échange anionique sous système FPLC (fast flow liquid chromatographie) a permis de séparer deux fractions kératinolytiques (KERA-71, KERB-19). Ainsi la KERA-71 est purifiée avec une activité spécifique élevé de 96700 U/mg, soit un facteur de purification de 46.8. La KERB-19 donne une activité spécifique de 42653 avec un facteur de purification de 20.6.

Ces résultats sont confirmés d'une part par zymographie couplé à l'électrophorèse en PAGE-SDS et d'autre part HPLC, ainsi la pureté de la KERA-71 est représentée par la **figure 17** et la KERB-19 est représenté par la **figure 18**.

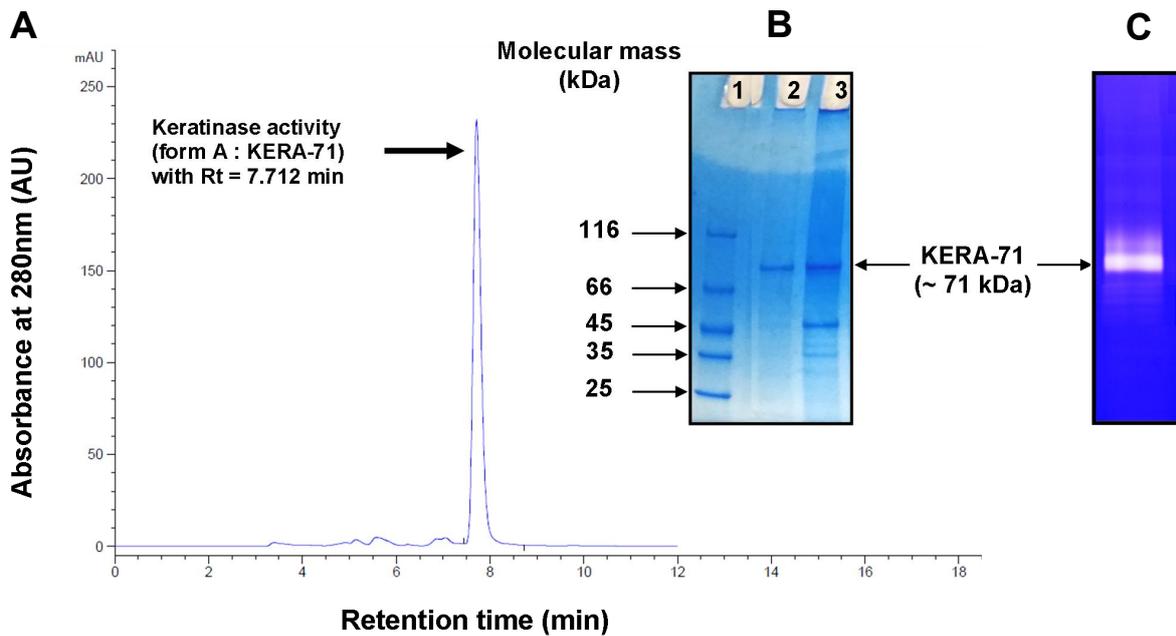
L'analyse des résultats fait apparaître une bande claire sur gel SDS (**figure 17-B**) avec une masse molaire relative ( $M_r$ ) de 71 KD approximativement, correspondante à une activité protéolytique sur le zymogramme pour la KERA-71 (**figure 17-C**), en ce qui concerne la KERB-19, on observe une bande claire sur gel SDS (**figure 18-B**) avec une masse molaire relative ( $M_r$ ) de 19 KD approximativement, correspondante une activité protéolytique sur zymogramme (**figure 18-C**).

Par ailleurs, l'utilisation de l'HPLC a permis de justifier la qualité de pureté des deux enzymes sous forme de deux pics symétriques. Les résultats sont représentés par la figure 26-C pour la KERA-71 et la figure 6-F pour la KERB-19. L'examen de ces figures montre que dans les deux cas, on obtient un pic symétrique dont la forme A est élué à 7.71 minutes et la forme B est élué avec temps de rétention de 4.31 minutes.

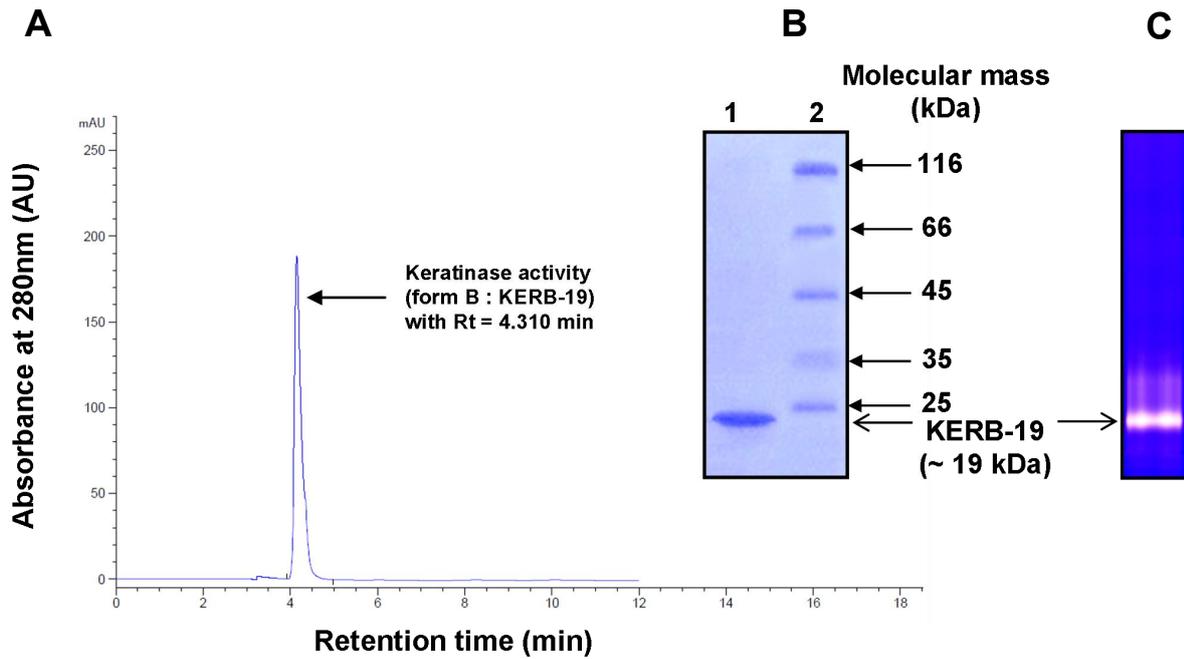
Ces deux formes enzymatiques feront ultérieurement l'objet d'une caractérisation biochimique et moléculaire ainsi que leurs applications biotechnologiques.



**Figure 16 :** **A :** Profil de l'élution de du mélange enzymatique suite à une chromatographie échangeuse de cations, **B :** zymogramme du mélange enzymatique avant la chromatographie



**Figure 17 :** **A :** Chromatogramme de l'HPLC en gel filtration de contrôle de pureté de la KERA-71, **B :** Gel SDS-PAGE (1 : marqueurs de taille ; 2 : fractions actives retenus suite à la FPLC échangeuse de cations ; 3 : mélange enzymatique avant la chromatographie échangeuse de cations), **C :** zymogramme des fractions actives retenus suite à la FPLC échangeuse de cations.



**Figure 18 :** A : Chromatogramme de l’HPLC en gel filtration de contrôle de pureté de la KERB-19, B : Gel SDS-PAGE (1 : fractions actives non retenus suite à la FPLC échangeuse de cations ; 2 : marqueurs de taille), C : zymogramme des fractions actives non retenus suite à la FPLC échangeuse de cations.

**Tableau 14.** Tableau de purification de la KERA-71 de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt20.

Etapas de purification	Proteines (mg) <sup>a,b</sup>	Activité	Activité	Facteur de Purification	Rendeme nt (%)	
		Totale (units) <sup>a</sup> × 10 <sup>3</sup>	Spécifique (U/mg) <sup>a</sup>			
Crude extract	1,645 ± 39	3,295 ± 66	2,067 ± 88	1.0	100	
Heat-treatment (60°C for 30 min)	298 ± 11	3,024 ± 43	10,120 ± 123	4.9	91.77	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation (40-70%)-dialysis	50 ± 5	1a,507 ± 23	30,147 ± 265	14.5	45.74	
Anion-exchange chromatography (UNO Q-12 FPLC)	Forme A	9.1 ± 0.7	880 ± 21	96,700 ± 398	46.8	26.70
	Forme B	4.9 ± 0.1	209 ± 5	42,653 ± 175	20.6	6.34

<sup>a</sup>les expériences ont été réalisé en trois répétitions et l’écart type ± est donné.

<sup>b</sup>Le dosage des protéines a été fait selon la méthode de Bradford.

## 2 Identification de deux activités kératinolytiques (forme A et forme B)

Les deux formes kératinolytiques sont confirmées par le séquençage du N-terminale de chaque enzyme purifiée. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 15**. L'examen de ces résultats sont comparés à d'autres protéases microbiennes pour identifier leur appartenance par alignement bio-informatique (le programme BLASTP, NCBI, NIH, USA).

Ainsi la KERA-71 donne un fragment séquencé N-terminale de 29 acides aminés représenté dans le **tableau 15**. L'alignement de cette séquence a permis de noter une homologie importante avec les kératinases des Actinomycètes: 64% d'homologie avec la protéase à sérine d'*Actinomadura sp. 5-2*, et 65% d'homologie avec type VII serine protease mycosin d'*Actinomadura meyeriae* (**Tableau 15**). En se basant sur ces résultats on peut dire que l'enzyme KERA-71 produite par la souche Cpt20 d'*Actinomadura keratinilytica* est probablement une nouvelle kératinase.

En ce qui concerne la KERB-19, la séquence N-terminale obtenue est constituée de 22 acides aminés différents de la KERA-71 (Tableau 15). L'alignement de cette séquence montre une forte homologie de 90,91% avec une protéase a sérine sécrétée par une souche d'actinomycète (*Nocardiosis sp.TOA-1*) et aussi avec la kératinase produite par la souche *Actinomadura viridilutea* DZ-50. Ces tests confirment que ces deux enzymes sont des kératinases.

Les résultats obtenus corroborent avec ceux des travaux de Hamiche (2019) où deux kératinases sont produites par *Bacillus amyloliquefaciens* S13 avec deux formes kératinolytiques ayant des masses molaires, des pH optimums et des températures optimales différentes. De même que les travaux sur la souche d'actinomycète *Streptomyces sp. AH4* (Touioui et al., 2015) qui produit aussi deux kératinases différentes.

**Tableau 15 :** Alignement de la séquence NH-2 Terminale de la KERA-71 et la KERB-19 avec celles de la banque de données NCBI

Enzyme	Origin	N-terminale amino-acid sequence <sup>a,b</sup>	Identity (%)
<b>KERA-71</b>	<i>Actinomadura</i> <i>keratinilytica</i> Cpt20	MSQAGRRLLPARLGATLSALTTLTAVFVFPV	-
S8 family serine peptidase (WP_067916364)	<i>Actinomadura</i> <i>rubrobrunea</i> NBRC 15275	MS <b>H</b> ADRRLLP <b>VRF</b> GAALSA <b>VAF</b> AAVF	64.00
S8 family serine peptidase (WP_165975702)	<i>Actinomadura</i> sp. H3C3	MSQAGRR <b>RTRRSRPAAR</b> LGAR <b>ST</b> ATLAVLTLTA	60.61
S8 family serine peptidase (WP_132160220)	<i>Actinomadura</i> sp. 7K507	MS <b>E</b> AGRR <b>R</b> PAR <b>AR</b> PATRLGAR <b>T</b> TAAL <b>TAL</b>	59.26
<b>KERB-19</b>	<i>Actinomadura</i> <i>keratinilytica</i> Cpt20	ADIDAGLAYTMGGRC SVGFAAT	-
KERDZ	<i>Actinomadura</i> <i>viridilutea</i> DZ50	ADI <b>R</b> AGLAYTMGGRC SVG <b>NAATNAS</b>	90.91
Serine protease NAPase (Q6K1C5)	<i>Nocardiosis</i> <i>alba</i> TOA-1	ADI <b>I</b> GGLAYTMGGRC SVGFAAT	90.91
S1 family peptidase (WP_017586902)	<i>Nocardiosis</i> <i>ganjiahuensis</i> DSM 45031	ADI <b>I</b> GGLAYTMGGRC SVGFAAT	90.91
Peptidase S1 (WP_017583158)	<i>Nocardiosis</i> <i>valliformis</i> DSM 45023	ADI <b>I</b> GGLAY <b>Y</b> MGGRC SVGFAAT	86.36

### 3 Caractérisation biochimique des deux kératinases (KERA-71 et KERB-19)

#### 3.1 Détermination de la masse molaire (Mr) PAGE-SDS

La détermination des Mr est effectuée par électrophorèse en conditions dénaturantes PAGE-SDS à 15% couplée au zymogramme. Des marqueurs de taille entre 25 et 116 kDa tiennent référence. L'examen de la **figure 17**, montre que la bande protéique monomérique (KERA-71) donne une valeur de 71,63 kDa par comparaison aux différents standards utilisés, par contre la KERB-19 (**figure 18**) donne une Mr de 19 KD qui reste largement inférieure la KERA-71. L'équation de régression (Annexe)  $d(\text{cm}) = f(\text{Log MM})$  vérifie ces résultats. La comparaison de ces résultats aux différents travaux de recherche montre d'abord que la KERA-71 est très différente à la Kératinase (KERAK-29) de la souche d'actinomycète thermophile *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 avec une Mr de 29,23 kDa (A. Habbeche et al., 2014) malgré que les deux souches soient isolées du même milieu écologique en l'occurrence le compost de poulet ce qui peut expliquer l'expression de cette kératinase (KERA-71) est bien différente et cela se traduit par une biosynthèse d'une protéase ayant une taille supérieure à celle de la KERAK-29. En ce qui concerne la KERB-19, celle-ci semble être légèrement proche à la KERAK-29 et très similaire à la KERDZ50 produite par un actinomycète thermophile, la souche *Actinomadura viridilutea* DZ50 isolée du port de pêche de la wilaya de Skikda avec masse molaire de 19,536 kDas des travaux de recherche de (Ben Elhoul et al., 2016). En effet lors de l'alignement du N-terminale on retrouve une similarité entre les deux séquences.

Les tailles de la KERB-19, KERAK-29 et la KERDZ sont largement inférieures à la taille de la KERA-71 produites par des souches d'actinomycète thermophile ce qui explique la diversité de ces kératinases. De même que chez les actinomycètes thermophiles, la souche *Thermoactinomyces sp.*YT06 isolée du compost de poulet produit une Kératinase hétérologue avec une masse molaire de 28 kDa (L. Wang et al., 2019) cette valeur obtenue est plutôt proche de la kératinase KERAK-29 isolée dans notre laboratoire (A. Habbeche et al., 2014). Par ailleurs, L'analyse bibliographique des autres kératinases produites par les Actinomycètes, les bactéries et les champignons, montre que chez les Actinomycètes, les souches *Streptomyces sp* et *Streptomyces albidoflavus* secrètent des kératinases dont les masses molaires sont très faibles par rapport aux autres enzymes kératinolytiques et qui sont respectivement de l'ordre de 13 kDa et 15 kDa (Ivanko et Varbanets, 2004) (Vidmar et Vodovnik, 2018), (P. Bressollier et al., 1999). Ces valeurs sont légèrement proches à la

KERB-19, par contre la KERA-71 avec une masse molaire de 71 kDa laisse penser que cette protéase est une probablement une nouvelle kératinase.

Chez les autres bactéries, le genre *Bacillus* est le plus étudié, les travaux de recherches indiquent que la kératinase de l'espèce *Bacillus altitudinis* RBDV1 (Pawar et al., 2018) a une taille moyenne de 43 kDa. Cela est observé également chez *Bacillus halodurans* PPKS-2 (Prakash et al., 2010) qui secrète deux kératinases de masses molaires de 30 et 66 kDa. De même que l'espèce *Bacillus licheniformis* RPK (Fakhfakh et al., 2009) synthétise une kératinase avec un PM de 32 kDa. D'autres travaux de recherche montrent que divers kératinases de PM moyens différents sont produites par plusieurs bactéries et c'est le cas des kératinases suivantes : 25 kDa chez *Acinetobacter* [(R. X. Zhang et al., 2016), 33 kDa par *Caldicoprobacter algeriensis* (Bouacem et al., 2016), 35 kDa chez *Thermoactinomyces* sp. YT06 (L. Wang et al., 2017). D'autres kératinases avec un PM relativement élevé sont également observés et nous citons la souche *Kocuria rosea* qui produit une kératinase de 240 kDa [(V. K. Gupta et al., 2016)]. Des kératinase à hauts PM sont généralement associés à des microorganismes thermophiles ou sont des métalloprotéases (Bouacem et al., 2016), (Gradisar et al., 2005), (C. Cai & Zheng, 2009), Ainsi, une kératinase produite par la bactérie anaérobique et thermophile *Thermoanaerobacter* sp. 1004-09, isolée dans des sources chaudes dans l'est de la Russie à un PM de 150 kDa (C. Cai & Zheng, 2009).

Chez les champignons, les kératinases produites par ces derniers sont à faible PM qui varie entre 20 et 40 kDa, à titre d'exemples, nous citons les kératinases avec un PM de 37 kDa produite par *Purpureocillium lilacinum* (Cavello et al., 2013), 36 kDa par *A. parasiticus* (T. S. Anitha & P. Palanivelu, 2013), 33 kDa par *P. marquandii*, et 30 kDa in *D. microsporus* (Gradisar et al., 2005). Toutes ces kératinases semblent être proche à la KERB-19, la KERAK-29 et la KERDZ. En revanche, la KERA-71 avec une taille de 71 kDa reste largement supérieures à ces dernières.

### 3.2 Effet du pH sur l'activité et sur la stabilité de KERA-71 et KERB-19

Initialement nous avons étudiés l'effet du pH sur l'activité des deux kératinases et les différents résultats obtenus sont présentés sur la **figure 19** qui montre que les deux kératinases sont actives dans une large gamme de pH avec un optimum d'activité à pH 8 pour la KERA-71 et pH 7 pour la KERB-19. Aux pH acides de 2-5, on observe que la KERB-19 est plus active que la KERA-19 avec 75% d'activité relative obtenue à pH 4 pour la forme B et à pH 6 pour la forme A. Contrairement, aux pH basiques, on constate que la KERA-71 est plus active,

à pH 13, par la suite l'activité s'annule pour les deux enzymes et cela est liée probablement à la dénaturation.

En ce qui concerne le pH optimum, nous constatons que la KERA-71 a un pH optimum de 8 alors la KERB-19 a un pH optimum de 7 soit une différence d'une unité. Ces deux valeurs obtenues sont très proches du pH de milieu de culture, lui-même proche des conditions écologiques du prélèvement de l'échantillon de sol, pH 7,2 (Taibi et al., 2012).

La comparaison des pH optimums de la KERA-71 et la KERB-19 avec celui de la KERAK-29 (pH = 10) produite dans notre laboratoire par une souche d'*Actinomadura* (A. Habbeche et al., 2014) montre que qu'il y a une différence entre les enzymes. De même que pour la KERDZ (Ben Elhoul et al., 2016) bien que sa Mr et son séquence N-terminale sont très proche de la KERB-19, la KERDZ possède un pH optimum de 10 similaires à la KERAK-29. Par ailleurs des travaux de recherche récents (L. Wang et al., 2019) sur la souche d'actinomycète thermophile *Thermoactinomyces* sp. YTO6 isolée du compost de poulet produit une Kératinase dont le pH optimum est 8,5 qui semble similaire au pH optimum de la KERA-71. Aussi nous constatons que la majorité des kératinase microbienne arrive à atteindre une activité maximale dans un intervalle de pH qui varie de 7.0 à 9.0 et cela est observé avec la kératinase de *Bacillus altitudinis* RBDV1 (Pawar et al., 2018), *Bacillus parabrevis* (R. X. Zhang et al., 2016), *Bacillus brevis* (N. Z. Jaouadi et al., 2013), *Bacillus* sp. P45 (Fang, Yong et al 2017), qui ont tous un pH optimum de 8.0; la kératinase de *B. tequilensis* Q7 (Zarai Jaouadi et al., 2015), *C. algeriensis* (Bouacem et al., 2016), *A. parasiticus* (T. S. Anitha & P. Palanivelu, 2013) avec un pH optimum de 7.0; la kératinase of *B. licheniformis* RPK (Fakhfakh et al., 2009) avec un pH optimum de 9.0. Ces pH semblent être alignés avec les pH optimums de la KERA-71 et la KERB-19.

Cependant, certaines enzymes ont un pH optimum en dehors de cet intervalle avec une activité maximale situé dans un pH très basique comme on as pu voir avec la KERAK 29 et nous citons aussi la kératinases obtenue de *Bacillus halodurans* PPKS-2 avec pH optimum de 11.0. La valeur la plus élevée du pH optimum rapporté par la littérature est de 12.5 de la kératinase produite par *Nocardioopsis* sp. TOA-1 (B. Jaouadi et al., 2010).

Des pH optimums dans milieu légèrement acide ont été aussi rapporté, notamment la kératinase synthétisé par *Baacillus subtilis* MTCC (9102) qui exhibe une activité maximale dans un pH de 6.0 (S. Balaji, 2008). L'activité relative (ARv) de la KERB-19 dans les milieux acides avec une activité relative supérieurs à 50% à partir de pH 2,5 semble être une propriété très intéressante, notamment dans les processus industriels à pH acide.

En ce qui concerne l'effet du pH sur la stabilité de la KERA-71 et la KERB-19, celle-ci est déterminée par une préincubation dans des tampons à différents pH pendant 24 h. Les activités kératinolytiques résiduelles sont mesurées dans les conditions optimales de température et de pH de l'enzyme. L'analyse des résultats obtenus représentés par la **figure 20** pour la KERA-71 et **figures 21** pour la KERB-19.

On observe que la KERA-71 est plus stable sur les pH acides par rapport au pH basique et neutre. Après 8 heures (h) d'incubation, La KERA-71 perd 70% de son activité résiduelle (ARs) à pH 11 et 30% à pH 10 alors qu'elle garde presque 100% de son ARs sur une gamme de pH allant de 6 à 9. Après 22h la KERA-71 atteint 50% d'ARs a pH 8 qui est son pH optimum d'activité, alors qu'elle perd totalement son ARs à ce stade sur les pH allant de 9 à 11. Par ailleurs, la KERA-71 présente une très bonne stabilité à pH 6 avec une demi vie de 30h ce qui est considérable, mais cette dernière perd entièrement son ARs après 36h d'incubation sur tous les pH.

En ce qui concerne la KERB-19, comme la KERA-71, elle est plus stable en pH acides qu'en pH basique ou neutre et présente un profil similaire à la KERA-71. On observe notamment que la KERB-19 est très stable a pH 5 et pH 4 avec des demi-vies de 28 et 32 h respectivement.

Ces résultats est similaire à la KERAK-29 et la KERDZ qui sont respectivement isolées chez deux souches d'actinomycètes thermophiles en l'occurrence *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 (A. Habbeche et al., 2014) et *Actinomadura viridilutea* DZ50 (Ben Elhoul et al., 2016). En effet, plusieurs enzymes kératinolytiques sont stables dans un large intervalle de pH (Cavello et al., 2013), (Bouacem et al., 2016), (Kublanov et al., 2009), (Liu et al., 2013), avec la kératinase obtenue de *Bacillus halodurans* PPKS-2 qui reste active entre pH 7.0-13.0 pendant 24 h (Prakash et al., 2010) et celle obtenue de *Streptomyces sp.* AB1 qui garde sa stabilité entre un pH 4.0–11.0 pendant 96 h (daniel J. Daroit, 2010).

En effet, dans le domaine de la biotechnologie, ces deux paramètres (pH optimum et stabilité) conditionnent leur utilisation en particulier dans la détergence. Par ailleurs, la KERA-71 avec un pH optimum de 8 et la KERB-19 avec un pH optimum de 7 pourrons faire l'objet d'utilisation dans la bioconversion des déchets (cheveux, carapaces, ongles) en kératine ce qui permet de valoriser cette biomasse en valeur ajoutée tels que l'obtention d'hydrolysats d'acides aminés essentiels ou dans l'industrie de cuir. Ce type de biotechnologie enzymatique blanche

pourra contribuer à diminuer la pollution de l'environnement souvent très contaminé par les déchets.

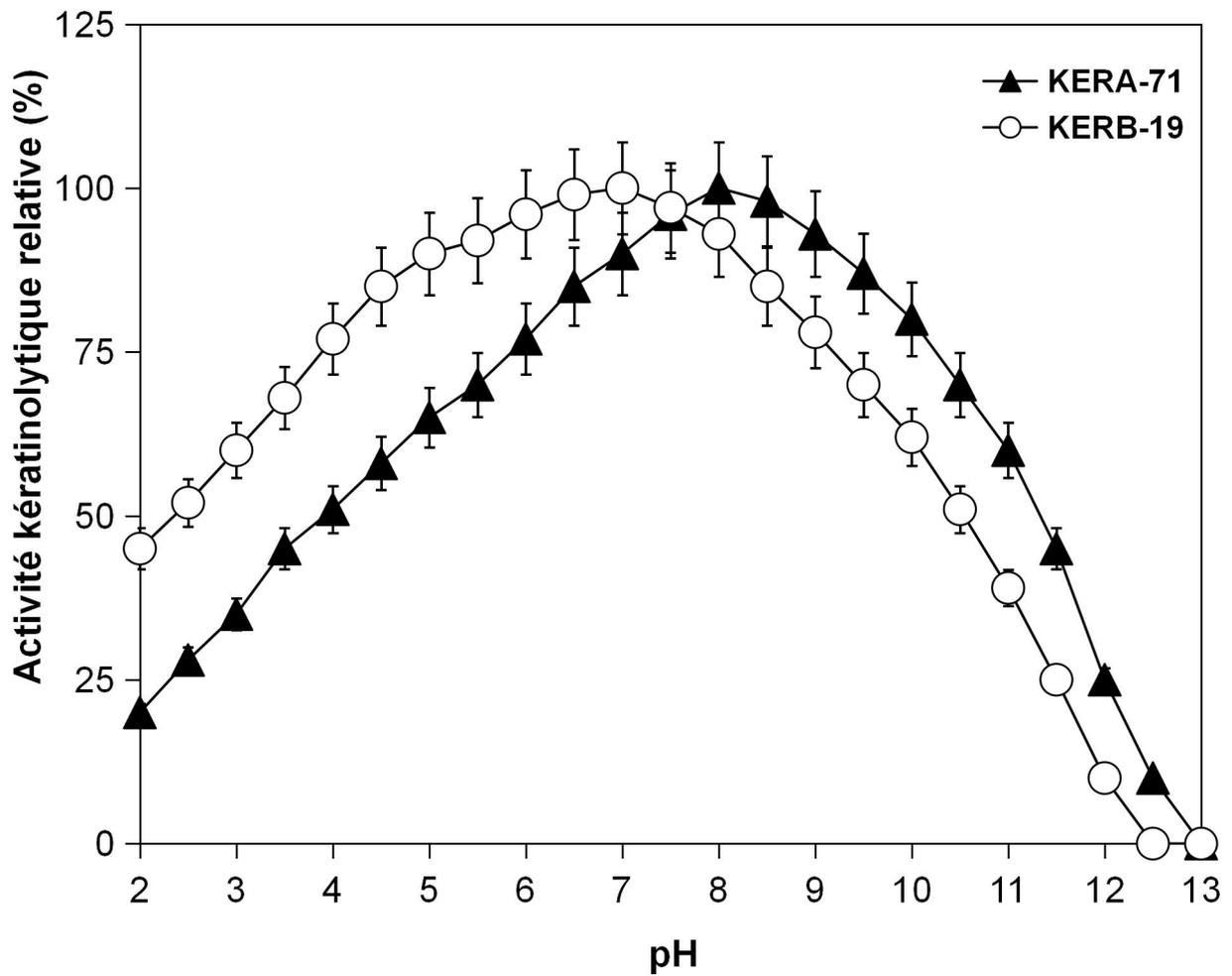


Figure 19 : Détermination des pH optimum de la KERA-71 et KERB-19.

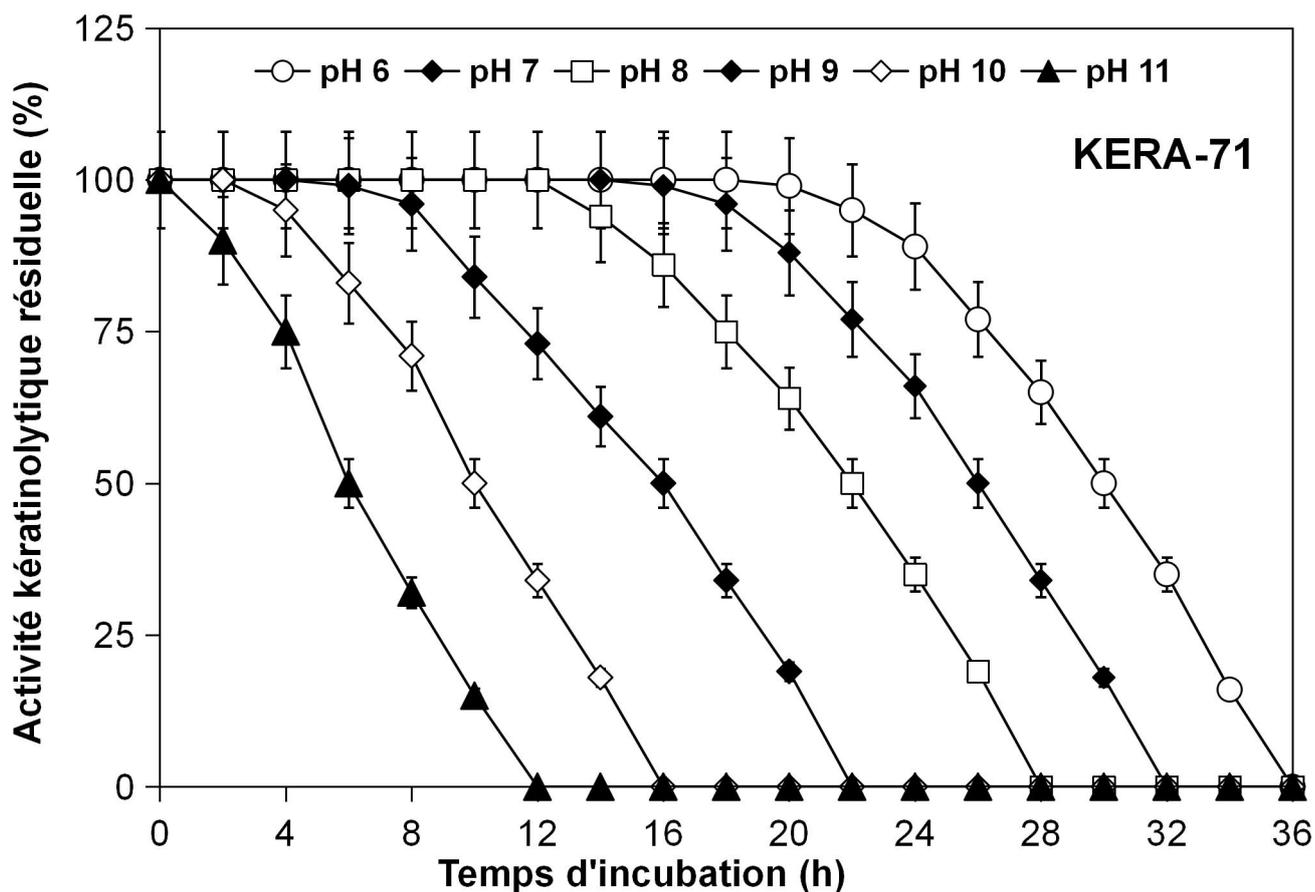


Figure 20 : Effet du pH sur la stabilité de KERA-71.

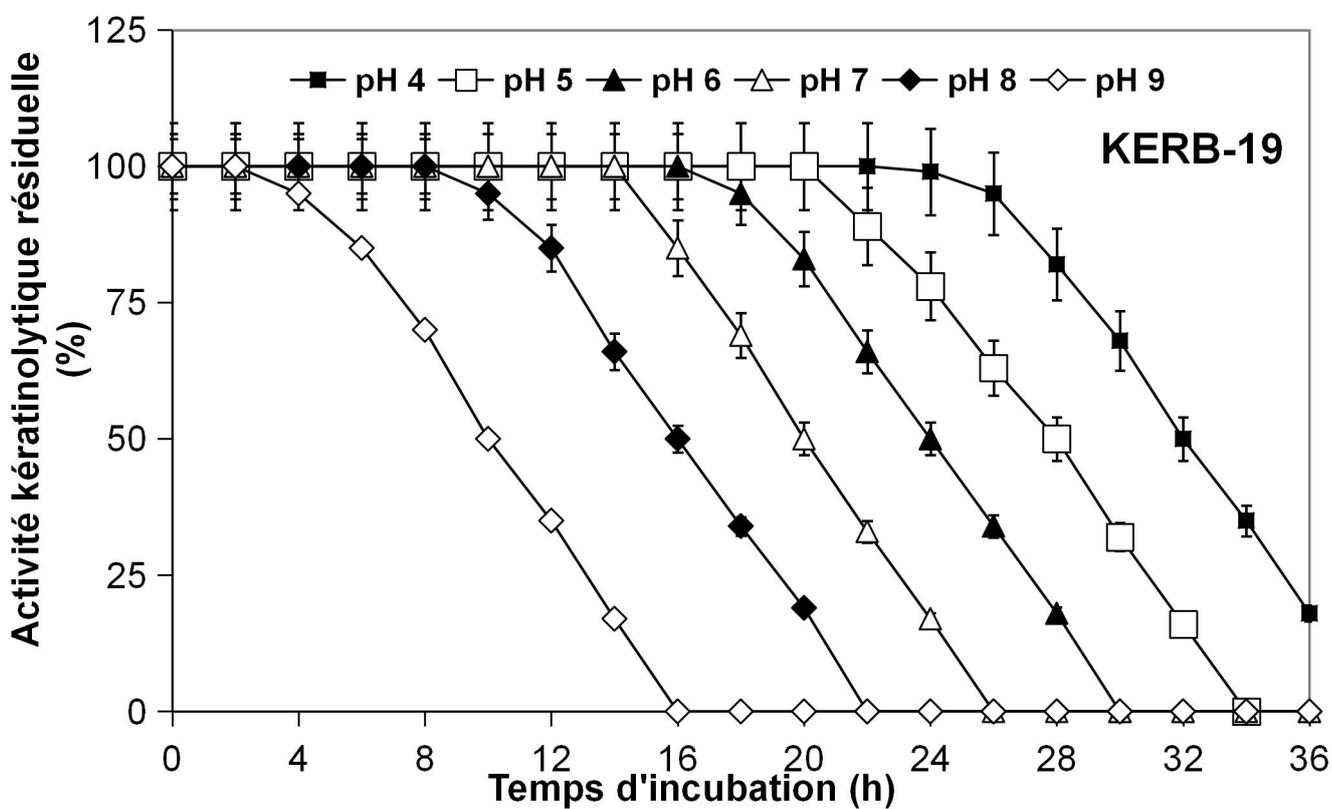


Figure 21 : Effet du pH sur la stabilité de KERB19.

### 3.3 Effet de la température (T°) sur l'activité et sur la stabilité de KERA-71 et KERB-19

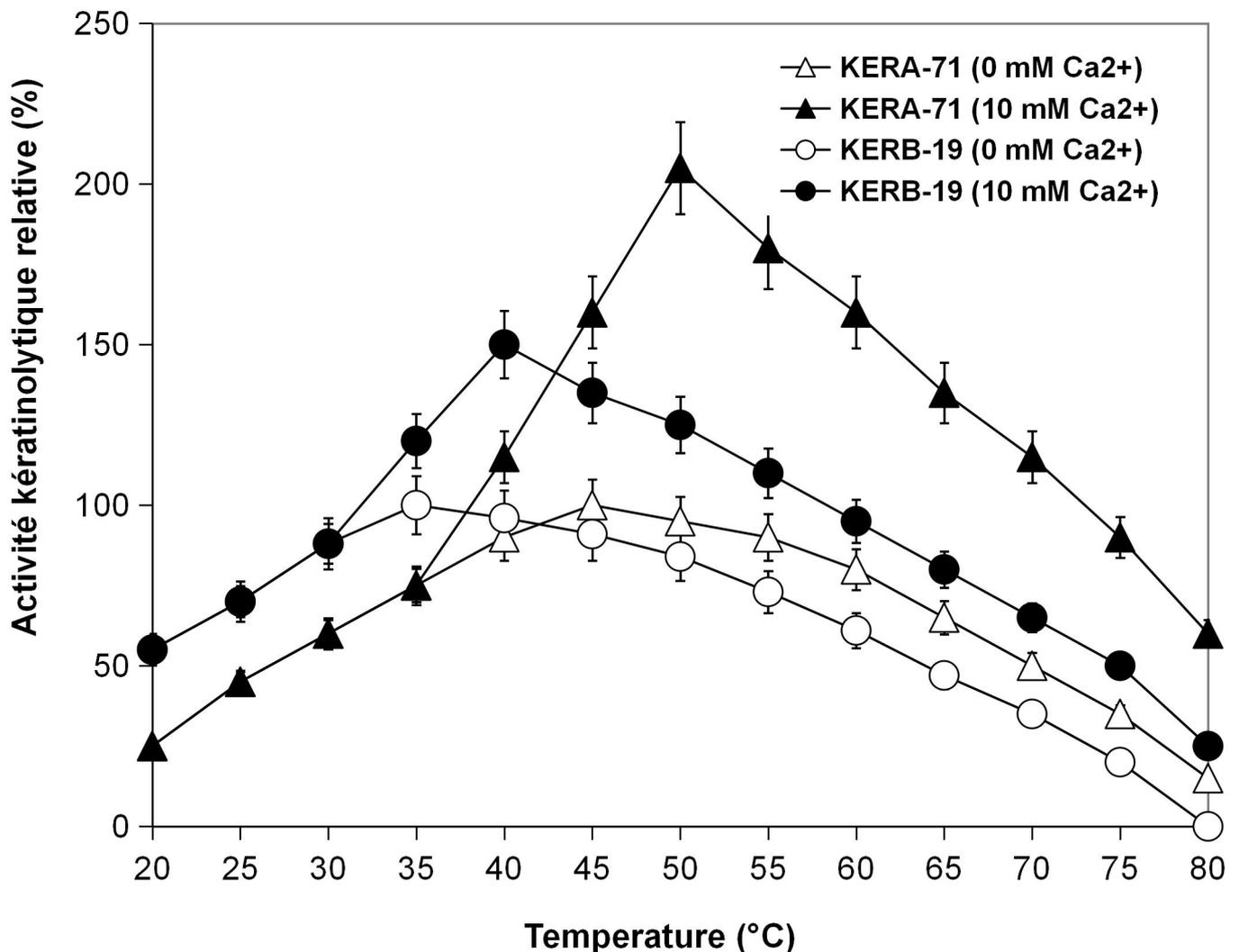
L'étude de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité de la KERA-71 et la KERB-19 est réalisée aux pH optimums respectifs. A cet effet, des températures sélectionnées et allant de 20 à 80 °C sont testées en présence et absence du CaCl<sub>2</sub> à une concentration de 10 mM. Les différents résultats obtenus sont représentés par les **figures 22, 23 et 24**.

L'analyse de la courbe (**Figure22**) montre qu'en absence du calcium la KERA-71 et la KERB-19 sont actives sur une large gamme de température avec une ARs supérieurs à 50% entre 35°C et 65°C pour les deux enzymes, et un maximum d'activité à 45 °C pour la KERA-71 et 35°C pour la KERB-19. A partir de 65°C, nous remarquons que l'activité commence à diminuer en dessous des 50% et l'activité de la KERB-19 s'annule complètement et la KERA-71 garde seulement 15% à 80 °C, ce qui explique la dénaturation de l'enzyme. On pourra conclure que les deux enzymes sont bien actives entre 30 °C et 50 °C et cela en absence de calcium.

L'étude de l'addition du calcium à une concentration 10mM montre que l'activité de la KERA-71 et KERB-19 sont améliorées et donnent une ARs maximale de 205 % soit un facteur de gain de 2 approximativement pour la KERA-71 à 50°C et une ARs maximale de 150 % pour la KERB-19 à 40°C. Aussi, on observe qu'en présence d'ions de calcium, la température optimale a été décalé de 5°C, de 45°C à 50°C pour la KERA-71 et de 35°C à 40°C pour la KERB-19. Ces différents résultats obtenus montrent que les activités de la KERA-71 et la KERB-19 sont dépendantes de la présence de l'ion Ca<sup>++</sup>(Calcium).

La comparaison de ces résultats avec la KERDZ de la souche *Actinomadura viridilutea* DZ50 donne le même résultat, mais par contre la KERDZ est activée par le calcium à une concentration de 2 mM(Ben Elhoul et al., 2016). Contrairement, la KERAK-29 de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt 29 est activé par le Mn<sup>2+</sup> qui est le facteur impliqué dans l'activation de l'enzyme (A. Habbeche et al., 2014). Par ailleurs dans la littérature nous avons trouvé que la température optimale des kératinases est très diverse et souvent dépendante du microorganisme sécréteur et des conditions de culture (Bouacem et al., 2016), (Liu et al., 2013), (P. Bressollier et al., 1999). Cependant, l'activité maximale de l'enzyme est observée à une température supérieur à celle des conditions de culture du microorganisme producteur [(Fakhfakh et al., 2009), (T. S. Anitha & P. Palanivelu, 2013), (Prakash et al., 2010)]. Ainsi, nous signalons que la kératinase d'*Actinomadura viridilutea* DZ50 exhibe une activité maximale à 80° C, alors la température optimale de production est de 45° C (Ben Elhoul et al.,

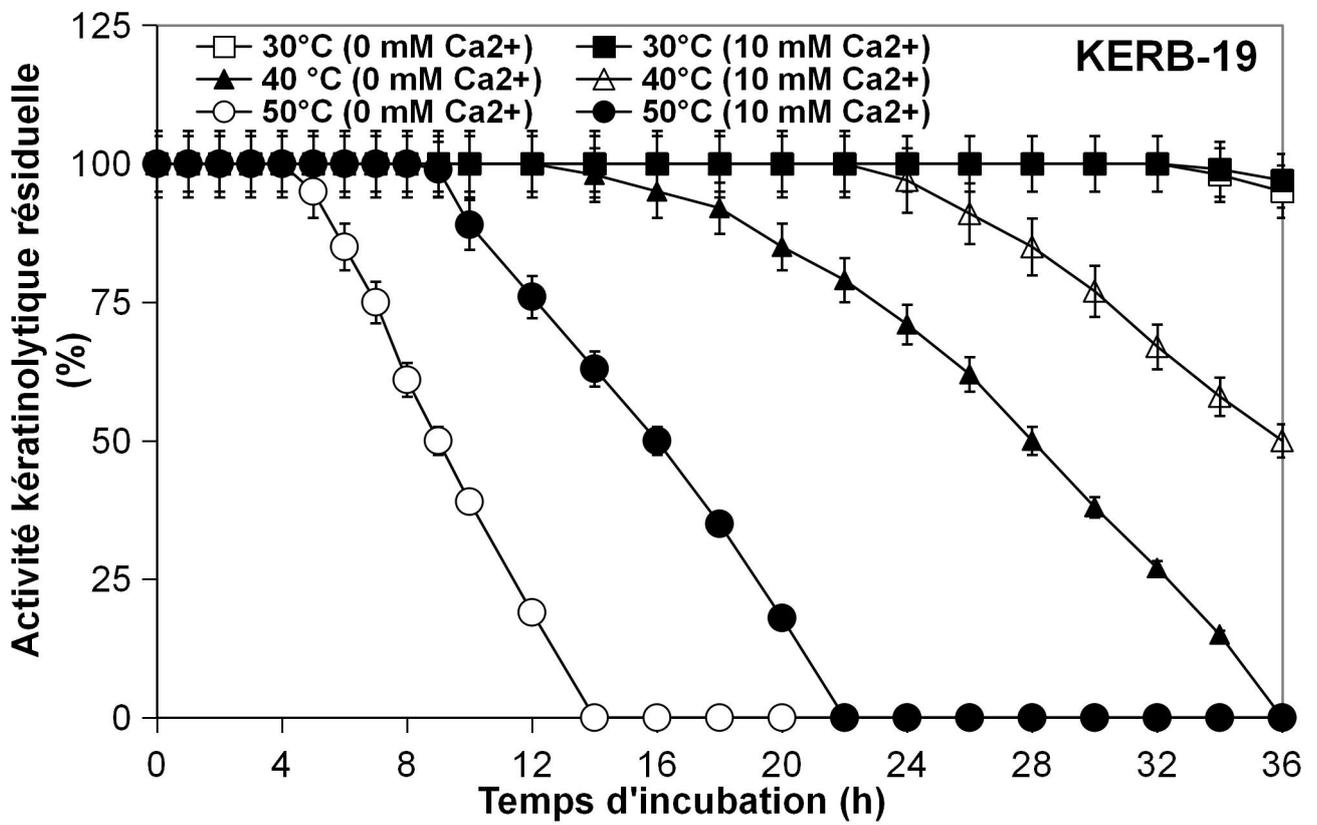
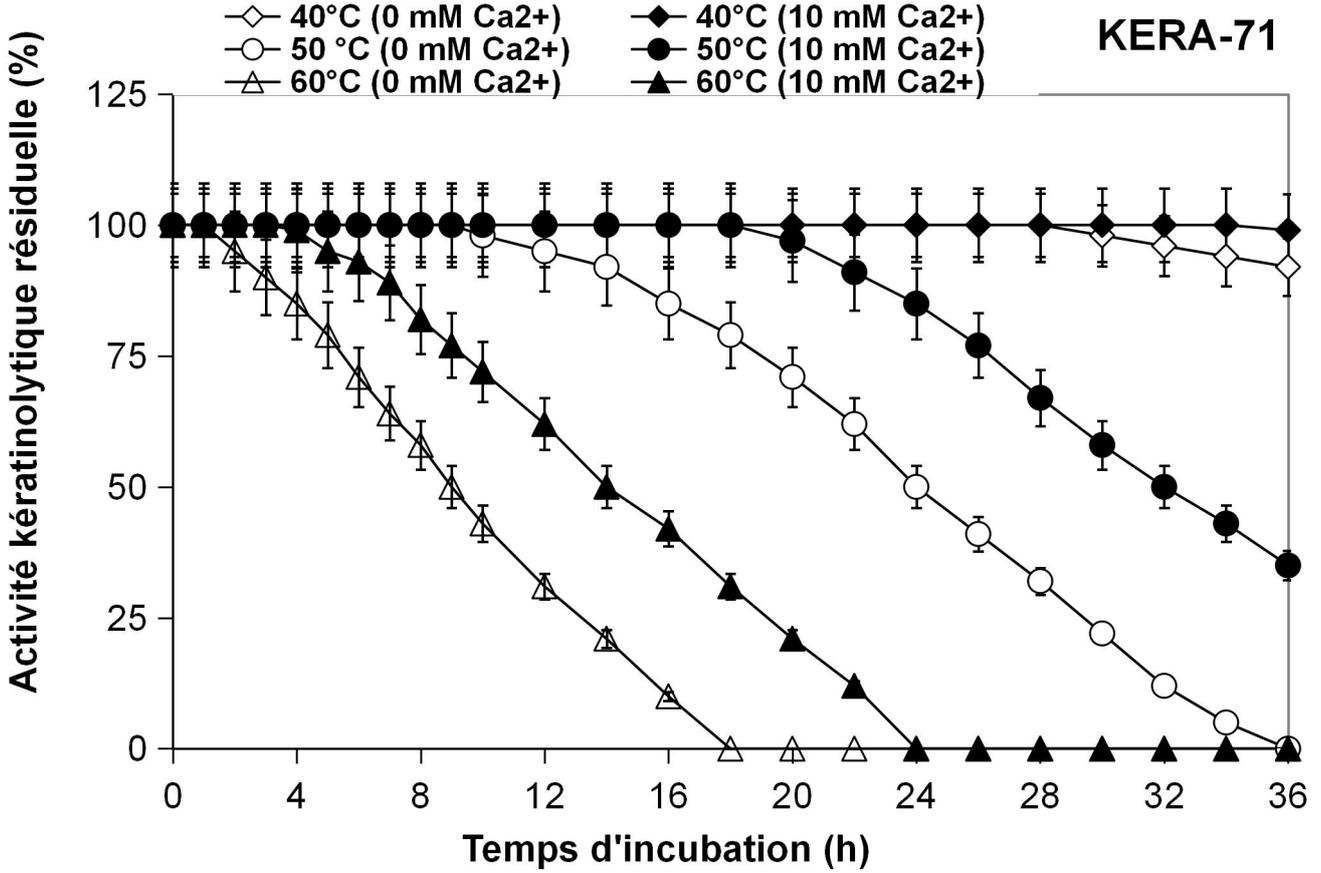
2016), la kératinase synthétisée par *Nocardiosis* sp. TOA-1 à une température de 30° C, est active à une température optimale de 60°C (Mitsuiki et al 2002). Les Enzymes issus de microorganismes thermophiles, en l'occurrence, *Streptomyces* sp. strain AB1, *A. viridilutea* DZ50, *B. altitudinis* RBDV1 ont une température optimale de, 75 C (daniel J et al 2010), 80 °C (Ben Elhoul et al., 2016), and 85 °C (Pawar et al., 2018), respectivement, alors que les cultures mésophiles montrent une activité maximale à une température qui ne dépasse pas 40° C (B. Jaouadi et al., 2013), (Barman et al., 2017),(Liu et al., 2013). La température la plus faible est de 30°C, observée chez l'espèce *Bacillus tequilensis* Q7 (Zarai Jaouadi et al., 2015) et la plus élevée est obtenue chez des microorganismes hyperthermophiles isolées de source thermale qui exhibe une activité maximale à une température de 100 °C (Wu et al., 2017).



(Kanoksilapatham. & Intagun, 2017).

**Figure 22 :** Effet de la température sur les KERA-71 et KERB-19 produites par la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 en présence et en absence de Ca<sup>++</sup>.

Figure 23 : Etude de la thermostabilité de l'enzyme KERA-71.



**Figure 24** : Etude de la thermostabilité de l'enzyme KERB-19.

En ce qui concerne l'étude de la thermolabilité, les températures testées sont en corrélation directe avec la température optimale, on a testé trois températures avec la température optimale au centre pour chaque enzyme. Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure 23** pour la KERA-71 et **figure 24** pour la KERB-19. On constate qu'en absence de calcium, les résultats indiquent que le temps de demi-vie de la KERA-71 est de 9 h à 60 °C, 24h à 50 °C et qu'elle reste très stable à 40°C avec approximativement 100% de son ARs après 36h. En ce qui concerne la KERB-19, on observe que cette dernière garde 50% de son ARs après 9 h à 50 °C, 28 h à 40 °C et qu'elle ne perd que 5% de son ARs après 36h à 30 °C.

En revanche l'addition du calcium à 10mM augmente considérablement la thermostabilité pour les deux enzymes. Ainsi, pour la KERA-71, le temps de demi-vie à 60°C passe à 14 h soit un gain de 5 h, à 50 °C on observe une demi-vie de 32h, et donc un gain de 8 h et pour finir, à 40 °C, ou la demi-vie n'a pu être déterminée du fait qu'elle est supérieure à 36 h. De même pour la KERB-19 ou les temps de demi-vie ont été décalé par 7 h et 8 h à 50 °C et 40 °C respectivement.

Les résultats obtenus sont donc très intéressants, cependant leur utilisation dans la bio-industrie doit se faire à des températures modérées. La comparaison de nos résultats à la KERAK-29 et la KERDZ semblent avoir des profils différents, la Cpt29 produit des protéases qui fonctionnent à des températures 70, 80, 90 °C lui conférant ainsi, des applications dans la détergence ce qui n'est pas le cas la KERA-71. De même pour ce qui est de la KERDZ, aux températures, 70, 80, 90 et 100°C et en présence de calcium, les demi-vies sont respectivement 23 h, 16 h, 8 h et 4 h. Cependant la KERA-71 et KERB-19 fonctionnent à des températures modérées et peuvent trouver des applications dans de nombreux processus biotechnologiques, notamment la valorisation des déchets riche en kératine.

La stabilité thermique de la plupart des kératinases augmentent en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Fakhfakh et al., 2009), (N. Z. Jaouadi et al., 2013), alors d'autres en présence d'ions  $\text{Mg}^{2+}$  [(Ramakrishna Reddy et al., 2017), 71] ou  $\text{Mn}^{2+}$  [(A. Habbeche et al., 2014),(Pawar et al., 2018), (Mitsuiki et al., 2002)]. On a pu remarquer aussi les ions  $\text{Ca}^{2+}$  n'ont pas affecté l'activité de la kératinase sécrétée par *Thermoanaerobacter* sp. 1004-09, mais a considérablement augmentée sa stabilité thermique de 10 min à 13 h à une température de 94°C (Kublanov et al., 2009). Aussi la kératinase sécrétée par *Meiothermus taiwanensis* WR-220 est connu d'avoir deux site liaison pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Wu et al., 2017) et l'élimination des ions  $\text{Ca}^{2+}$  réduit significativement la thermostabilité de l'enzyme. Et donc le rôle  $\text{Ca}^{2+}$  est peut-être

liée à la stabilisation de la structure tridimensionnelle des kératinase en le protégeant du milieu extérieur. Cette thermostabilité confère à ces enzyme une grande utilisation dans la détergence et autre applications biotechnologique.

### 3.4 Effet d'inhibiteurs et différents ions métalliques sur la stabilité des deux kératinases

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de deux inhibiteurs spécifiques (PMSF et DFP) sur l'activité de la KERA-71 et la KERB-19. Ces deux inhibiteurs nous permettent de mieux comprendre les acides aminés impliqués dans la triade catalytique. En effet, les protéases (protéases à serine, protéases à cystéine et etc) sont classées selon leur sensibilité aux inhibiteurs (RadhaS., et Gunasekara P., 2009). Les différents résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 9**. L'examen des résultats montrent qu'à une concentration de 5mM de PMSF et de DFP, les deux enzymes sont totalement inhibées. Ces deux inhibiteurs se fixent spécifiquement sur la fonction thiol (-SH) dans la structure du site actif, en l'occurrence la serine ce qui montre que les deux kératinases se classent parmi les protéases à serine. Ces résultats sont bien similaires à la KERAK-29 (A. Habbeche et al., 2014) qui est aussi une kératinase à sérine produite par le même genre *Actinomadura* isolées du même milieu. Par ailleurs les autres inhibiteurs utilisés le NEM, et le DTNB spécifiques à la cystéine ont montré une très faible inhibition non significative de l'ordre de 3 % et 2 % ce qui laisse penser que la cystéine ne figure pas dans le site actif des enzymes (A et B) En effet, ces réactifs se fixent essentiellement sur le résidu Cys et change la structure 3D de la protéine lui conférant ainsi une structure peu adaptée au substrat. Selon les travaux de recherche (Ben Elhoul et al., 2016), la KERDZ purifiée est partiellement inhibée par ces deux inhibiteurs NEM et DTNB et l'enzyme contient son site actif un résidu cystéine. En revanche chez la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29, la KERAK-29 n'est pas inhibée par ces réactifs et la structure ne contient pas la cystéine dans le site actif ce qui montre que la KERA-71 et la KERB-19 sont plutôt proche de la KERAK-29 que la KERDZ dans le mécanisme d'hydrolyse de substrats. En ce qui concerne l'EDTA, qui est un agent chélateur des métaux, on remarque qu'il n'ya aucun effet inhibiteur sur la KERA-71 et KERB-19 et l'activité reste à 95 % et donc nos enzymes ne sont pas des métalloprotéases. En effet, l'insensibilité aux chélateurs serait très précieuse pour des applications potentielles dans le domaine de la détergence du fait que ces agents sont ajoutés comme des adoucisseurs d'eau et détachants (Haddar A et al, 2009).

L'étude de quelques ions métalliques bivalents et monovalents ( $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) ;  $\text{Mn}^{2+}$  ( $\text{MnSO}_4$ ) ;  $\text{Ba}^{2+}$  ( $\text{BaCl}_2$ ) ;  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{MgSO}_4$ ) ;  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$ ) ;  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) ;  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4$ ) ;  $\text{NH}_4^+$  ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) ;

$K^+$  (KCl)  $Co^{2+}$  ( $CoCl_2$ ) ;  $Hg^{2+}$  ( $HgCl_2$ ) ;  $Cd^{2+}$  ( $CdCl_2$ ) ;  $Li^+$  ( $LiSO_4$ ) et  $Ni^{2+}$  ( $NiCl_2$ ) indiquent que seulement deux ions bivalent  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  augmentent à la fois le niveau d'activité de la KERA-71 et la KERB-19 à une concentration de 10 mM. (**Tableau 16**). L'ion calcium semble être plus efficace et donne une valeur de 205 %, soit un ratio de 2,06 fois pour la KERA-71 et un ratio 1.5 fois pour la KERB-19 par rapport aux témoins. Un ratio de 1,26 fois est enregistré suite à l'addition magnésium pour la KERA-71 et un ratio de 1.07 pour la KERB-19.

En effet, non seulement les ions métalliques exercent un effet protecteur sur l'enzyme contre la dénaturation thermique, jouant ainsi un rôle essentiel dans le maintien de sa conformation native à une température plus élevée (Kumar & Takagi, 1999), mais aussi, comme les résultats le montre, ces ions métalliques augmentent l'activité probablement par stabilisation de la forme active des enzymes (Victoria & K, 2018) (Bouacem et al., 2016).

Les résultats obtenus sont comparés aux travaux de recherche de (A. Habbeche et al., 2014) et (Ben Elhoul et al., 2016), qui ont travaillé sur le genre *Actinomadura* et qui ont caractérisé deux kératinases KERAK-29 et KERDZ respectivement. Ainsi, la KERAK-29 de la souche *Actinomadura keratinolytica* Cpt 29 isolées du compost de poulet est stimulée par le manganèse, le calcium et le magnésium. Cependant, le manganèse est plus activateur que les autres avec une valeur 210 % soit une ration de 2,10. En ce qui concerne la KERDZ produite par *Actinomadura viridilutea* DZ50 isolée du port de pêche de Skikda (Ben Elhoul et al., 2016), les travaux indiquent que le calcium, le magnésium et le fer stimulent l'activité kératinolytique de l'enzyme, cependant, c'est le calcium à 2 mM qui active le plus la réaction enzymatique avec un taux de 270 % soit un facteur de 2,7 fois plus. Ainsi, on pourra conclure que bien que la KERA-71, KERB-19 et la KERAK-29 soient isolées du même milieu écologique (compost de poulet), la KERA-71 et KERB-19 sont plus proche de la KERDZ du fait que les deux kératinases sont sensibles à l'addition du calcium mais à des concentrations différentes.

**Tableau 16.** Effet de différents inhibiteurs et ions métalliques sur l'activité de la KERA-71 et KERB-19.

Composés	Activité kératinolytique résiduelle (%) <sup>a</sup>	
	KERA-71	KERB-19
<b><i>Ions métalliques (10 mM)</i></b>		
Aucun	100 ± 2.5	100 ± 2.5
Ca <sup>2+</sup> (CaCl <sub>2</sub> )	205 ± 4.6	150 ± 3.1
Mg <sup>2+</sup> (MgSO <sub>4</sub> )	126 ± 2.9	107 ± 2.6
Mn <sup>2+</sup> (MnSO <sub>4</sub> )	108 ± 2.6	97 ± 2.4
Zn <sup>2+</sup> (ZnSO <sub>4</sub> )	102 ± 2.5	120 ± 2.8
Fe <sup>2+</sup> (FeSO <sub>4</sub> )	95 ± 2.3	117 ± 2.7
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (NH <sub>4</sub> ·SO <sub>4</sub> )	78 ± 1.8	93 ± 2.2
Cu <sup>2+</sup> (CuSO <sub>4</sub> )	66 ± 1.4	88 ± 2.1
Co <sup>2+</sup> (CoCl <sub>2</sub> )	60 ± 1.3	65 ± 1.4
Ba <sup>2+</sup> (BaCl <sub>2</sub> )	73 ± 1.5	77 ± 1.8
Ni <sup>2+</sup> (NiCl <sub>2</sub> )	0 ± 0.0	0 ± 0.0
Hg <sup>2+</sup> (HgCl <sub>2</sub> )	0 ± 0.0	0 ± 0.0
Cd <sup>2+</sup> (CdCl <sub>2</sub> )	0 ± 0.0	0 ± 0.0
K <sup>+</sup> (KCl)	101 ± 2.5	110 ± 2.6
Li <sup>+</sup> (LiSO <sub>4</sub> )	99 ± 2.5	105 ± 2.6
<b><i>Inhibiteurs/ agents réducteurs</i></b>		
None	100 ± 2.5	100 ± 2.5
SBTI (5 mg/mL)	102 ± 2.5	101 ± 2.5
TPCK (1 mM)	92 ± 2.2	95 ± 2.3
TLCK (1 mM)	98 ± 2.5	99 ± 2.5
2-ME (5 mM)	65 ± 1.4	70 ± 1.5
DL-DTT (2 mM)	59 ± 1.2	64 ± 1.3
NEM (2 mM)	97 ± 2.4	96 ± 2.4
Iodoacetamide (5 mM)	61 ± 1.3	66 ± 1.4
DTNB (10 mM)	43 ± 0.7	51 ± 1.0
Leupeptin (50 µg/mL)	101 ± 2.5	102 ± 2.5
Pepstatine A (10 µg/mL)	100 ± 2.5	98 ± 2.5
EDTA (10 mM)	95 ± 2.3	101 ± 2.5
EGTA (2 mM)	71 ± 1.5	85 ± 2.0
PMSF (5 mM)	0 ± 0.0	0 ± 0.0

DFP (5 mM)	0 ± 0.0	0 ± 0.0
------------	---------	---------

<sup>a</sup> Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions et les erreurs types sont signalées.

### 3.5 Détermination de la spécificité des deux kératinases vis-à-vis des substrats

La spécificité de clivage de la KERA-71 et KERB-19 vis-à-vis de divers substrats protéiniques a été étudiée. Les différents résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 17**. L'examen de ce tableau indique que la kératine (farine de plume) et la kératine azure (commerciale) sont les plus efficacement hydrolysées par KERA-71 et KERB-19 par rapport aux autres substrats protéiniques avec une activité relative de 100%. Les autres substrats protéiniques sont relativement dégradés. Ainsi, la gélatine est hydrolysée à 92%, l'hémoglobine à 83% et l'albumine à 71% par la KERA-71 et 88%, 80% et 75% respectivement par la KERB-19 ce qui est considérable. Les autres substrats (fibrine et élastine) sont relativement faiblement hydrolysés par la KERA-71 et la KERB-19. Ceci démontre qu'à la fois KERA-71 et KERB-19 avec leurs spécificités à la kératine sont des candidates potentielles pour la dégradation et le recyclage des déchets à base de kératine dont leur dégradation reste difficile pour les autres protéases et très polluante si on utilise les processus chimiques.

En ce qui concerne les peptides synthétiques, sous forme de tripeptide ou tétrapeptide avec des séquences bien définies. L'analyse de ces résultats montrent que la séquence Suc-Tyr-Leu-Val-pNA est le plus dégradé par les deux enzymes suivi par N-Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA avec une activité relative de 100% et 97% respectivement, ce qui explique la spécificité préférentielle sur les acides aminés Tyrosine, Leucine, Valine et Aussi l'Alanine, pour les autres peptides riches en Ala mais avec la présence d'autres acide aminé, en l'occurrence : Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Phe-pNA, N-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Val-pNA, N-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Val-Ala-pNA, N-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Phe-pNA, N-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Leu-pNA ou les activités relatives sont relativement plus faible avec des activité entre 85 et 20% . A ce titre, on peut dire que la présence de proline semble inhiber la KERA-71 et la KERB-19 possiblement à cause de la conformation tri dimensionnelle de la proline et cela se traduit par des activités relatives très faibles (**Tableau 17**). On peut dire aussi que nos deux enzymes semblent avoir les mêmes préférences de clivage.

Les kératinases sont capable cliver une large gamme des substrats kératinique, en l'occurrence la kératine des plumes [(A. Habbeche et al., 2014), (L. Wang et al., 2017) (Laba et al., 2015; Tiwary & Gupta, 2010), (Mitsuiki et al., 2002)], laine [(R. X. Zhang et al., 2016)], poils

humaines [(Gradisar et al., 2005)] et poils d'animaux, sabots [(Tiwary & Gupta, 2010)], cornes [(M. A. Abdel-Naby et al 2017)], azokératine [(daniel J. Daroit, 2010)], kératine azurée [(N. Z. Jaouadi et al., 2013), (Fang et al., 2017), (daniel J. Daroit, 2010), (Mitsuiki et al., 2002)]. De plus, certaines kératinases dégradent le collagène [(M. A. Abdel-Naby et al., 2017),(S. Gupta et al.,2017)], élastine [(N. Z. Jaouadi et al., 2013), (H. H. Lin, Yin, & Jiang, 2009)], gélatine [ (N. Z. Jaouadi et al., 2013), (Liu et al., 2013), (Mitsuiki et al., 2002)], albumine [(N. Z. Jaouadi et al., 2013), (Liu et al., 2013), (S. Gupta et al., 2017)], hémoglobine [(N. Z. Jaouadi et al., 2013), (Laba et al., 2015)], la fibrine [(Laba et al., 2015)] et l'azocaséine [(N. Z. Jaouadi et al., 2013), (T. S. Anitha & P. Palanivelu, 2013)]. La spécificité du substrat de kératinase dépend sur les propriétés chimiques des substrats. La kératine étant constituée de 50 à 60% d'acides aminées hydrophobes et acides aminés aromatiques, d'où la spécificité des kératinases à couper principalement des liaisons peptidiques contenant des acides aminés hydrophobes et aromatiques [4, (H. H. Lin et al., 2009)]. L'Etude d'hydrolyse utilisant une chaîne B d'insuline oxydé comme substrat a montré que les kératinases de *Thermoanaerobacter sp.* 1004-09 et *P. aeruginosa* KPI et KP2 peuvent sélectivement hydrolyser les liaisons formées par la phénylalanine, valine, tyrosine ou leucine [(R. Gupta et al., 2013)].

La spécificité de ces kératinases a été déterminée en utilisant des substrats synthétiques, tels les dérivés acides comme les p-nitroanilides (pNA), p-nitrophényl esters (ONp) et dérivés de 7-amino-4-méthylcumarine (AMC). Les résidus dans les postes P2 et P3 jouent également un rôle. La kératinase KerS14 de *Bacillus subtilis* clive principalement les liaisons peptidiques avec Arg en position P1, Gly et Ala en position P2, Gln ou Glu en position P3 [(V. K. Gupta et al., 2016)].

**Tableau 17.** Etude de la spécificité de la KERA-71 et la KERB-19 sur différents substrats protéiques et sur peptides synthétiques.

Substrat	Concentration	Activité kératinolytique relative (%) <sup>a</sup>	
		KERA-71	KERB-19
<i>Protéines naturelles</i>			
Kératine	20 g/L	100 ± 2.5	100 ± 2.5
Gélatine	20 g/L	92 ± 2.2	88 ± 2.1
Hémoglobine	20 g/L	83 ± 2.0	80 ± 1.9
Albumine	20 g/L	71 ± 1.5	75 ± 1.7
Caséine	20 g/L	85 ± 2.0	92 ± 2.3
Elastine	20 g/L	34 ± 0.6	51 ± 1.1
Fibrine	20 g/L	23 ± 0.5	33 ± 0.7
<i>Protéines synthétiques</i>			
Kératine azure	30 g/L	100 ± 2.5	100 ± 2.5
Azo-caséine	30 g/L	86 ± 2.0	95 ± 2.4
Azo-albumine	30 g/L	77 ± 1.7	81 ± 1.9
<i>Peptide synthétique</i>			
<i>N</i> -Suc-Tyr-Leu-Val- <i>p</i> NA	5 mM	100 ± 2.5	100 ± 2.5
<i>N</i> -Suc-(Ala) <sub>3</sub> - <i>p</i> NA	5 mM	98 ± 2.5	97 ± 2.5
<i>N</i> -Suc-(Ala) <sub>2</sub> -Phe- <i>p</i> NA	5 mM	85 ± 2.0	82 ± 2.0
BAPNA	5 mM	70 ± 1.5	65 ± 1.4
<i>N</i> -Suc-(Ala) <sub>2</sub> -Val- <i>p</i> NA	5 mM	62 ± 1.3	59 ± 1.3
<i>N</i> -Suc-(Ala) <sub>2</sub> -Val-Ala- <i>p</i> NA	5 mM	55 ± 1.2	51 ± 1.1
<i>N</i> -Suc-(Ala) <sub>2</sub> -Pro-Phe- <i>p</i> NA	5 mM	25 ± 0.5	22 ± 0.5
<i>N</i> -Suc-(Ala) <sub>2</sub> -Pro-Leu- <i>p</i> NA	5 mM	22 ± 0.5	20 ± 0.4

<sup>a</sup> Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions et les erreurs types sont signalées.

### 3.6 Détermination des paramètres cinétiques

Les différents résultats des paramètres cinétiques obtenus sont représentés par le **tableau 18**. Les deux kératinases purifiées présentent des paramètres cinétiques de type Michaelienne. L'examen des résultats montre que pour le substrat naturel (la kératine), la KERA-71 présente des paramètres cinétiques supérieurs à la KERB-19 et aux autres enzymes utilisés dans cette étude, La KERA-71 a présenté une efficacité catalytique ( $k_{cat} / K_m$ ) qui était respectivement de 1,74, 2,14, 2,35, 3,75 et 9,87 fois supérieure à celles de KERDZ, KERB-19, KERAK-29, Actinase E et KERAB. En ce qui concerne la dégradation du substrat synthétique Suc-Tyr-Leu-Val-*p*NA, les résultats obtenus sont similaires à la dégradation du substrat naturel avec une efficacité relative de 1,68, 2,22, 2,72 et 3,63 fois plus élevée que ceux de KERDZ, KERB-19, KERAK-29, Actinase E et KERAB, respectivement.

En effet la KERA-71 présente une efficacité catalytique supérieure à la KERB-19 et aux autres kératinases produites par des souches d'*Actinomadura* avec la KERDZ isolée d'*Actinomadura viridilutea* et KERAK-29 isolée d'*Actinomadura keratinilytica*, de même que l'actinase E commerciale pour la dégradation de kératine.

**Tableau 18.** Tableau comparatif des paramètres cinétiques des enzymes KERA-71 et KERB-19 pour la réaction d'hydrolyse de la kératine et un peptide synthétique.

Substrats	Kératinases	$K_m$ (mM) <sup>a</sup>	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>3 a</sup>	$k_{cat}/K_m$ (min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>3</sup>
Kératine	<b>KERA-71</b>	0.370 ± 0.017	64.467 ± 4.86	174.235
	KERDZ	0.334 ± 0.016	33.474 ± 3.70	100.221
	KERDZ	0.350 ± 0.016	28.435 ± 3.11	81.242
	KERAK-29	0.423 ± 0.031	31.410 ± 3.52	74.255
	Actinase E	0.500 ± 0.023	23.248 ± 2.99	46.496
	KERAB	0.542 ± 0.025	9.550 ± 1.55	17.652
N-Suc-Tyr-Leu-Val-pNA	<b>KERB-19</b>	0.410 ± 0.032	190.850 ± 9.12	465.488
	KERDZ	0.501 ± 0.020	158.344 ± 7.70	315.426
	KERDZ	0.535 ± 0.020	148.210 ± 6.95	277.028
	KERAK-29	0.677 ± 0.032	141.500 ± 6.44	209.630
	Actinase E	0.758 ± 0.035	129.855 ± 5.78	171.313
	KERAB	0.821 ± 0.041	105.328 ± 5.02	128.292

<sup>a</sup> Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions et les erreurs types sont signalées.

### 3.7 Détermination du degré d'hydrolyse

La comparaison du degrés d'hydrolyse (DH %) des différentes kératinases en l'occurrence : la KERA-71, la KERB-19, la KERAK-29 (A. Habbeche et al., 2014), la KERDZ (Ben Elhouli et al., 2016), la KERAB de la souche *Streptomyces Sp* (B. Jaouadi et al., 2010) et en fin l'Actinase -E commerciale font l'objet de cette étude. Nous avons testé l'ensemble des enzymes cités sur la dégradation de plumes de volailles et les plumes de canard. Les différents résultats obtenus (**figures 25**) pour la dégradation de plumes montrent que la kératinase KERA-71 présente un DH élevé (49%) suivi par la KERDZ (44%) et plus important que celui de KERB-19 (37%) KERAK-29 (32%), Actinase -E (26%) et la KERAB (15%). En ce qui concerne la dégradation de plumes de canard, les résultats sont différents (**figure 26**) et on observe que la KERB-19 est plus performante avec un degré d'hydrolyse de de 43% suivi par la KERDZ (35%), la KERA-71 avec seulement 30%, la KERAK-29 (27%), l'actinase E (20%) et la KERAB (11%).

A la lumière de ces résultats, on pourra dire qu'à la fois la KERA-71 et KERB-19 seraient des candidats potentiels dans la valorisation des déchets riches en kératine. En effet, en Algérie, l'environnement est très pollué par les plumes de volaille et autres polymères biologiques, d'où l'intérêt, d'une part éliminer ces déchets par voix biologiques et d'autres part obtenir des hydrolysats de protéines de peptides et d'acides aminées qui peuvent utilisées comme compléments alimentaire.

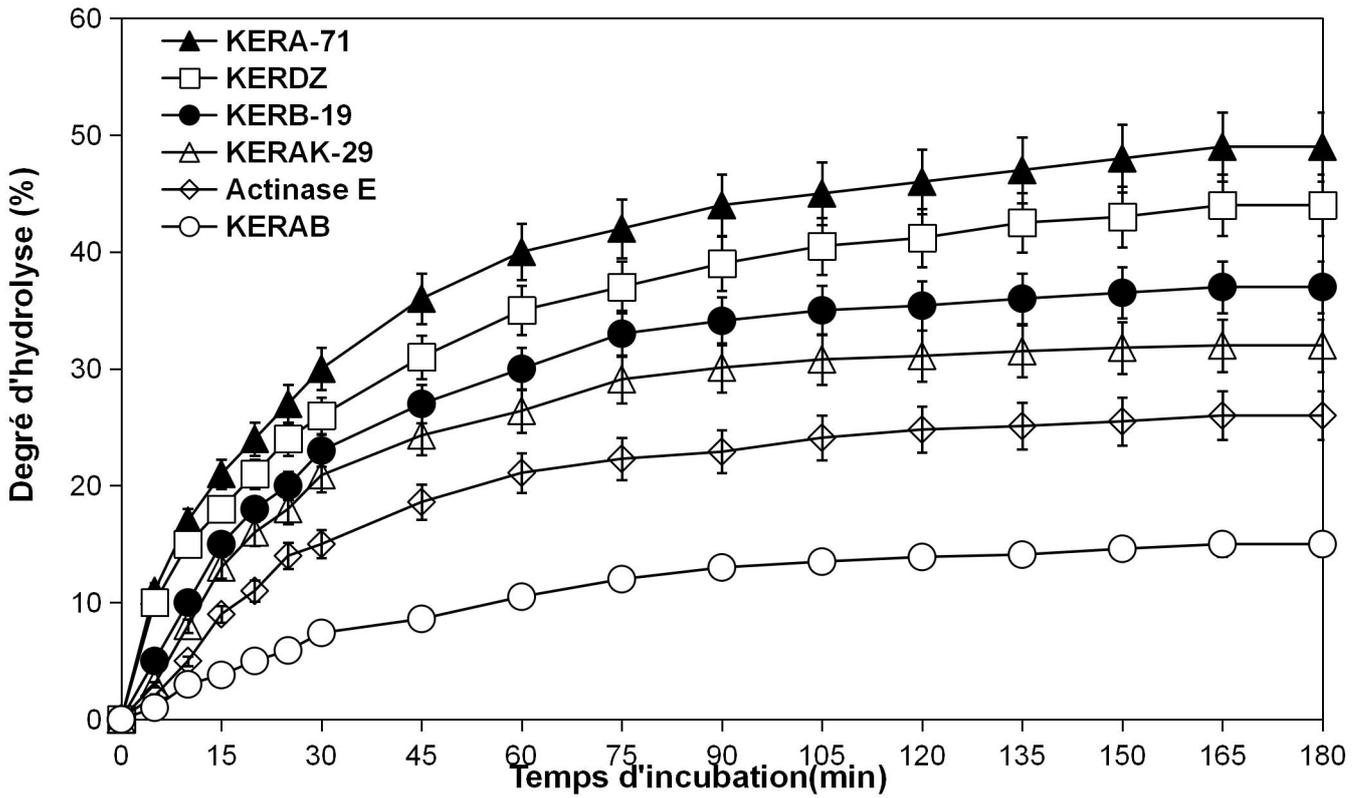
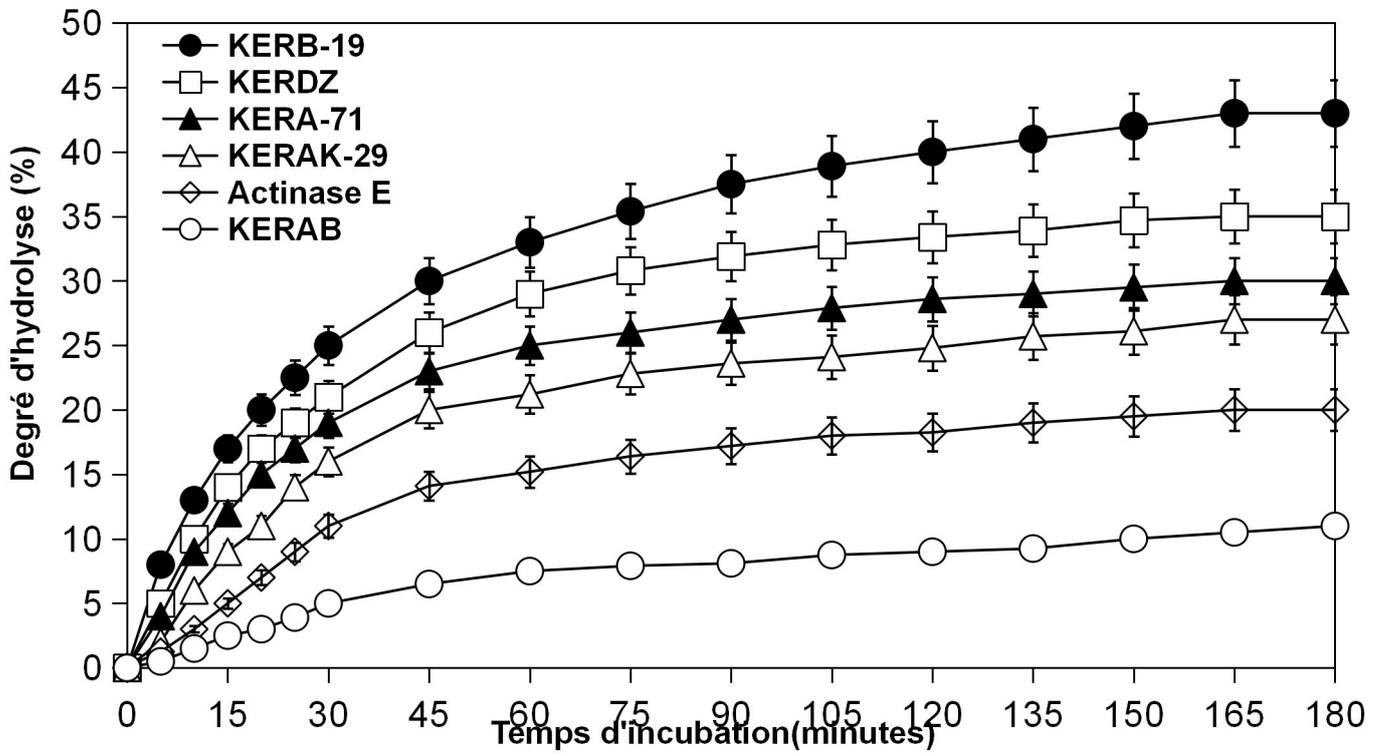


Figure 25 : Courbe d'hydrolyse de la poudre de plumes de volailles par différentes enzymes kératinolytiques.



**Figure 26 :** Courbe d'hydrolyse de la poudre de plumes de canards par différentes enzymes kératinolytiques.

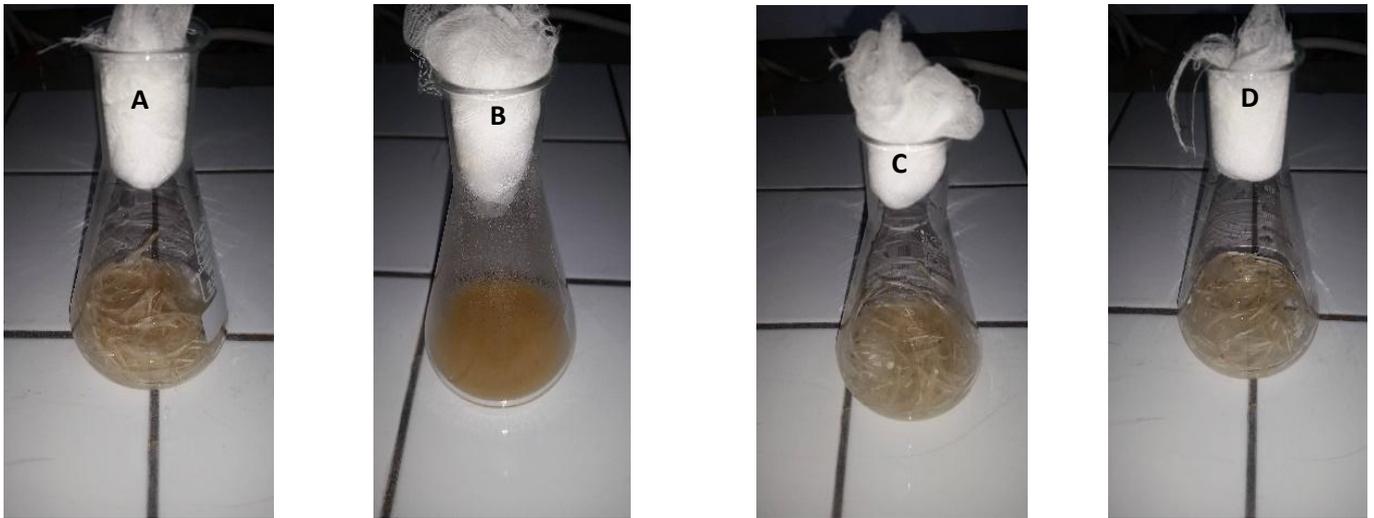
## 4 Evaluation du potentiel biotechnologique de KERA-71 et la KERB-19

### 4.1 Application dans la bioconversion des déchets kératiniques

Ce travail de recherche s'est orienté également vers l'application des enzymes (KERA-71 et KERB-19) dans le domaine biotechnologique et cela par la valorisation des déchets de plumes. En effet, ces derniers sont très riches en kératine biodégradable d'où l'intérêt de recycler cette biomasse par voie biologique. Nous signalons que ces déchets représentent un danger pour la santé humaine et la pollution de l'environnement. A cet effet, l'extrait brut contenant la KERA-71 et la KERB-19 a été testé sur les plumes entières en conditions optimales et comparés d'une part par rapport aux enzymes commerciales : la papaïne et la pepsine et d'autre part par rapport aux données bibliographiques en l'occurrence la KERAK-29 de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 et la KERDZ de la souche *Actinomadura viridilutea* DZ50. Les résultats obtenus sont représentés par la **figure 27**. L'analyse de cette figure montre qu'au bout de 48 h d'incubation, la quasi-totalité de la kératine est dégradée par l'extrait enzymatique brute. En effet, le test visuel de comparaison du flacon A (Témoins) par rapport au flacon B (KERA-71+KERB-19) donne plutôt un liquide correspondant à la bioconversion des plumes sous forme solide à des plumes sous forme d'hydrolysats riches en acides aminés et des oligopeptides. En revanche, le test des deux autres enzymes commerciales ne semble pas dégrader les plumes.

Ce résultat semble concorder avec les travaux de (A. Habbeche et al., 2014) qui ont testé la KERAK-29 de la souche *Actinomadura Keratinilytica* Cpt 29 sur les plumes entières, de même les travaux de (Ben Elhouli et al., 2016) qui ont obtenu un hydrolysats de protéines par utilisation de la kératinase KERDZ de la souche *Actinomadura viridilutea* DZ50.

On pourra ainsi conclure que les activités kératinolytiques (extrait brut) possèdent un potentiel biotechnologique dans le domaine de la biotechnologie blanche. Il serait souhaitable de passer de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle en bioréacteur et cela pour une meilleure valorisation des déchets de plumes qui sont suffisamment abondants en Algérie. Le choix de l'extrait brute à la place des enzymes purifiées pour la valorisation des déchets riches en kératines a été fait pour des raisons économiques car c'est beaucoup plus coûteux d'utiliser des enzymes pures qu'un extrait brut, aussi nous estimons qu'une action en synergie des deux enzymes sera plus efficace que l'utilisation de la KERA-71 ou la KERB-19 sous forme pure.



**Figure 27:** Biodégradation de plumes. A : Contrôle à blanc, B : extrait brute (KERA-71 + KERB-19), C : Pepsine, D : Papaïne )

## 4.2 Application dans l'épilage enzymatique

Dans le but d'évaluer le potentiel biotechnologique de la KERA-71 et KERB-19 dans l'épilage enzymatique comme alternative aux processus chimiques, les deux enzymes ont été testées sur des peaux de chèvre, de mouton et de bovin. Les différents résultats obtenus sont présentés sur la **figure 28** qui montre qu'après 12 h d'incubation à 30 °C dans 100 ml de solution enzymatique contenant la KERB-19, toutes les peaux ont eu leurs poils très faciles à arracher sans application de force et sans dommage observable sur le collagène par rapport à leurs témoins correspondants. En revanche l'attaque de la KERA-71 à pH8 sur les mêmes échantillons de peaux, les résultats obtenus montrent qu'après 12h d'incubation, l'élimination des poils est plus difficile par rapport aux peaux traités par la KERB-19. Cette différence pourrait s'expliquer par le pH. En effet, dans le processus enzymatique, les enzymes dissolvent la protéine capillaire sans affecter la structure de la peau, et on a donc noté que les peaux épilées présentaient des pores de cheveux propres et des structures de grain claires. Ces résultats confirment que la kératinase KERB-19 peut accomplir tout le processus d'épilation. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui expliquent que dans le cas du traitement du cuir, l'activité d'épilation est généralement réalisée à pH relativement neutre ([Dayanandan et al.,2003](#)). La KERB-19 serait donc plus adaptée au traitement par épilation que la KERA-71.

la comparaison des résultats obtenus par rapport aux différents travaux de recherche montrent que nos résultats semblent relativement proches à ceux obtenus par le KERUS de la souche *Br. brevis* US575 sur les peaux de mouton, de chèvre et de bovin à pH 8 et 40 ° C (N Z Jaouadi et al., 2013). De même , les kératinases de *Bacillus pumilus* (A. G. Kumar et al 2008) et KERZT-A de *Bacillus amyloliquefaciens* (Hamiche et al., 2019).



**Figure 28** : Etude comparative des capacités d'épilage enzymatique de la KERA-71 et la KERB-19



## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

---

Le projet de cette thèse doctorale étant la production de protéases thermostables (Kératinases) chez une souche d'actinomycète thermophile autochtone isolée du compost de poulet de la région d'Annaba. Cette souche est *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 stockée dans la banque des gènes sous le numéro d'accèsion GQ205433. Ces kératinases sont utilisées dans la biodégradation des déchets riche en kératine tel que les plumes de volaille, mais aussi dans le traitement du cuir (confitage/épilage) ou dans la détergence. Ce travail de recherche s'inscrit donc dans le domaine de la biotechnologie blanche (bioconversion) et qui a pour but la valorisation de la biomasse. Ainsi, suite aux différentes investigations, il est montré que :

-Dans un premier temps, l'optimisation des conditions de production de kératinases par plan d'expérience ( méthode statistique) chez la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt20 a permis de montrer que sur les différents facteurs testés au nombre de 10 :Température (30 ° C), pH initial 7, temps (7 j), CFM (5 g / l), YE (0,5 g / l), NaCl (0,1 g / l), FeSO<sub>4</sub> (0,01 g / l), TES (1%, v / v), CaCO<sub>3</sub> (3 g / l) et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,25 g / l) , seuls ces deux derniers : CaCO<sub>3</sub> (3 g / l) et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,25 g / l) ont un effet significatif sur la production de la KERA-71 avec p=0,05.

Ainsi, le niveau de production est de 6800 UI/mL pour un temps de culture de 120 heures. Cette valeur est plus élevée par rapport au témoin sans optimisation et qui est 1120 UI/mL soit une augmentation de 6 fois, ce qui est considérable. La comparaison de cette valeur par rapport à d'autres travaux de recherche telle que la production de la kératinases (KERAK-29) *Actinomadura keratinilytica* Cp29 avec une valeur de 135,23 U/mL montre la souche Cp29 reste très compétitive.

-Dans une deuxième partie de travail et après l'optimisation de la production des kératinases, nous nous sommes intéressés à la purification de l'enzyme et à sa caractérisation et il en ressort que :

-Suite à la purification, deux formes enzymatiques dénommées KERA-71 et KERB-19 sont détectées et purifiées. Le séquençage du N-terminale de la forme A donné 29 acides aminés avec comme séquence : MSQAGRRLPARLGATLSALTLTAVFVFPV. L'alignement par database (NCBI) donne une homologie de 64 % avec la protéase à serine de la souche *Actinomadura viridilutea*. Par contre la forme KERB-19 possède une séquence N-terminale de 22 acides aminés différente de celle de la forme KERA-71 et qui a comme séquence :

ADIDAGLAYTMGGRCSVGFAAT ; l'alignement par database (NCBI) de cette séquence donne une homologie de 92 % avec la protéase à serine (KERDZ) de la souche *Actinomadura viridilutea* DZ50. Ce test confirme qu'il s'agit de kératinases à serine et cela pour les deux formes enzymatiques. La littérature bibliographique signale que les microorganismes peuvent produire jusqu'à 3 formes d'enzyme kératinique et c'est le cas chez le genre *Bacillus* et *Streptomyces*, avec des caractéristiques biochimiques différentes, ce qui correspond à nos résultats.

- L'étude biochimique a porté sur les deux formes, la KERA-71 et la KERB-19. Ces deux enzymes sont purifiées et leurs propriétés biochimiques et moléculaires sont élucidées. Ainsi, en commun, les deux kératinases sont inhibées par le PMSF et le DFP ce qui les classent dans le groupe des protéases à serine. De même que l'addition du calcium augmente d'une part leurs activités et d'autre part leurs thermostabilité, d'où l'intérêt de les utiliser dans les bioindustries.

-Aussi les deux formes ont une structure monomérique et une même affinité pour le substrat naturel qui est la farine de plume.

- En revanche les deux formes la KERA-71 et la KERB-19 se différencient par les paramètres suivants : pH optimum, température optimale, masse molaire et degré d'hydrolyse. Ainsi, ces différences permettent d'orienter les deux kératinases vers différentes applications biotechnologiques, notamment, le traitement du cuir ou la valorisation des déchets de plumes entières.

-Du point de vue hydrolyse, la comparaison du degré d'hydrolyse entre les formes KERA-71 et la KERB-19 avec d'autres kératinase sur la dégradation de plumes de volailles et les plumes de canards montre que la kératinase KERA-71 présente un DH élevé plus important que celui de KERB-19 et les autres kératinases utilisés. En ce qui concerne la dégradation de plumes de canard, les résultats sont différents et on observe que la KERB-19 est plus performante avec un degré d'hydrolyse de 43% suivi par la KERDZ, la KERA-71, la KERAK-29, l'Actinase E et la KERAB.

-Du point de vue application biotechnologique sur les plumes entières, les résultats ont montré que les deux formes ensemble sous forme d'extrait brut sont plus actif que les autres kératinases étudiées (KEDZ et KERAK-29 et les kératinases commerciales). Le choix de l'extrait brute à la place des enzymes purifiées pour la valorisation des déchets riche en kératines a été fait pour des raisons économiques car c'est beaucoup plus couteux d'utiliser

des enzymes pures qu'un extrait brut, aussi nous estimons qu'une action en synergie des deux enzymes sera plus efficace que l'utilisation de la KERA-71 ou la KERB-19 sous forme pure.

-A la lumière de ces résultats, on pourra dire qu'à la fois la KERA-71 et KERB-19 seraient des candidats potentiels dans la valorisation des déchets riches en kératine. En effet, en Algérie, l'environnement est très pollué par les déchets plumes de volaille et autres polymères biologiques, d'où l'intérêt, d'une part éliminer ces déchets par voie biologiques et d'autres part obtenir des hydrolysats de protéines de peptides et d'acides aminés qui peuvent utilisées comme compléments alimentaire.

-Pour ce qui est du traitement du cuir par épilation, les travaux de recherche montrent que la KERB-19 semble plus efficace que la KERA-71 et arrive seule à achevé tout le processus d'épilage, l'utilisation d'enzyme dans l'épilage de cuir remplacera les méthodes chimiques très polluants utilisés.

-En ce qui concerne, l'aspect moléculaire, ce travail de recherche a permis d'isoler le gène le gène *kerb-71* de taille de 4,8 Kb.

- La modélisation moléculaire en 3D in silico nous a permis de réaliser un modèle partiel en 3D de la KERA-71, par manque de modèle qui se rapproche de la KERA-71, la réalisation d'un modèle 3D complet de cette dernière n'a pas été possible in silico, néanmoins un essai de modélisation partielle a été fait.

- En perspective, nous envisageons de continuer ces travaux avec comme points suivants :

-Finir l'extraction du gène *kerb-19*.

- Etant donné que le gène *kerb-71* est isolé et éventuellement le gène *kerb-19* serait isolé et caractérisé, il serait souhaitable de cloner ces deux formes enzymatiques chez E. Coli, car cela permettrait de faciliter l'extraction de l'enzyme et aussi d'augmenter la production d'enzymes.

- Poursuivre l'étude des relations structure-fonctions des enzymes KERB-19 et KERA-71 pourrait mieux élucider l'attaque des acides aminés situés dans le site actif.

-Possibilité de passer de l'échelle du laboratoire à une échelle industrielle pour la production d'enzymes.

# Annexes

---

## ANNEXE I

### Milieux de culture et solutions

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage 20 min à 120°C.

#### 1. Milieux solides

- Les milieux *ISP*

Ces milieux sont préconisés dans *l'International Streptomyces Project* ou *ISP*

##### ➤ L'ISP 1

Tryptone .....	05g
Extrait de levure .....	03g
Agar.....	20g
H <sub>2</sub> O distillée qsp.....	1000ml
pH .....	7.2

##### ➤ L'ISP 2

Extrait de levure.....	4g
Extrait de malt.....	10g
Glucose.....	4g
Agar.....	20g
H <sub>2</sub> O distillée qsp.....	1000ml
pH .....	7.2

##### ➤ L'ISP 3

Farine d'avoine .....	20g
solution saline standard(*).....	1ml
Agar. ....	18g
H <sub>2</sub> O distillée .....	1000ml
pH .....	7.2

**Milieu de Gélose Nutritive au Lait (GNL)**

- Peptone.....	5g
- Extrait de levure.....	3g
- Eau distillée.....	750ml
- Lait écrémé stérile .....	250ml
- Agar.....	15g
- pH.....	10

- **Milieu à base de caséine**

Caséine.....	7g
- Extrait de levure.....	3g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.5g
- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5g
- KCl.....	1.5g
- Agar.....	20g
- Eau distillée.....	1000ml
- pH.....	8

- **Milieu a base de kératine (FBM)**

- Farine de plume .....	20g
- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
- MgSo <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.5g
- CaCo <sub>3</sub> .....	3g
- FeSo <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.01g
- NaCl.....	0.5g
- Solution des éléments en trace.....	1ml
- Agar.....	15g
- Eau distillée.....	1000ml
- pH.....	7.2

## 2. Milieux liquides

- Milieu de culture liquide pour *Actinomadura*

### Milieu ISP2 liquide :

Extrait de levure.....	4g
Extrait de malt.....	10g
Glucose.....	4g
H <sub>2</sub> O distillée qsp.....	1000ml
pH .....	7.2

(Shirling E.B et Gottlieb D., 1966).

- Milieu à base de caséine

Caséine.....	7g
- Extrait de levure.....	3g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.5g
- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5g
- KCl.....	1.5g
- Eau distillée.....	1000ml
- pH.....	8

- Milieu a base de kératine (FBM)

- Farine de plume .....	20g
- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
- MgSo <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.5g
- CaCo <sub>3</sub> .....	3g
- FeSo <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.01g
- NaCl.....	0.5g
- Solution des éléments en trace.....	1ml
- Eau distillée.....	1000ml

- pH..... 7.2

### 3. Solutions et tampons

- Eau physiologique : NaCl 8.5g, H<sub>2</sub>O distillé qsp 1000 ml
- Solution I: 25 mM Tris-HCl, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA;
- Solution II: 0,2 M NaOH, 1 % SDS;
- Solution III: 3 M Acétate de sodium pH 5,2;
- TBE 10X: 0,89 M Tris-Borate, 0,89 M Acide borique, 20 mM EDTA pH 8;
- TAE 10X: 0,4 M Tris acétate, 10 mM EDTA pH 8;
- BEt: 10 mg/ml;
- Tampon 10X (PCR): 100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl, 1 % Triton;
- Tampon de dépôt de l'ADN : 30 % glycérol, 0,25 % bleu de bromophénol, 0,25 % xylène cyanol FF.
- Tampon TfbI : 30 mM acétate de potassium ; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 15% glycérol; (le pH est ajusté à 5,8 par l'acide acétique)
- Tampon TfbII : 10 mM MOPS ; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% glycérol; (le pH est ajusté à 6,5 par NaOH)
- Tampon de migration des protéines: Tris-glycine (0,2 M) pH 8,6, 0,1 % SDS;
- Tampon de dépôt (5X) des protéines: 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 1 % bleu de Bromophénol; 10 % glycérol; 2 % SDS; 200 mM DTT
- Tampon Tris-HCl 0,05 M, 0,02 M, 0,01 M pH 8;
- Tampon A: utilisé pour équilibrer la colonne MonoQ et pour éluer les protéines. Il est formé de tampon Tris HCl 0,02 M pH 8.
- Tampon B: utilisé pour éluer les protéines à partir de la colonne Mono Q: Tris HCl 0,02 M pH 8 + 1 M NaCl;
- Tampon Acétate Sodique 0,05 M pH 4 et pH 5. Tampon phosphate 0,05 M pH 6 et pH 7. Tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8 et pH 9. Tampon Glycine –NaOH 0,05 M pH 9,5 ; pH 10 ; pH 10,5 ; pH 11 et pH 12.

### 4- Préparation de Farine de plume

Les plumes utilisées dans ce travail sont celles qui recouvrent les poulets et délimitent leurs contours. Elles sont de couleur blanche, issues d'un poulailler local. Le processus de préparation de la farine de plumes passe par les étapes suivantes :

- Nettoyage des plumes par élimination des saletés et lavage successifs à l'eau du robinet, (la dernière étape de lavage se fait à l'eau distillée)

- Séchage des plumes dans un four à 150°C pendant 5min

- Broyage des plumes séchées au moyen d'une moulinette

- Tamisage de la poudre obtenue à l'aide d'un tamis avec des maille de port de 1mm a fin d'obtenir une farine homogène.

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

## ANNEXE II

### 1. Méthodes moléculaires

#### 1.1. Extraction de l'ADN génomique (ADNg) à partir de l'espèce d'actinomycète Cpt20

A partir d'une boîte de pétri, une colonie est mise en culture en milieu liquide de 100ml (ISP<sub>2</sub>) sous agitation 250rpm, et à 45°C pendant une nuit. Par la suite l'ensemble est centrifugé à 8000×g pendant 10min. Le culot cellulaire est lavé avec 10ml de tampon I (50mM glucose anhydre; 25mM Tris-base et 10mM EDTA à pH 8,0). Les cellules sont alors lysées dans 20ml de tampon I contenant 5mg/ml de lysozyme et sont incubées une heure à 37°C. Par la suite, la solution est centrifugée à 8000×g pendant 15min à 4°C et le culot cellulaire est remis dans 30ml de tampon II (10mM Tris-base ; 100mM NaCl ; 5mM EDTA et 1% du SDS à pH 8,0). Au surnageant on ajoute 30ml de phénol/chloroforme (v/v) et après centrifugation pendant 20min à 8000×g on ajoute 2,5v d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M à pH 5,2.

A l'aide d'une pipette Pasteur effilée on récupère les filaments d'ADN apparus, par la suite, on remet en solution les filaments dans 2ml de TE 1× [100 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0]. On centrifuge ensuite la solution restante pendant 15min à 10000×g, le précipité est resuspendu dans 6ml de TE 1× contenant 10mg/ml de RNase A et incubé à 37°C pendant 1 à 2h. Puis on ajoute de la protéinase K à une concentration finale de 5mg/ml et on incube la solution à 50°C pendant 2 à 3h. Après une extraction avec 1 volume de phénol suivie d'une autre extraction par 1 volume égal de phénol/chloroforme puis une dernière extraction avec 1 volume de chloroforme, la solution est précipitée avec 2 volumes d'éthanol 100% et 10% de chlorure de sodium 5M ou d'acétate de sodium 3M à pH 5,2 et laissée au moins 2h à -20°C ou gardée 15 min à -80°C. La solution est alors centrifugé à 12000×g pendant 15 min et le précipité est lavé avec une solution d'alcool iso-amylique puis d'éthanol 70% et séché à température ambiante pendant environ 15 min. Enfin, le précipité est resuspendu dans 50µl d'eau stérile ou de TE 1× et conserver à -20°C.

## 2. Méthodes analytiques

### 2.1. Préparation de réactif de Bradford (Dosage des protéines)

Dans une fiole jaugée de 1 litre, on dissout :

Bleu de Coomassie G250 .....100mg

Ethanol 95% .....50ml

Agitation pendant 2 heures puis, on ajoute :

Acid ortho phosphorique .....100ml

H<sub>2</sub>O distillée q.s.p .....1000ml

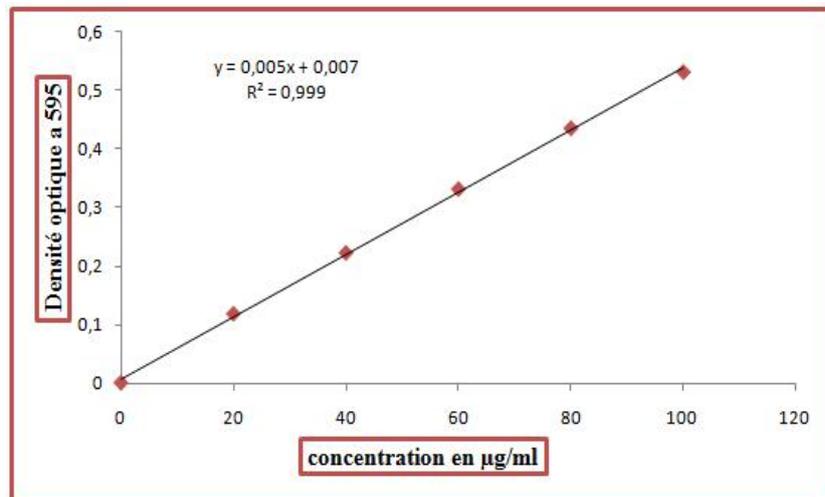
#### 2.1.1. Réalisation de la gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (SAB)

La gamme d'étalonnage indiquée dans le tableau, a été réalisée à partir d'une solution mère contenant 0.1mg/ml de sérum albumine bovine (**Tableau 20**)

**Tableau 20 : Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (BSA)**

<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>SAB (µl)</b>	<b>00</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
<b>Eau distillée µl</b>	<b>100</b>	<b>80</b>	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>00</b>
<b>Réactif BBC (ml)</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

### 2.1.2. Courbe d'étalonnage de Bradford



**Figure 29:** Courbe d'étalonnage de la SAB.

Relation entre l'absorbance et la concentration en protéines ( $\mu\text{g}$ ) ( $R^2$  : coefficient de détermination) (Bradford M., 1976)

## 2.2. Electrophorèse (SDS-PAGE)

Les protéines sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 % (**Tableau 21**) en présence de SDS selon la méthode de Laemmli ([U. K. Laemmli, 1970](#)). La préparation du gel de polyacrylamide en présence de SDS est obtenue par polymérisation d'acrylamide qui forme des chaînes et de bis-acrylamide qui pontent les chaînes d'acrylamide. La réaction de polymérisation est initiée par la formation de radicaux libres par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par le TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyl-1,2-diaminométhane-toxique).

### 2.2.1. Compositions de gel d'acrylamide et solutions pour électrophorèse

#### ❖ Solution : Acrylamide – Bisacrylamide :

- Acrylamide ..... 30g
- Bisacrylamide ..... 0.8g
- H<sub>2</sub>O q.s.p ..... 100ml

Filtrer et stocker à 4°C à l'abri de la lumière.

#### ❖ Solution : tampon gel de séparation : Tris HCl 1.5M, pH = 8.8

- Tris base ..... 36.3g
- HCl 1N ..... 48ml
- H<sub>2</sub>O q.s.p ..... 100ml

Filtrer et stocker à 4°C.

#### ❖ Solution : tampon gel de concentration : Tris HCl 1.5M, pH = 6.8

- Tris base ..... 6g
- HCl 1N ..... 48ml
- H<sub>2</sub>O q.s.p ..... 100ml

Filtrer et stocker à 4°C.

❖ **Solution : tampon de migration** : (Tris 0.25M, Glycine 1.92M, pH=8.3)

- Tris base..... 15.1g
- Glycine ..... 72g
- SDS 0.1%.....5g
- H<sub>2</sub>O q.s.p .....1000ml

Conservation à 4°C.

❖ **Solution de persulfate d'ammonium** :

Dissoudre 10g de persulfate d'ammonium dans 100ml d'eau distillée. Cette solution doit se préparer juste au moment de l'emploi (extemporanément).

❖ **Solution : tampon de lyse (tampon d'échantillon)** :

- Tris base (0.5M) pH6.8..... 2.13ml
- SDS .....1g
- Glycerol 10 %..... 5ml
- Bleu de bromophenol ..... 20mg
- β mercaptoethanol ..... 2.56ml
- H<sub>2</sub>O q.s.p..... 10m

❖ **Solution de coloration** :

- Acide acétique.....10ml
- Ethanol absolue.....45ml
- H<sub>2</sub>O .....45ml
- BBC (R250).....0.25g

❖ **Solution de décoloration** :

- Acide acétique.....10ml
- Ethanol absolue.....45ml
- H<sub>2</sub>O .....45ml

### 2.2.2. Préparation et migration du gel pour l'électrophorèse SDS-PAGE

Le gel de polyacrylamide est préparé selon la méthode décrite par Laemmli.

**Tableau 21:** Composition du gel de polyacrylamide 10%.

Composition du gel polyacrylamide (10%)			
Composants	Gel de séparation (10%)	Composants	Gel de concentration (5%)
H <sub>2</sub> O	4 ml	H <sub>2</sub> O	3.4 ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml	1.5M Tris-HCl pH 6.8	830 µl
Acrylamide 30%	3.3 ml	Acrylamide 30%	630 µl
APS 10%	100 µl	APS 10%	50 µl
SDS 10%	100 µl	SDS 10%	50 µl
TEMED	4 µl	TEMED	4 µl
VOLUME TOTAL	10 ml	VOLUME TOTAL	5 ml

\*APS : Persulfate d'ammonium \*\* SDS : Sodium Dodécyle Sulfate

- Couler le gel de séparation entre les deux plaques de verre immédiatement après l'ajout de l'APS et le TEMED.
- Ajouter de l'éthanol a la surface du gel puis le laisser polymeriser durant 30 minutes.
- Ajouter le gel de concentration, après avoir éliminé l'éthanol grâce a un buvardage d'un papier absorbant, ajuster le peigne et laisser polymériser.
- Démouler le peigne quand le gel est polymérisé et fixer l'ensemble à l'appareil.
- Déposer les échantillons de protéines après ajout de bleu dénaturant (1/10 du volume) et dénaturation pendant 5 min a 100°C.
- Il faut de plus s'assurer que toutes les protéines aient le même point de départ pour la migration, c'est pourquoi nous avons démarré la migration dans un gel de concentration.

- La migration est assurée dans le tampon Tris (25mM)-glycine (192mM) contenant 0.1% SDS à ampérage constant (entre 30 et 50 mA) et arrêter exactement quand le "bleu de bromophenol" atteint le bas du gel.
  
- La révélation est effectuée par deux méthodes :
  - ✓ Imprégnation pendant une nuit dans une solution du colorant constituée de bleu de Coomassie 0.25% dans un mélange éthanol-eau-acide acétique glacial. La décoloration est réalisée dans un solvant composé de: éthanol-eau-acide acétique jusqu'à décoloration complète du gel, les bandes correspondants aux protéines restent colorées en bleu.
  - ✓ Ou par imprégnation dans une solution de nitrate d'argent à 0.1% pendant 30 minutes puis rinçage avec l'eau distillée ensuite développe avec une solution de 3% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  contenant 0.02% de formaldéhyde enfin stopper avec 1% d'acide acétique et lavage avec l'eau distillée.

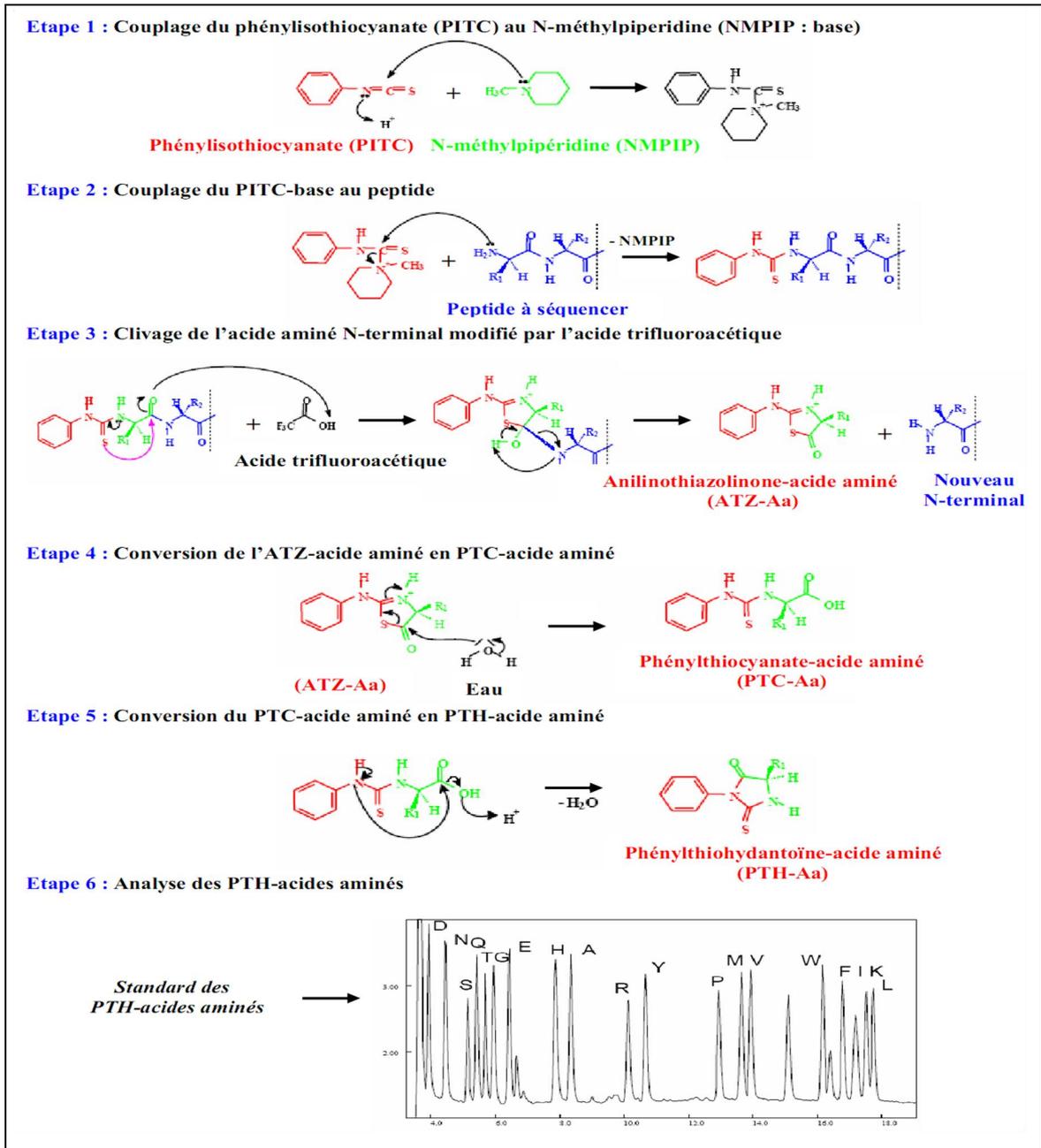
### 2.3. Technique de séquençages de NH<sub>2</sub> terminale

La séquence N-terminale de l'enzyme purifiée est déterminée par la méthode d'Edman automatisée sur microséquenceur de protéines.

Elle comporte les trois étapes classiques de séquençage, à savoir : le couplage, le clivage et la conversion (**Figure 30**).

- ❖ **Couplage** : sous des conditions basiques, l'extrémité N-terminale de la protéine à séquencer est couplée avec le PhénylIsoThioCyanate (PITC) pour donner le PhénylThioCaramyl (PTC)-polypeptide.
- ❖ **Clivage** : la liaison peptidique entre le résidu protéique et le PTC subit un clivage acide, ce qui mène à la libération de l'AnilinoThiazolinone (ATZ-Aa), dérivé instable du résidu en question.
- ❖ **Conversion** : L'ATZ-Aa est converti en un dérivé d'acide aminé stable, le PhénylThiohydantoin d'acide aminé (PTH-Aa).

A la fin de chaque cycle, le PTH-acide aminé est identifié par HPLC sur C18.



**Figure 30:** Dégradation chimique d'EDMAN automatisée sur microséquençeur de protéines.

## Références bibliographiques

---

- Abdel-Naby, M. A., El-Refai, H. A., & Ibrahim, M. H. A. (2017). Structural characterization, catalytic, kinetic and thermodynamic properties of Keratinase from *Bacillus pumilus* FH9. *Int J Biol Macromol*, 105(Pt 1), 973-980. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.118
- Abdel-Naby, M. A., Ibrahim, M., & El-Refai, H. (2016). Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Bacillus pumilus* FH9 keratinase conjugated with activated pectin. *International journal of biological macromolecules*, 85, 238-245.
- Abidi, F., Chobert, J.-M., Haertlé, T., & Marzouki, M. N. (2011). Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. *Process Biochemistry*, 46(12), 2301-2310.
- Adler-Nissen, J. (1978). Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food. *Ann Nutr Aliment*, 32(2-3), 205-216.
- Akram, F., Haq, I. U., & Jabbar, Z. (2020). Production and characterization of a novel thermo- and detergent stable keratinase from *Bacillus* sp. NKSP-7 with perceptible applications in leather processing and laundry industries. *Int J Biol Macromol*, 164, 371-383. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.146
- Alba, A. C., Strauch, T. A., Keisler, D. H., Wells, K. D., & Kesler, D. C. (2019). Using a keratinase to degrade chicken feathers for improved extraction of glucocorticoids. *Gen Comp Endocrinol*, 270, 35-40. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.10.002
- Ammasi, R., Victor, J. S., Chellan, R., & Chellappa, M. (2020). Alkaline protease for an efficacious rehydration of skin matrix by a novel *Bacillus crolab* MTCC 5468 in sustainable leather production: a green approach. *Biotechnol Lett*, 42(2), 249-267. doi: 10.1007/s10529-019-02769-0
- Anbu, P., Gopinath, S., Hilda, A., Lakshmipriya, T., & Annadurai, G. (2007). Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource Technology*, 98(6), 1298-1303.
- Anbu, P., Hilda, A., & Gopinath, S. C. (2004). Keratinophilic fungi of poultry farm and feather dumping soil in Tamil Nadu, India. *Mycopathologia*, 158(3), 303-309. doi: 10.1007/s11046-004-3465-1
- Andersen, R., Duncan, P., & Linnell, J. D. (1998). *The European roe deer: the biology of success*: Scandinavian university press Oslo.
- Anitha, T., & Palanivelu, P. (2013). Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein expression and purification*, 88(2), 214-220.
- Anitha, T. S., & Palanivelu, P. (2013). Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expr Purif*, 88(2), 214-220. doi: 10.1016/j.pep.2013.01.007
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2), 195-201.
- Azarkan, M., Garcia-Pino, A., Dibiani, R., Wyns, L., Loris, R., & Baeyens-Volant, D. (2006). Crystallization and preliminary X-ray analysis of a protease inhibitor from the latex of *Carica papaya*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 62(Pt 12), 1239-1242.
- Azeredo, L., Lima, M., Coelho, R., & Freire, D. (2006). Thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 in submerged and solid-state fermentations using feather meal. *Journal of applied microbiology*, 100(4), 641-647.
- Babalola, M. O., Ayodeji, A. O., Bamidele, O. S., & Ajele, J. O. (2020). Biochemical characterization of a surfactant-stable keratinase purified from *Proteus vulgaris* EMB-14 grown on low-cost feather meal. *Biotechnol Lett*. doi: 10.1007/s10529-020-02976-0

- Barman, N. C., Zohora, F. T., Das, K. C., Mowla, M. G., Banu, N. A., Salimullah, M., & Hashem, A. (2017). Production, partial optimization and characterization of keratinase enzyme by *Arthrobacter* sp. NFH5 isolated from soil samples. *AMB Express*, 7(1), 181. doi: 10.1186/s13568-017-0462-6
- Bayot, A., Basse, N., Lee, I., Gareil, M., Pirotte, B., Bulteau, A. L., . . . Reboud-Ravaux, M. (2008). Towards the control of intracellular protein turnover: mitochondrial Lon protease inhibitors versus proteasome inhibitors. *Biochimie*, 90(2), 260-269.
- Ben Elhoul, M., Zarai Jaouadi, N., Rekik, H., Bejar, W., Boulkour Touioui, S., Hmidi, M., . . . Jaouadi, B. (2015). A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650. *Int J Biol Macromol*, 79, 871-882. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.06.006
- Ben Elhoul, M., Zarai Jaouadi, N., Rekik, H., Omrane Benmradi, M., Mechri, S., Moujehed, E., . . . Jaouadi, B. (2016). Biochemical and molecular characterization of new keratinolytic protease from *Actinomadura viridilutea* DZ50. *Int J Biol Macromol*, 92, 299-315. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.009
- Bhari, R., Kaur, M., & Singh, R. S. (2019). Thermostable and halotolerant keratinase from *Bacillus aerius* NSMk2 with remarkable dehairing and laundry applications. *J Basic Microbiol*, 59(6), 555-568. doi: 10.1002/jobm.201900001
- Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Zarai Jaouadi, N., Joseph, M., Hacene, H., Ollivier, B., . . . Jaouadi, B. (2016). Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities. *Int J Biol Macromol*, 86, 321-328. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.074
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Bragulla, H. H., & Homberger, D. G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of anatomy*, 214(4), 516-559.
- Brattsand, M., & Egelrud, T. (1999). Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem*, 274(42), 30033-30040.
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., & Verneuil, B. (1999). Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl Environ Microbiol*, 65(6), 2570-2576. doi: 10.1128/AEM.65.6.2570-2576.1999
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., & Verneuil, B. (1999). Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(6), 2570-2576.
- Cai, C.-g., Chen, J.-s., Qi, J.-j., Yin, Y., & Zheng, X.-d. (2008). Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 9(9), 713-720.
- Cai, C., & Zheng, X. (2009). Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36(7), 875-883. doi: 10.1007/s10295-009-0565-4
- Cavello, I. A., Hours, R. A., & Cavalitto, S. F. (2013). Enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-Ray films and release of silver particles using keratinolytic serine proteases from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. *J Microbiol Biotechnol*, 23(8), 1133-1139. doi: 10.4014/jmb.1302.02038
- Chitpinitiyol, S., Goode, D., & Crabbe, M. J. (1998). Studies on the binding of alpha-crystallin to recombinant prochymosins and chymosin. *Mol Vis*, 4, 1.
- Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., & Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Chemical technology and biotechnology*, 83(7), 1012-1018. doi: <https://doi.org/10.1002/jctb.1907>
- Claverie-Martín, F., Vega-Hernández, A., Polaina, J., & Mac Cabe, A. (2007). Industrial Enzymes. *Industrial Enzymes*.

- Cook, A. E., le Roes, M., & Meyers, P. R. (2005). *Actinomadura napierensis* sp. nov., isolated from soil in South Africa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 703-706.
- Dahlback, B. (2000). Blood coagulation. *Lancet*, 355(9215), 1627-1632.
- Dahlbäck, B. (2000). Blood coagulation. *The Lancet*, 355(9215), 1627-1632.
- daniel J. Daroit, A. P. F. C., Jéferson Segalin & Adriano Brandelli. (2010). Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. *Biocatalysis and Biotransformation*, 28(5), 370-379. doi: <https://doi.org/10.3109/10242422.2010.532549>
- Dayanandan, A., Kanagaraj, J., Sounderraj, L., Govindaraju, R., & Rajkumar, G. S. (2003). Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. *Journal Clean Prod*, 11(5), 533-536.
- Devaraj, K., Gowda, L. R., & Prakash, V. (2008). An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry*, 69(3), 647-655.
- Dominguez, A., Costas, M., Longo, M. A., & Sanroman, A. (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett*, 25(15), 1225-1229.
- Dvořák, J., Mashiyama, S. T., Braschi, S., Sajid, M., Knudsen, G. M., Hansell, E., . . . Mackenzie, B. (2008). Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie*, 90(2), 345-358.
- El-Salam, B., Ahmed, M. S., Yasser, M. M., & Taha, S. S. E. (2019). Soft white cheese ripening using bacterial protease enzyme. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 18(4), 385-397. doi: 10.17306/J.AFS.0665
- Elhoul, M. B., Jaouadi, N. Z., Rekik, H., Bejar, W., Touioui, S. B., Hmidi, M., . . . Jaouadi, B. (2015). A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650. *International journal of biological macromolecules*, 79, 871-882.
- Elhoul, M. B., Jaouadi, N. Z., Rekik, H., Benmradi, M. O., Mechri, S., Moujehed, E., . . . Bejar, S. (2016). Biochemical and molecular characterization of new keratinolytic protease from *Actinomadura viridilutea* DZ50. *International journal of biological macromolecules*, 92, 299-315.
- Emmons, D., Beckett, D., & Binns, M. (1990). Milk-Clotting Enzymes. 1. Proteolysis During Cheese Making in Relation to Estimated Losses of Yield. *Journal of Dairy Science*, 73(8), 2007-2015.
- Fakhfakh, N., Kanoun, S., Manni, L., & Nasri, M. (2009). Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. *Can J Microbiol*, 55(4), 427-436. doi: 10.1139/w08-143
- Fang, Z., Yong, Y. C., Zhang, J., Du, G., & Chen, J. (2017). Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(21), 7771-7779. doi: 10.1007/s00253-017-8484-1
- Fearheller, S. H., Taylor, M. M., & Bailey, D. G. (1977). 35S-Sulfide incorporation during alkaline treatment of keratin and its relation to lanthionine formation. *Adv Exp Med Biol*, 86B, 177-186.
- Filipello Marchisio, V., Fusconi, A., & Querio, F. (2000). *Scopulariopsis brevicaulis*: a keratinophilic or a keratinolytic fungus? *Mycoses*, 43(7-8), 281-292.
- Forgacs, G., Alinezhad, S., Mirabdollah, A., Feuk-Lagerstedt, E., & Horvath, I. S. (2011). Biological treatment of chicken feather waste for improved biogas production. *J Environ Sci (China)*, 23(10), 1747-1753.
- Freeman, S., Poore, M., Middleton, T., & Ferket, P. (2009). Alternative methods for disposal of spent laying hens: Evaluation of the efficacy of grinding, mechanical deboning, and of keratinase in the rendering process. *Bioresour Technol*, 100(19), 4515-4520.
- Ganesh Kumar, A., Swarnalatha, S., Sairam, B., & Sekaran, G. (2008). Production of alkaline protease by *Pseudomonas aeruginosa* using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries. *Bioresour Technol*, 99(6), 1939-1944.

- Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B. A., & Mattiasson, B. (2003). Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and microbial technology*, 32(5), 519-524.
- Ghillebert, R., Swinnen, E., De Snijder, P., Smets, B., & Winderickx, J. (2011). Differential roles for the low-affinity phosphate transporters Pho87 and Pho90 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 434(2), 243-251. doi: 10.1042/BJ20101118
- Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh, N., Haddar, A., Manni, L., & Nasri, M. (2005). Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32(5), 186-194. doi: 10.1007/s10295-005-0228-z
- Giongo, J. L., Lucas, F. S., Casarin, F., Heeb, P., & Brandelli, A. (2007). Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3), 375-382.
- Goupy, J. (2017). *Les plans d'expériences* (5 ed.).
- Goupy, J., & Creighton, L. (2006). *Introduction aux plans d'expériences* (troisième édition ed.).
- Gousterova, A., Braikova, D., Goshev, I., Christov, P., Tishinov, K., Vasileva-Tonkova, E., . . . Nedkov, P. (2005). Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in applied microbiology*, 40(5), 335-340.
- Gradisar, H., Friedrich, J., Krizaj, I., & Jerala, R. (2005). Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Appl Environ Microbiol*, 71(7), 3420-3426. doi: 10.1128/AEM.71.7.3420-3426.2005
- Gradišar, H., Friedrich, J., Križaj, I., & Jerala, R. (2005). Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Applied and environmental microbiology*, 71(7), 3420-3426.
- Gray, C. T. (1990). Response Surfaces: Designs and Analyses, A. I. Khuri and J. A. Cornell, M. Dekker, New York, 1987. Number of pages: 405. Price: £30. *Quality and Reliability Engineering International*, 6(1), 69-69. doi: 10.1002/qre.4680060115
- Gross, R. (1956). WATER SOLUBLE COMPOUNDS (NON-KERATINS) ASSOCIATED WITH THE PLUMAGE OF THE PIGEON (*COLUMBA LIVIA*). *Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science*, 34(1).
- Guang, C., & Phillips, R. D. (2009). Purification, activity and sequence of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from alcalase hydrolysate of peanut flour. *J Agric Food Chem*, 57(21), 10102-10106. doi: 10.1021/jf901787e
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714-2723.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S., & Chauhan, B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(4), 381-395. doi: 10.1007/s00253-002-1142-1
- Gupta, R., Beg, Q. K., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59(1), 15-32.
- Gupta, R., Sharma, R., & Beg, Q. K. (2013). Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Crit Rev Biotechnol*, 33(2), 216-228. doi: 10.3109/07388551.2012.685051
- Gupta, S., Tewatia, P., Misri, J., & Singh, R. (2017). Molecular Modeling of Cloned *Bacillus subtilis* Keratinase and Its Insinuation in Psoriasis Treatment Using Docking Studies. *Indian J Microbiol*, 57(4), 485-491. doi: 10.1007/s12088-017-0677-x
- Gupta, V. K., Sharma, G. D., Tuohy, M. G., & Gaur, R. (2016). *The handbook of microbial bioresources*: CAB International Publishing.
- Habbeche, A., Saoudi, B., Jaouadi, B., Haberra, S., Kerouaz, B., Boudelaa, M., . . . Ladjama, A. (2014). Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly

- thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *Journal of bioscience and bioengineering*, 117(4), 413-421.
- Habbeche, A., Saoudi, B., Jaouadi, B., Haberra, S., Kerouaz, B., Boudelaa, M., . . . Ladjama, A. (2014). Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *J Biosci Bioeng*, 117(4), 413-421. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.09.006
- Habbeche, A. H., S. Saoudi, B. Kerouaz, B. Ladjama, A. (2013). Keratinase production from a thermophilic actinomycete strain Cpt29 newly isolated from poultry compost. *MINERVA BIOTECNOLOGICA*, 25(3), 151-159.
- Haberra, S., Habbeche, A., Saoudi, B., Kerouaz, B., Slimani, S., Boudelaa, M., & Ladjama, A. (2013). Optimization of Xylanase Production by a Newly Thermophilic Actinomycete Strain Cpt29 Isolated from Poultry Compost. *European Journal of Scientific Research*, 108(02), 227-239.
- Hamiche, S., Mechri, S., Khelouia, L., Annane, R., El Hattab, M., Badis, A., & Jaouadi, B. (2019). Purification and biochemical characterization of two keratinases from *Bacillus amyloliquefaciens* S13 isolated from marine brown alga *Zonaria tournefortii* with potential keratin-biodegradation and hide-unhairing activities. *Int J Biol Macromol*, 122, 758-769. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.174
- Han, J., You, D., Xu, X., Han, W., Lu, Y., Lai, R., & Meng, Q. (2008). An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. *Toxicon*, 51(5), 914-922.
- Haslay, C., & Leclerc, H. (1993). *Microbiologie des eaux d'alimentation*.
- Hassan, M. A., Taha, T. H., Hamad, G. M., Hashem, M., Alamri, S., & Mostafa, Y. S. (2020). Biochemical characterisation and application of keratinase from *Bacillus thuringiensis* MT1 to enable valorisation of hair wastes through biosynthesis of vitamin B-complex. *Int J Biol Macromol*, 153, 561-572. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.032
- He, J., Xu, Y., Sahu, M. K., Tian, X.-P., Nie, G.-X., Xie, Q., . . . Li, W.-J. (2012). *Actinomadura sediminis* sp. nov., a marine actinomycete isolated from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(5), 1110-1116.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., da Silva Figueiredo, A., & Pais, M. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29(5), 1405-1410.
- Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., & Dreyer, W. J. (1981). A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J Biol Chem*, 256(15), 7990-7997.
- Hunkapiller, M. W., & Hood, L. E. (1978). Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a nonprotein carrier (polybrene), and high pressure liquid chromatography. *Biochemistry*, 17(11), 2124-2133.
- Ignatova, Z., Gousterova, A., Spassov, G., & Nedkov, P. (1999). Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(3), 217-222.
- Isik, K., Gencbay, T., Özdemir-Kocak, F., & Cil, E. (2014). Molecular identification of different actinomycetes isolated from East Black Sea region plateau soil by 16S rDNA gene sequencing. *African Journal of Microbiology Research*, 8(9), 878-887.
- Ivanko, O. V., & Varbanets, L. D. (2004). [Purification and physico-chemical properties of *Streptomyces* sp. 1349 collagenase and *Streptomyces* sp. 1382 keratinase]. *Mikrobiol Z*, 66(2), 11-24.
- Jagadeesan, Y., Meenakshisundaram, S., Saravanan, V., & Balaiah, A. (2020). Sustainable production, biochemical and molecular characterization of thermo-and-solvent stable alkaline serine keratinase from novel *Bacillus pumilus* AR57 for promising poultry solid waste management. *Int J Biol Macromol*, 163, 135-146. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.219
- Jain, R., Jain, A., Rawat, N., Nair, M., & Gumashtha, R. (2016). Feather hydrolysate from *Streptomyces sampsonii* GS 1322: A potential low cost soil amendment. *Journal of bioscience and bioengineering*, 121(6), 672-677.

- Jain, R., & Jain, P. C. (2010). Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather. *Indian J Exp Biol*, *48*(2), 174-178.
- Jaouadi, B., Abdelmalek, B., Fodil, D., Ferradji, F. Z., Rekik, H., Zarai, N., & Bejar, S. (2010). Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents. *Bioresour Technol*, *101*(21), 8361-8369. doi: 10.1016/j.biortech.2010.05.066
- Jaouadi, B., Abdelmalek, B., Fodil, D., Ferradji, F. Z., Rekik, H., Zarái, N., & Bejar, S. (2010). Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents. *Bioresource Technology*, *101*(21), 8361-8369.
- Jaouadi, B., Zarai Jaouadi, N., Rekik, H., Naili, B., Beji, A., Dhouib, A., & Bejar, S. (2013). Biochemical and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* CTM50182 organic solvent-stable elastase. *Int J Biol Macromol*, *60*, 165-177. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.019
- Jaouadi, N. Z., Rekik, H., Badis, A., Trabelsi, S., Belhoul, M., Yahiaoui, A. B., . . . Jaouadi, B. (2013). Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities. *PLoS one*, *8*(10), e76722.
- Jaouadi, N. Z., Rekik, H., Badis, A., Trabelsi, S., Belhoul, M., Yahiaoui, A. B., . . . Jaouadi, B. (2013). Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities. *PLoS One*, *8*(10), e76722. doi: 10.1371/journal.pone.0076722
- Joshi, S., & Satyanarayana, T. (2013). Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. *Bioresour Technol*, *131*, 76-85. doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.124
- Kanoksilapatham., W., & Intagun, W. (2017). A Review: Biodegradation and Applications of Keratin Degrading Microorganisms and Keratinolytic Enzymes, Focusing on Thermophiles and Thermostable Serine Proteases. *American Journal of Applied Sciences*, *14*(11), 1016-1023. doi: 10.3844/ajassp.2017.1016.1023
- Kansoh, A. L., Hossiny, E. N., Abd, E., & Hameed, E. (2009). Keratinase production from feathers wastes using some local *Streptomyces* isolates. *Aust J Basic Appl Sci*, *3*(2), 561-571.
- Kanth, S. V., Venba, R., Jayakumar, G. C., & Chandrababu, N. K. (2009a). Kinetics of leather dyeing pretreated with enzymes: Role of acid protease. *Bioresour Technol*.
- Kanth, S. V., Venba, R., Jayakumar, G. C., & Chandrababu, N. K. (2009b). Kinetics of leather dyeing pretreated with enzymes: role of acid protease. *Bioresour Technol*, *100*(8), 2430-2435.
- Kappeler, S. R., van den Brink, H. J., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhan, Z., Hansen, E. B., & Johansen, E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem Biophys Res Commun*, *342*(2), 647-654. doi: S0006-291X(06)00297-X [pii]10.1016/j.bbrc.2006.02.014
- Ke, Y., Wei, M. Y., Fu, Y. T., Zhu, Y. M., & Zhan, X. L. (2019). Enzymatic characteristics of a recombinant protease (rPepD) from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, *162*, 67-71. doi: 10.1016/j.pep.2019.06.002
- Kembhavi, A. A., Kulkarni, A., & Pant, A. (1993). Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM no. 64. *Appl Biochem Biotechnol*, *38*(1-2), 83-92.
- Korniłowicz-Kowalska, T., & Bohacz, J. (2011). Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. *Waste Management*, *31*(8), 1689-1701.
- Kshetri, P., Ningombam, O., & Ningthoujam, D. S. (2016). Optimization of Alkaline Protease Production by Alkaliphilic *Bacillus* sp. KW2 in Low Cost Medium using Statistical Approaches. *Appli Micro*. doi: 10.4172/2471-9315
- Ku, T. W., Tsai, R. L., & Pan, T. M. (2009). A 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), 292-296.

- Kublanov, I. V., Tsurul'nikov, K. B., Kaliberda, E. N., Rumsh, L. D., Haertle, T., & Bonch-Osmolovskaia, E. A. (2009). [Keratinase of an anaerobic thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter* sp. strain 1004-09 isolated from a hot spring in the Baikal Rift zone]. *Mikrobiologiya*, *78*(1), 79-88.
- Kumar, A. G., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N., & Sekaran, G. (2008). Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. *J Appl Microbiol*, *104*(2), 411-420.
- Kumar, C. G., Malik, R. K., & M.P., T. (1998). Novel enzyme-based detergents : an indian perspective. *Curr. Sc.*, *75*(1312-1318).
- Kumar, C. G., & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv*, *17*(7), 561-594.
- Laba, W., Choinska, A., Rodziewicz, A., & Piegza, M. (2015). Keratinolytic abilities of *Micrococcus luteus* from poultry waste. *Braz J Microbiol*, *46*(3), 691-700. doi: 10.1590/S1517-838246320140098
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685.
- Lateef, A., Adelere, I. A., & Gueguim-Kana, E. B. (2015). *Bacillus safensis* LAU 13: a new source of keratinase and its multi-functional biocatalytic applications. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *29*(1), 54-63.
- Laurent, C. M., Palmer, C., Boardman, R. P., Dyke, G., & Cook, R. B. (2014). Nanomechanical properties of bird feather rachises: exploring naturally occurring fibre reinforced laminar composites. *Journal of The Royal Society Interface*, *11*(101), 20140961.
- Le Roes, M., & Meyers, P. R. (2007). *Actinomadura rudentiformis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(1), 45-50.
- Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *20*(4), 435-443.
- Lee, S.-H., Lee, H.-J., Kim, S.-J., Lee, H. M., Kang, H., & Kim, Y. P. (2010). Identification of airborne bacterial and fungal community structures in an urban area by T-RFLP analysis and quantitative real-time PCR. *Science of the total environment*, *408*(6), 1349-1357.
- Lee, S. D. (2012). *Actinomadura rupiterrae* sp. nov., isolated from cliff soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *62*(4), 990-995.
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: present and future. *FEBS Lett*, *587*(8), 1155-1163. doi: 10.1016/j.febslet.2012.12.019
- Lin, H. H., Yin, L. J., & Jiang, S. T. (2009). Functional expression and characterization of keratinase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem*, *57*(12), 5321-5325. doi: 10.1021/jf900417t
- Lin, X., Lee, C.-G., Casale, E. S., & Shih, J. C. (1992). Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Applied and environmental microbiology*, *58*(10), 3271-3275.
- Lingham-Soliar, T. (2014). Feather structure, biomechanics and biomimetics: the incredible lightness of being. *Journal of ornithology*, *155*(2), 323-336.
- Liu, B., Zhang, J., Li, B., Liao, X., Du, G., & Chen, J. (2013). Expression and characterization of extreme alkaline, oxidation-resistant keratinase from *Bacillus licheniformis* in recombinant *Bacillus subtilis* WB600 expression system and its application in wool fiber processing. *World J Microbiol Biotechnol*, *29*(5), 825-832. doi: 10.1007/s11274-012-1237-5
- Llorente, B. E., Obregón, W. D., Avilés, F. X., Caffini, N. O., & Vairo-Cavalli, S. (2014). Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. *Food chemistry*, *159*, 55-63.
- Ludwig, G. (2012). *Foundations of quantum mechanics I*: Springer Science & Business Media.

- Mandal, B. B., & Kundu, S. C. (2010). Biospinning by silkworms: silk fiber matrices for tissue engineering applications. *Acta Biomater*, *6*(2), 360-371. doi: 10.1016/j.actbio.2009.08.035
- Marchisio, V. F., & Fusconi, A. (2001). Morphological evidence for keratinolytic activity of *Scopulariopsis* spp. isolates from nail lesions and the air. *Medical Mycology*, *39*(3), 287-294.
- Marquart, M. E., Dajcs, J. J., Caballero, A. R., Thibodeaux, B. A., & O'Callaghan, R. J. (2005). Calcium and magnesium enhance the production of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV, a corneal virulence factor. *Med Microbiol Immunol*, *194*(1-2), 39-45. doi: 10.1007/s00430-003-0207-9
- Masui, A., Yasuda, M., Fujiwara, N., & Ishikawa, H. (2004). Enzymatic hydrolysis of gelatin layers on used lith film using thermostable alkaline protease for recovery of silver and PET film. *Biotechnol Prog*, *20*(4), 1267-1269. doi: 10.1021/bp030058s
- Mechri, S., Bouacem, K., Amziane, M., Dab, A., Nateche, F., & Jaouadi, B. (2019). Identification of a New Serine Alkaline Peptidase from the Moderately Halophilic *Virgibacillus natechei* sp. nov., Strain FarD(T) and its Application as Bioadditive for Peptide Synthesis and Laundry Detergent Formulations. *Biomed Res Int*, *2019*, 6470897. doi: 10.1155/2019/6470897
- Mitsuiki, S., Sakai, M., Moriyama, Y., Goto, M., & Furukawa, K. (2002). Purification and some properties of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiosis* sp. TOA-1. *Biosci Biotechnol Biochem*, *66*(1), 164-167. doi: 10.1271/bbb.66.164
- Miyadoh, S., & Miyara, T. (2001). Family Thermomonosporaceae. *Identification Manual of Actinomycetes*, 281-291.
- Molina de Diego, A. (2011). [Clinical, diagnostic and therapeutic aspects of dermatophytosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, *29 Suppl 3*, 33-39. doi: 10.1016/S0213-005X(11)70025-8
- Moreira-Gasparin, F. G., de Souza, C. G., Costa, A. M., Alexandrino, A. M., Bracht, C. K., Boer, C. G., & Peralta, R. M. (2009). Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria*. *Biodegradation*, *20*(5), 727-736. doi: 10.1007/s10532-009-9260-4
- Morihara, K. (1974). Comparative specificity of microbial proteinases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, *41*(0), 179-243. doi: 10.1002/9780470122860.ch5
- Mueller, M. S., & Mechler, E. (2005). *Medicinal Plants in Tropical Countries: Traditional Use - Experience - Facts*: Thieme.
- Nam, G.-W., Lee, D.-W., Lee, H.-S., Lee, N.-J., Kim, B.-C., Choe, E.-A., . . . Pyun, Y.-R. (2002). Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology*, *178*(6), 538-547.
- Nanjwade, B., Chandrashekhara, S., Goudanavar, P., Shamarez, A., & Manvi, F. (2010). Production of antibiotics from soil-isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *9*(4).
- Nardello-Rataj, V., Ho Tan Tai, L., & Aubry, J.-M. (2003). Les lessives en poudre : Un siècle d'innovations pour éliminer les taches. *Actualité chimique* 3-10.
- Nilegaonkar, S. S., Zambare, V. P., Kanekar, P. P., Dhakephalkar, P. K., & Sarnaik, S. S. (2007). Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresour Technol*, *98*(6), 1238-1245. doi: 10.1016/j.biortech.2006.05.003
- Nnolim, N. E., Mpaka, L., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2020). Biochemical and Molecular Characterization of a Thermostable Alkaline Metallo-Keratinase from *Bacillus* sp. Nnolim-K1. *Microorganisms*, *8*(9). doi: 10.3390/microorganisms8091304
- Nnolim, N. E., Ntozonke, N., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2020). Exoproduction and characterization of a detergent-stable alkaline keratinase from *Arthrobacter* sp. KFS-1. *Biochimie*, *177*, 53-62. doi: 10.1016/j.biochi.2020.08.005
- OKONIEWSKA, M., & TANAKA, T. (2000). The pepsin residue glycine-76 contributes to active-site loop flexibility and participates in catalysis. *Biochemical Journal*, *349*(1), 169-177.
- Onifade, A., Al-Sane, N., Al-Musallam, A., & Al-Zarban, S. (1998). A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for

- nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*, 66(1), 1-11.
- Otsuki, N., Dang, N. H., Kumagai, E., Kondo, A., Iwata, S., & Morimoto, C. (2010). Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(3), 760-767.
- Pawar, V. A., Prajapati, A. S., Akhani, R. C., Patel, D. H., & Subramanian, R. B. (2018). Molecular and biochemical characterization of a thermostable keratinase from *Bacillus altitudinis* RBDV1. *3 Biotech*, 8(2), 107. doi: 10.1007/s13205-018-1130-5
- Peitsch, M. C. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans*, 24(1), 274-279.
- Pillai, P., & Archana, G. (2008). Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(4), 643.
- Pissuwan, D., & Suntornsuk, W. (2001). Production of keratinase by *Bacillus* sp. FK 28 isolated in Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 35, 171-178.
- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multi-factorial experiments. *Biometrika*, 33, 305-325.
- Prabha, M. S., Divakar, K., Priya, J. D. A., Selvam, G. P., Balasubramanian, N., & Gautam, P. (2015). Statistical analysis of production of protease and esterase by a newly isolated *Lysinibacillus fusiformis* AU01: purification and application of protease in sub-culturing cell lines. *Annals of Microbiology* 65(1), 33-46.
- Prakash, P., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2010). Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87(2), 625-633. doi: 10.1007/s00253-010-2499-1
- Prasong, S., Yaowalak, S., & Wilaiwan, S. (2009). Characteristics of silk fiber with and without sericin component: a comparison between *Bombyx mori* and *Philosamia ricini* silks. *Pak J Biol Sci*, 12(11), 872-876.
- Preczeski, K. P., Dalastra, C., Czapela, F. F., Kubeneck, S., Scapini, T., Camargo, A. F., . . . Treichel, H. (2020). *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. as Keratinase Producers Using Swine Hair From Agroindustrial Residues. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 71. doi: 10.3389/fbioe.2020.00071
- Promnuan, Y., Kudo, T., Ohkuma, M., & Chantawannakul, P. (2011). *Actinomadura apis* sp. nov., isolated from a honey bee (*Apis mellifera*) hive, and the reclassification of *Actinomadura crema* subsp. *rifamycini* Gauze et al. 1987 as *Actinomadura rifamycini* (Gauze et al. 1987) sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(9), 2271-2277.
- Puhl, A. A., Selinger, L. B., McAllister, T. A., & Inglis, G. D. (2009). *Actinomadura keratinilytica* sp. nov., a keratin-degrading actinobacterium isolated from bovine manure compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(4), 828-834.
- Qin, S., Zhao, G.-Z., Li, J., Zhu, W.-Y., Xu, L.-H., & Li, W.-J. (2009). *Actinomadura flavalba* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from leaves of *Maytenus austroyunnanensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2453-2457.
- Ramakrishna Reddy, M., Sathi Reddy, K., Ranjita Chouhan, Y., Bee, H., & Reddy, G. (2017). Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive. *Bioresour Technol*, 243, 254-263. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.067
- Ramnani, P., Singh, R., & Gupta, R. (2005). Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(3), 191-196.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.

- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998a). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *62*(3), 597-635.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998b). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, *62*(3), 597-635.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial Proteases Applications. *Front Bioeng Biotechnol*, *7*, 110. doi: 10.3389/fbioe.2019.00110
- Redes, J. L., Basu, T., Ram-Mohan, S., Ghosh, C. C., Chan, E. C., Sek, A. C., . . . Druey, K. M. (2019). Aspergillus fumigatus-Secreted Alkaline Protease 1 Mediates Airways Hyperresponsiveness in Severe Asthma. *Immunohorizons*, *3*(8), 368-377. doi: 10.4049/immunohorizons.1900046
- Rekik, H., Frikha, F., Zraï Jaouadi, N., Gargouri, F., Jmal, N., Bejar, S., & Jaouadi, B. (2019). Gene cloning, expression, molecular modeling and docking study of the protease SAPRH from Bacillus safensis strain RH12. *International journal of biological macromolecules*, *125*, 876-891. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.103>
- Riessen, S., & Antranikian, G. (2001). Isolation of Thermoanaerobacter keratinophilus sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles*, *5*(6), 399-408.
- Riffel, A., & Brandelli, A. (2002). Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. *J Ind Microbiol Biotechnol*, *29*(5), 255-258. doi: 10.1038/sj.jim.7000307
- Rouse, J. G., & Van Dyke, M. E. (2010). A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*, *3*(2), 999-1014.
- Ruthenb rger, M., Mayerle, J., & Lerch, M. M. (2006). Cell biology of pancreatic proteases. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, *35*(2), 313-331.
- S. Balaji, M. S. K., R. Karthikeyan, Ramadhar Kumar, S. Kirubanandan, R. Sridhar & P. K. Sehgal. (2008). Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading Bacillus subtilis MTCC (9102). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*, 2741-2745. doi: 10.1007/s11274-008-9782-7
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd edn*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sangali, S., & Brandelli, A. (2000). Feather keratin hydrolysis by a Vibrio sp. strain kr2. *J Appl Microbiol*, *89*(5), 735-743.
- Sanghvi, G. V., Ghevariya, D., Gosai, S., Langa, R., Dhaduk, N., Kunjadia, P. D., . . . Dave, G. S. (2014). Isolation and partial purification of erythromycin from alkaliphilic Streptomyces werraensis isolated from Rajkot, India. *Biotechnology Reports*, *1*, 2-7.
- Saoudi., B., Habbeche., A., Kerouaz., B., Haberra., S., Romdhane., Z. B., Tichati., L., . . . Ladjama., A. (2015). Purification and characterization of a new thermoalkaliphilic pectate lyase from Actinomadura keratinilytica Cpt20, Process Biochemistry. *Process Biochemistry*, *50*(12), 2259-2266. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.10.006>
- Schor, R., & Krimm, S. (1961). Studies on the structure of feather keratin: II. A  $\beta$ -helix model for the structure of feather keratin. *Biophysical journal*, *1*(6), 489-515.
- Scott, J., & Untereiner, W. (2004). Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Medical Mycology*, *42*(3), 239-246.
- Shirling, E. B., & Speer, M. (1967). Spot test method for rapid serological grouping of streptomycete bacteriophages. *Appl Microbiol*, *15*(2), 456-457.
- Shpacovitch, V., Feld, M., Hollenberg, M., Luger, T., & Steinhoff, M. (2008). Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *Journal of leukocyte biology*, *83*(6), 1309-1322.
- Shpacovitch, V., Feld, M., Hollenberg, M. D., Luger, T. A., & Steinhoff, M. (2008). Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*.

- Sidrach, L., Garcia-Canovas, F., Tudela, J., & Rodriguez-Lopez, J. N. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, *66*(1), 41-49. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.10.005
- Sikander, a., awa, U. f., & javed, W. (2012). Dipotassium hydrogen phosphate improves lipase production at a neutral pH of phosphate buffer by *Rhizopus oligosporus*. *BIOLOGIA*(58), 65-71.
- Singh, S., Gupta, P., Sharma, V., Koul, S., Kour, K., & Bajaj, B. K. (2014). Multifarious potential applications of keratinase of *Bacillus subtilis* K-5. *Biocatalysis and Biotransformation*, *32*(5-6), 333-342.
- Smith, E. L., Markland, F. S., Kasper, C. B., DeLange, R. J., Landon, M., & Evans, W. H. (1966). The complete amino acid sequence of two types of subtilisin, BPN' and Carlsberg. *J Biol Chem*, *241*(24), 5974-5976.
- Soussotte Genin, V. (1999). *Identification de nouvelles protéases microbiennes utilisables en tannerie pour l'épilage et pour la valorisation des déchets riches en kératine*.
- Suh H.J., Lee H.K. (2001). Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *J Protein Chem*. *20*: 165-169.
- Sullivan, G. A., & Calkins, C. (2010). Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat science*, *85*(4), 730-734.
- Szabo, I., Benedek, A., Szabó, I. M., & Barabas, G. (2000). Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *16*(3), 253-255.
- Taibi, Z., Saoudi, B., Boudelaa, M., Trigui, H., Belghith, H., Gargouri, A., & Ladjama, A. (2012). Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomyces* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost. *Appl Biochem Biotechnol*, *166*(3), 663-679. doi: 10.1007/s12010-011-9457-y
- Tian, J., Xu, Z., Long, X., Tian, Y., & Shi, B. (2019). High-expression keratinase by *Bacillus subtilis* SCK6 for enzymatic dehairing of goatskins. *Int J Biol Macromol*, *135*, 119-126. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.131
- Tinsson, W. (2010). *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques* (1 ed.).
- Tiwary, E., & Gupta, R. (2010). Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15: biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides. *Bioresour Technol*, *101*(15), 6103-6110. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.090
- Touioui, S. B., Jaouadi, N. Z., Boudjella, H., Ferradji, F. Z., Belhoul, M., Rekik, H., . . . Jaouadi, B. (2015). Purification and biochemical characterization of two detergent-stable serine alkaline proteases from *Streptomyces* sp. strain AH4. *World J Microbiol Biotechnol*, *31*(7), 1079-1092. doi: 10.1007/s11274-015-1858-6
- Trujillo, A., Capellas, M., Buffa, M., Royo, C., Gervilla, R., Felipe, X., . . . Guamis, B. (2000). Application of high pressure treatment for cheese production. *Food Research International*, *33*(3), 311-316.
- Uhlir, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications*: John Wiley & Sons. Van Gunsteren, W. F., Billeter, S. R., Eising, A. A., Hunenberger, P. H., Kruger, P., Mark, A. M., . . . Tironi, I. G. (1996). Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide. Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich and BIOMOS b.v.: Zürich. Switzerland; Groningen, The Netherlands, 1-1042.
- Vanhoutteghem, A., Londero, T., Ghinea, N., & Djian, P. (2004). Serial cultivation of chicken keratinocytes, a composite cell type that accumulates lipids and synthesizes a novel  $\beta$ -keratin. *Differentiation*, *72*(4), 123-137.
- Venter, H., Osthoff, G., & Litthauer, D. (1999). Purification and Characterization of a Metalloprotease from *Chryseobacterium indologenes* Ix9a and Determination of the Amino Acid Specificity with Electrospray Mass Spectrometry. *Protein expression and purification*, *15*(3), 282-295.

- Victoria, U., & K, A. (2018). Optimization of production and partial characterization of keratinase produced by *Bacillus thuringiensis* strain Bt407 isolated from poultry soil. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 7(4), 147–153. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.069>
- Vidmar, B., & Vodovnik, M. (2018). Microbial Keratinases: Enzymes with Promising Biotechnological Applications. *Food Technol Biotechnol*, 56(3), 312–328. doi: 10.17113/ftb.56.03.18.5658
- Vojcic, L., Pitzler, C., Korfer, G., Jakob, F., Ronny, M., Maurer, K. H., & Schwaneberg, U. (2015). Advances in protease engineering for laundry detergents. *N Biotechnol*, 32(6), 629–634. doi: 10.1016/j.nbt.2014.12.010
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., . . . Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880), 535–539.
- Wang, L., Qian, Y., Cao, Y., Huang, Y., Chang, Z., & Huang, H. (2017). Production and Characterization of Keratinolytic Proteases by a Chicken Feather-Degrading Thermophilic Strain, *Thermoactinomyces* sp. YT06. *J Microbiol Biotechnol*, 27(12), 2190–2198. doi: 10.4014/jmb.1705.05082
- Wang, L., Zhang, B., Han, J., Zheng, Y., Li, J., & Shan, A. (2015). Optimization of hydrolysis condition of blood meal by *Bacillus subtilis* with response surface methodology. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 112–117. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.018>
- Wang, L., Zhou, Y., Huang, Y., Wei, Q., Huang, H., & Guo, C. (2019). Cloning and expression of a thermostable keratinase gene from *Thermoactinomyces* sp. YT06 in *Escherichia coli* and characterization of purified recombinant enzymes. *World J Microbiol Biotechnol*, 35(9), 135. doi: 10.1007/s11274-019-2710-1
- Watanabe, T., Ozaki, N., Iwashita, K., Fujii, T., & Iefuji, H. (2008). Breeding of wastewater treatment yeasts that accumulate high concentrations of phosphorus. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80(2), 331–338. doi: 10.1007/s00253-008-1529-8
- Wells, J. A., & Estell, D. A. (1988). Subtilisin--an enzyme designed to be engineered. *Trends Biochem Sci*, 13(8), 291–297. doi: 10.1016/0968-0004(88)90121-1
- Williams, C. M., Richter, C. S., Mackenzie, J. M., & Shih, J. C. (1990). Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 56(6), 1509–1515.
- Wink, J., Kroppenstedt, R. M., Seibert, G., & Stackebrandt, E. (2003). *Actinomadura namibiensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 721–724.
- Wu, W. L., Chen, M. Y., Tu, I. F., Lin, Y. C., Eswarkumar, N., Chen, M. Y., . . . Wu, S. H. (2017). The discovery of novel heat-stable keratinases from *Meiothermus taiwanensis* WR-220 and other extremophiles. *Sci Rep*, 7(1), 4658. doi: 10.1038/s41598-017-04723-4
- Wysocka, M., Spichalska, B., Lesner, A., Jaros, M., Brzozowski, K., Legowska, A., & Rolka, K. (2010). Substrate specificity and inhibitory study of human airway trypsin-like protease. *Bioorg Med Chem*, 18(15), 5504–5509. doi: S0968-0896(10)00587-0 [pii]10.1016/j.bmc.2010.06.059
- Yassin, A., Spröer, C., Siering, C., & Klenk, H.-P. (2010). *Actinomadura sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 149–153.
- Zarai Jaouadi, N., Rekik, H., Ben Elhou, M., Zohra Rahem, F., Hila, C. G., Ben Aicha, H. S., . . . Jaouadi, B. (2015). A novel keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process. *Int J Biol Macromol*, 79, 952–964. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.038
- Zhang, H., Lee, Y. K., Zhang, W., & Lee, H. K. (2006). Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perlevei*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90(2), 159–169.
- Zhang, R. X., Gong, J. S., Su, C., Zhang, D. D., Tian, H., Dou, W. F., . . . Xu, Z. H. (2016). Biochemical characterization of a novel surfactant-stable serine keratinase with no collagenase activity

- from *Brevibacillus parabrevis* CGMCC 10798. *Int J Biol Macromol*, 93(Pt A), 843-851. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.063
- Zhang, R. X., Gong, J. S., Zhang, D. D., Su, C., Hou, Y. S., Li, H., . . . Xu, Z. H. (2016). A metallo-keratinase from a newly isolated *Acinetobacter* sp. R-1 with low collagenase activity and its biotechnological application potential in leather industry. *Bioprocess Biosyst Eng*, 39(1), 193-204. doi: 10.1007/s00449-015-1503-7
- Zhang, Z., Wang, Y., & Ruan, J. (1998). Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 411-422.

I